

# НАБІР РЕАГЕНТІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ 25(OH)-ВІТАМІНУ D ЗАГАЛЬНОГО МЕТОДОМ ІФА

## 25(OH) Vitamin D Total Direct (Vit D-Direct) Test System

Кат. №: 9425-300A

Дата випуску інструкції: 10-01-2018

Версія: 2



Основною при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу і перекладу інструкції повинні збігатися.

### 1.0 ВСТУП

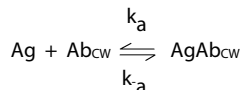
**Призначення:** Кількісне визначення концентрації 25-OH вітаміну D в сироватці людини за допомогою ІФА, Колориметричний.

**2.0 ПОЯСНЕННЯ ТЕСТУ** (Див. Оригінал інструкції).

### 3.0 ПРИНЦИП МЕТОДУ

**Послідовний конкурентний метод (тип 6):**

Реагенти, що вимагаються для послідовного твердофазного імуноферментного аналізу, включають іммобілізовані антитіла, кон'югат ферменту з антигеном і нативний антиген. При змішуванні іммобілізованого антитіла і зразка цільної крові, що містить нативний антиген, відбувається реакція зв'язування між нативними антигенами за обмежену кількість сайтів зв'язування. Взаємодія ілюструється наступним рівнянням:



$\text{Ab}_{\text{CW}}$  = моноспецифічні біотинильовані антитіла (стала кількість)

$\text{Ag}$  = антиген (змінна кількість)

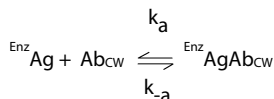
$\text{AgAb}_{\text{CW}}$  = комплекс антиген-антитіло

$k_a$  = константа швидкості асоціації

$k_{-a}$  = константа швидкості дисоціації

$K = k_a/k_{-a}$  = константа рівноваги

Після видалення нативного антигена, який не прореагував, під час кроку промивки, залишається ферментно-кон'югований антиген. Кон'югат реагує з антитілом, незахопленим нативним антигеном.



$\text{Enz Ag}$  = кон'югат фермент-антиген (постійна величина)

$\text{Enz Ag Ab}_{\text{CW}}$  = комплекс кон'югат – антитіло

Після короткої другої інкубації пов'язана з антитілом фракція відділяється від незв'язаного антигена декантацією чи аспірацією. Ферментна активність пов'язаної з антитілом фракції обернено пропорційна до концентрації нативного антигена. При використанні декількох стандартів з відомим значенням концентрації антигену будується калібрувальна крива, по якій обчислюється концентрація в зразках.

### 4.0 РЕАГЕНТИ

**Матеріали, що постачаються:**

#### A. Калібратори Вітаміну D - 1 мл (мл)/флакон

7 флаконів референсних калібраторів людського сироваткового альбуміну для 25-OH Вітаміну D з **приблизними\*** концентраціями 0 (A), 5 (B), 10 (C), 25 (D), 46 (E), 85 (F) та 150 (G) в нг/мл (ng/ml). Містить консерванти. Зберігати при 2-8 °C (°C).

\*Точні концентрації зазначені на етикетках для кожного лоту.

Концентрації стандартів можуть бути виражені в молярних концентраціях (нМ/л (nM/l)), множенням на коефіцієнт 2.5. Наприклад: 10 нг/мл (ng/ml) x 2.5 = 25 нМ/л (nM/l)

#### B. Контролі Вітаміну D - 1 мл (мл)/флакон

Два (2) флакони, що містять референтні контролі сироватки людини у встановлених концентраціях (точне значення зазначене на етикетці). Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### C. Вивільнюючий реагент Вітаміну D - 12 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить вивільнюючі агенти зв'язуючого білка вітаміну D. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### D. Ферментний реагент Вітаміну D - 12 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить кон'югат 25-OH вітаміну D<sub>3</sub> (аналог)-пероксидаза хрому (HRP) в матриці, що стабілізує білок. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### E. Планшет з нанесеними антитілами Вітаміну D - 96 лунок

