



**Инструкция
пользователя**



25-ОН Витамин D ИФА



EIA-5396



96 лунок

Внимание!!!

По независящим от нас причинам, в тексте данного перевода возможны несоответствия с действительной версией инструкции пользователя. Во избежание искажения результатов анализа настоятельно рекомендуется сверять данный перевод с инструкцией, вложенной в набор, уделяя особое внимание составу набора и процедуре постановки.

1 ВВЕДЕНИЕ**1.1 Наименование и назначение**

Набор 25-ОН Витамин D ИФА предназначен для количественного определения общего 25-ОН Витамин D (Витамин D₂ и витамин D₃) ИФА в сыворотке или плазме (человека).

2 ПРИНЦИП АНАЛИЗА

25-ОН Витамин D ИФА - тест для твердофазного иммуноферментного анализа, основанный на принципе конкурентного связывания.

На первом этапе, образцы должны быть предварительно обработаны в отдельных пробирках с денатурирующим буфером для извлечения аналита, так как большая часть циркулирующего 25-ОН Витамина D связана в крови с VDBP (Белок связывающий Витамин D) в естественных условиях. После нейтрализации добавляются биотинилированный 25-ОН витамин D (ферментный конъюгат) и меченый пероксидазой стрептавидин (ферментный комплекс). После аккуратного перемешивания раствор переносится в лунки микропланшета. Эндогенный 25-ОН витамина D из образца конкурирует с биотинилированным 25-ОН-витамином D₃ за связывание с VDBG, который сорбирован в лунках микропланшета. Связанный 25-ОН витамин D обнаруживается с помощью ферментного комплекса. Для этого проводят инкубацию с последующей стадией промывки для удаления несвязанных компонентов. Цветную реакцию начинают добавлением субстрата фермента и останавливают после определенного времени. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации 25-ОН витамина D в образце.

3 ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

1. Данный набор предназначен только для in vitro диагностики и профессионального использования.
2. Все реагенты этого набора, которые содержат сыворотку или плазму человека, были протестированы и показали отрицательный результат на HIV I/II, HBsAg и HCV по методам одобренным FDA. Однако не существует методов, гарантирующих полное отсутствие этих веществ. Поэтому, все продукты человеческой крови, включая образцы сыворотки, должны считаться потенциально опасными.
3. Перед началом исследования прочитайте инструкцию полностью и внимательно. Используйте действительную версию инструкции, приложенную к набору. Убедитесь, что вам все понятно.
4. Микротитровальная плашка содержит делимые стрипы. Неиспользованные лунки должны храниться при 2 °C - 8 °C в пакете из фольги и использоваться с поставляемой рамкой.
5. Пипетирование образцов и реагентов должно осуществляться как можно быстрее и с одинаковыми временными интервалами.
6. Используйте резервуары только для одного компонента. Это особенно важно для резервуаров с субстратом. Использование для разлива субстрата емкости, которая прежде использовалась для раствора конъюгата, может привести к изменению цвета раствора. Не сливайте реагенты обратно во флаконы