Один 96-лунковий мікропланшет з нанесеним IgG вівці анти-Вітаміну D < 1,0 мкг/мл (ml) та упакований в алюмінієвий пакет з осушувачем. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### F. Концентрат Промивного розчину - 20 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить поверхнево-активну речовину в буферному фізіологічному розчині. Додано консервант. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### G. Субстратний Реагент - 12 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон з тетраметилбензидином (ТМБ) та перекисом водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) у буфері. Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### H. Стоп-розчин - 8 мл (мл)/флакон

Один (1) флакон, що містить сильну кислоту (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Зберігати при 2-8 °C (°C).

#### I. Інструкція до набору.

**Зауваження 1:** Не використовуйте реагенти з вичерпаним терміном придатності.

**Зауваження 2:** Не піддавати впливу тепла та сонця. Відкриті реагенти стабільні 60 днів при зберіганні від 2 до 8 °C (°C). Стабільність компонентів та набору зазначені на етикетці.

**Зауваження 3:** Перераховані реагенти для одного 96-лунового мікропланшета.

#### 4.1 Необхідні, але не надані з набором матеріали

1. Дозатор з можливістю доставляти об'єми 0.025 і 0.100 мл (ml) (25 та 100 мкл (μl)) з точністю не гірше 1.5%.
2. Диспенсер (и) для повторюваних поставок об'ємом 0.100 і 0.350 мл (ml) (100 і 350 мкл (μl)) з точністю не гірше 1.5%.
3. Мікропланшетний вошер або пляшка під тиском (опційно).
4. Мікропланшетний рідер з фільтрами 450 нм (nm) і 620 нм (nm).
5. Фільтрувальний папір для висушування мікролунок.
6. Пластикові плівки або кришки для інкубування мікропланшетів.
7. Вакуумний аспіратор для промивання (опційно).
8. Таймер.
9. Контрольні матеріали.

#### 5.0 ЗАУВАЖЕННЯ ТА ЗАСТЕРЕЖЕННЯ

**Набір призначений тільки для діагностики in-vitro**

**Не для внутрішнього або зовнішнього використання**

**на людя або тваринах**

Використовувана для виготовлення компонентів набору людська сироватка протестована методами, схваленими FDA, в яких отримані негативні результати на наявність антитіл до ВІЛ 1 та 2, ВРС і поверхневого антигену гепатиту В. Однак, оскільки не існує методів, що дають повну гарантію відсутності інфекційних агентів, з реагентами слід поводитися з обережністю, як з потенційно небезпечним біоматеріалом, що рекомендується для будь-яких зразків крові згідно правил кваліфікованої лабораторної практики. Рекомендації дивіться в національних посібниках з безпеки або, наприклад, в "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2nd Edition, 1988, NHS.

Безпечна утилізація компонентів набору повинна відповідати вимогам місцевої регуляторної та нормативної бази.

#### 6.0 ЗБІР І ЗБЕРІГАННЯ ЗРАЗКІВ

Зразками служать кров, сироватка за типом; дотримуватись звичайних запобіжних заходів при заборі зразків венепункцією. Для точного порівняння, щоб встановити нормальні значення, зразок сироватки повинен бути отриманий натщесерце вранці. Кров слід збирати в пробірці з червоним верхом Redtop (з або без добавок гелю) або для плазми використовувати вакуумні трубки, що містять гепарин. Дайте крові згорнутися для зразків сироватки. Центрифугувати зразки, щоб відокремити сироватку або плазму від клітин.

Зразки можуть зберігатися при 2-8 °C (°C) до 5 днів. Якщо зразки не можуть бути проаналізовані протягом цього часу, то вони можуть зберігатися при температурі -20 °C (°C) протягом до 30 днів. Уникайте використання забруднених пристроїв. Уникайте повторного заморожування і відтавання. При аналізі в дублікатах необхідно 50 мкл (μl) зразка.

## 7.0 КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Кожна лабораторія повинна використовувати контроль в низькому, середньому та високому діапазоні значень для відстеження характеристик набору. Ці контрольні повинні досліджуватися як невідомі зразки в кожній постановці аналізу. Повинні будуватися карти контролю якості для відстеження характеристик реагентів, що поставляються. Слід застосовувати прийнятні статистичні методи для встановлення відхилень. Значні відхилення від встановлених характеристик можуть свідчити про зміни в умовах експерименту або зниження якості реагентів набору. Для визначення причини змін повинні бути використані свіжі реагенти.

## 8.0 ПРИГОТУВАННЯ РЕАГЕНТІВ

### 1. Буфер для промивок

Розбавте концентрат розчину для промивання до 1000 мл (ml) дистильованою або деіонізованою водою. Зберігайте при кімнатній температурі (2-30 °C (°C)) до 60 днів.

## 9.0 ПРОТОКОЛ АНАЛІЗУ

Перед початком аналізу всі реагенти, стандарти і контрольні повинні досягти кімнатної температури (20-27 °C (°C)).

**\*\*Процедура тестування повинна виконуватися кваліфікованою людиною або навченим професіоналом\*\***

- Виберіть необхідну кількість лунок для зразків, стандартів і контрольів для постановки в дублях. Поверніть невикористані смужки в алюмінієвий пакет і закрийте його. Зберігайте при 2-8 °C (°C).
- Додайте піпеткою по 25 мкл (µl) відповідних екстрагованих калібратора 25-ОН Вітаміну D, контролю або зразка у відповідні лунки.
- Додати 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) Вивільнюючого агенту 25-ОН Вітаміну D в усі лунки.
- Змішайте (Примітка 3) вміст мікропланшета протягом 20-30 секунд, поки не буде однорідним.
- Накрийте та інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Додайте 350 мкл (µl) промивного буфера (див. розділ "Приготування реагентів") і видаліть його. Повторіть процедуру ще два рази (загальна кількість циклів промивки - 3). Для цієї процедури краще використовувати автоматичний або ручний вошер відповідно до інструкцій виробника приладів. Якщо використовується пляшка під тиском, наповнити кожен лунку до верху (уникайте повітряних бульбашок).
- Додайте по 100 мкл (µl) Ферментного реагенту 25-ОН Вітаміну D в кожен лунку.

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ

- Накрийте та інкубуйте 30 хвилин при кімнатній температурі.
- Видаліть вміст лунок декантациєю або аспірацією. Висушіть планшет на фільтрувальному папері, якщо використовувалася декантация.
- Внесіть 0.350 мл (ml) (350 мкл (µl)) Промивного буфера (див. Розділ "Підготовка реагентів"), декантуйте або аспіруйте. Повторіть два (2) додаткові рази, в загальному три (3) промивання. Можна використовувати автоматичний або ручний промивний вошер. Дотримуйтесь інструкцій виробника, щоб правильно їх використовувати. Якщо використовується пляшка для промивання, заповніть кожен лунку, стискаючи пляшку (уникаючи утворення повітряних бульбашок). Декантуйте промивний розчин та повторіть два (2) додаткові рази.
- Додайте 0.100 мл (ml) (100 мкл (µl)) субстратного реагенту до всіх лунок. Завжди додавайте реагенти в одному порядку, щоб звести до мінімуму відмінності часу реакції між лунками.

### НЕ СТРУШУЙТЕ ПЛАНШЕТ ПІСЛЯ ДОДАВАННЯ СУБСТРАТУ

- Інкубуйте при кімнатній температурі протягом двадцяти (20) хвилин.
- Зупиніть розвиток забарвлення додаванням в кожен лунку 50 мкл (µl) стоп-розчину і перемішайте протягом 15-20 секунд. Завжди додавайте реагенти в одній і тій же послідовності і з однаковою швидкістю, щоб уникнути відмінностей у часі реакції в різних лунках.
- Виміряйте величини поглинання вмісту лунок на довжині хвилі 450 нм (вимірювання проводити при референсній довжині хвилі 620-630 нм). Виміри повинні бути проведені протягом 15 хвилин після додавання стоп-розчину.

**Зауваження 1:** Не використовуйте робочий розчин субстрату, якщо він придбав блакитне забарвлення.

**Зауваження 2:** Не використовувати забруднені реагенти і реактиви з видимим ростом бактерій.

**Зауваження 3:** Цикл перемішування (початок і зупинка) (4 цикли) протягом 5-8 секунд/цикл є більш ефективним, ніж один безперервний цикл (20-30 секунд) для досягнення однорідності. Для виконання циклів змішування можна використовувати змішувач для планшета.

**Зауваження 4:** Надзвичайно важливим є точне дозування правильного об'єму з використанням каліброваною піпетки і внесення близько до нижньої частини скляних пробірок під кутом, торкаючись стінки пробірки.

## 10.0 РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

Для визначення концентрації 25-ОН Вітаміну D в невідомих зразках використовується калібрувальна крива.

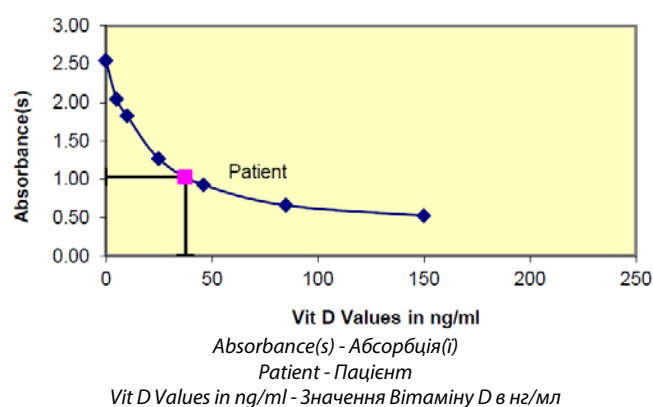
- Запишіть значення оптичної щільності для всіх лунок як показано в прикладі 1.
- Для побудови калібрувальної кривої на лінійному графічному папері використовуйте кожен з двох оптичних густин для кожного стандарту залежно від концентрації 25-ОН Вітаміну D в нг/мл (ng/ml) (не розраховуйте середнього значення до побудови).
- Проведіть оптимальну калібрувальну криву.
- Для визначення концентрації 25-ОН Вітаміну D в невідомих зразках знайти середню абсорбцію дублікатів для кожного невідомого на вертикальній осі графіка, знайти точку перетину з кривою і концентрацію (в нг/мл (ng/ml)) з горизонтальної осі графіка (дублікати невідомих зразків можуть бути усереднені). У наступному прикладі, середня абсорбція (1.033) перетинає криву в точці 39.9 нг/мл (ng/ml) (малюнок 1).

Приклад 1

Зразок	Лунка	Абсорбція (A)	Середнє абсорбції (B)	Концентрація (нг/мл (ng/ml))
Калібратор А	A1	2.559	2.548	0
	B1	2.537		
Калібратор В	C1	2.041	2.047	5
	D1	2.054		
Калібратор С	E1	1.848	1.826	10
	F1	1.804		
Калібратор Д	G1	1.286	1.267	25
	H1	1.249		
Калібратор Е	A2	0.934	0.930	46
	B2	0.927		
Калібратор F	C2	0.654	0.663	85
	D2	0.712		
Калібратор G	G2	0.511	0.529	150
	H2	0.546		
Зразок	A3	1.027	1.033	37.5
	A4	1.039		

\* Дані, таблиці та рисунки наведені тільки для прикладу. Не використовуйте їх для розрахунку результатів.

Малюнок 1



Примітка: Помножте горизонтальні значення на 2.5 для перетворення в нМ/мл (nM/ml).

## 11.0 ПАРАМЕТРИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

Результати аналізу можна вважати достовірними, якщо дотримуються наступні умови:

- Оптична щільність калібратора 0 нг/мл (ng/ml)  $\geq$  1.3.
- Чотири з шести контрольні якості повинні укладатися у встановлені інтервали.

## 12.0 АНАЛІЗ РИЗИКІВ

MSDS та Форма Аналізу Ризиків для даного продукту доступні за запитом від Monobind Inc.

### 12.1 Якість роботи набору

- Для відтворюваності результатів важливо, щоб час реакції підтримувався постійним в кожній лунці.

2. Піпетування зразків не повинно перевищувати 10 хвилин.
3. Не використовувати високо ліпемічні, гемолізовані або забруднені зразки.
4. Якщо використовується більше, ніж один планшет, рекомендується повторювати калібрувальну криву.
5. Додавання субстратного розчину ініціює кінетичну реакцію, яка зупиняється при додаванні стоп-розчину. Отже, додавання субстрату і стоп-розчину повинно проводитися в однаковій послідовності для усунення відмінностей у часі реакції в різних лунках.
6. Вимірювання оптичної щільності на рідері проходить вертикально. Не торкайтеся до дна мікролунок.
7. Погана промивка лунок (неповне видалення розчину під час аспірації) може призводити до невідтворюваних і недостовірних результатів.
8. Використовуйте компоненти тільки з одного лота. Не змішуйте реагенти з різних партій.
9. Правильне і точне піпетування, а також дотримання точного часу і температурних вимог є необхідними умовами. Будь-які відхилення від встановлених Monobind можуть давати невірні результати.
10. Дотримуватись всіх встановлених норм роботи лабораторної практики для забезпечення нормальної роботи пристрою.
11. Важливим є калібрування всього обладнання, тобто, піпеток, рідера, вошера та/або автоматизованих інструментів, які використовуються з даним пристроєм. Також обов'язковим є належний догляд і обслуговування пристрою.
12. Аналіз ризиків для даного пристрою може бути наданий Monobind.

### 14.2 Інтерпретація результатів

1. *Вимірювання та інтерпретація результатів повинні бути виконані кваліфікованим навченим професіоналом.*
2. Лабораторні результати не можуть бути єдиним критерієм для визначення лікування, особливо, якщо отримані результати не співпадають з іншими дослідженнями.
3. Реагенти для процедури тестової системи були розроблені для усунення максимальних перешкод; однак, потенційна взаємодія між рідкісними зразками сироватки та випробувальними реагентами може призвести до помилкових результатів. Гетерофільні антитіла часто викликають ці взаємодії і, як відомо, є проблемами для всіх видів імунологічних аналізів. (*Boscato LM Stuart MC "Гетерофільні антитіла: проблема для всіх імунологічних досліджень" Clin. Chem. 1988: 3427-33*). Для діагностичних цілей результати цього аналізу повинні використовуватися в комбінації з клінічним оглядом, історією хвороби та всіма іншими клінічними висновками.
4. Для отримання дійсних результатів адекватні контролі та інші параметри повинні знаходитись в межах встановлених норм.
5. *Monobind не несе відповідальності за результати тесту в разі, якщо складові набору були замінені іншими складовими з інших наборів, або якщо результати були інтерпретовані невірно.*
6. Якщо для обробки результатів тесту використовується комп'ютер, то розраховані значення стандартів не повинні відхилитися більш, ніж на 10% від приписаних значень концентрації.

### 13.0 ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

На підставі опублікованої літератури було визначено наступні діапазони.

**Ці діапазони слід використовувати лише як керівництво:**

**ТАБЛИЦЯ 1**  
**Очікувані значення для ІФА Вітамін D Прямий**

РІВЕНЬ	ДІАПАЗОН (нг/мл (ng/ml))
Дуже сильний дефіцит вітаміну D	<5
Сильний дефіцит вітаміну D	5-10
Дефіцит вітаміну D	10-20
Субоптимальне забезпечення вітаміну D	20-30
Оптимальний рівень вітаміну D	30-50
Верхня норма	50-70
Передозування, але не токсичне	70-150
Вітамін D інтоксикація	> 150

Важливо мати на увазі, що встановлений діапазон значень, який можна очікувати у даної популяції "нормальних" людей з використанням даного методу, залежить від безлічі факторів: специфічності методу, популяції, яка тестується, і точності методу в руках лаборанта. З цих причин кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон нормальних значень.

### 14.0 ХАРАКТЕРИСТИКИ НАБОРУ

#### 14.1 Точність

Точність набору всередині серії і між серіями визначалася в аналізі пулів сироваток трьох різних рівнів. Кількість (N), середнє значення (x), стандартне відхилення (δ) і коефіцієнт варіації (C.V.) для цих сироваток наведені в таблицях 2 і 3.

**ТАБЛИЦЯ 2**  
**Точність в аналізі**

Сироватка	N	x	δ	C.V., %
1	20	22.16	1.35	6.10
2	20	34.96	1.44	4.11
3	20	86.09	6.37	7.40

**ТАБЛИЦЯ 3**  
**Точність між аналізами**

Сироватка	N	x	δ	C.V., %
1	45	23.88	2.14	8.96
2	45	37.53	3.44	9.17
3	45	87.91	7.1	8.08

#### 14.2 Чутливість

Чутливість методу склала 1.14 нг/мл (ng/ml). Чутливість (межа визначення) визначений статистично як концентрація, відповідна значенню оптичної щільності нульового стандарту 0 пг/мл (pg/ml) плюс 2σ (σ - Стандартне відхилення) при 95% довірчому інтервалі.

#### 14.3 Достовірність

Справжній метод порівнювався з затвердженим референтним методом. Використовувалися зразки з низьким, середнім і високим вмістом вітаміну D (діапазон значень 9.5-200 нг/мл (ng/ml)). Загальна кількість зразків була 56. Було виведено рівняння лінійної регресії і був розрахований коефіцієнт кореляції для даного методу в порівнянні з референтним методом. Отримані дані наведені в таблиці 4.

**ТАБЛИЦЯ 4**

Метод	Середнє (x)	Рівняння регресії	Коефіцієнт кореляції
Даний метод (Y)	52.08	$y = 1.02x + 1.33$	0.918
Метод порівняння (X)	49.98		

#### 14.4 Специфічність

Перехресні реакції антитіл до 25-ОН Вітаміну D з різними речовинами оцінювалися додаванням речовин, що інтерферують, в сироватку в різних концентраціях. Крос-реактивність розраховувалася як відношення між дозою інтерферуючої речовини і дозою 25-ОН Вітаміну D, необхідного для заміщення цієї кількості речовини.

**ТАБЛИЦЯ 5**

Речовина	Перехресна реактивність
25-ОН Вітамін D2	1.0000
25-ОН Вітамін D3	1.0000
Вітамін D2	0.0076
Вітамін D3	0.0039
D2 Активний 1,3,25-гідрокси вітамін D2	1.9000
D3 Активний 1,3,25-гідрокси вітамін D3	1.1500



**ВИРОБНИК**

<i>MONOBIND INC.</i>	<i>МОНОБАЙНД ІНК</i>
<i>100 North Pointe Dr.</i>	<i>100 Норд Поїнт Драйв</i>
<i>Lake Forest, CA 92630 - USA</i>	<i>Лейк Форест, Каліфорнія 92630 - США</i>
<i>Phone: 949.951.2665</i>	<i>Тел.: 949.951.2665</i>
<i>Fax: 949.951.3539</i>	<i>Факс: 949.951.3539</i>
<a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a>	<a href="http://www.monobind.com">www.monobind.com</a>



**УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК**

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

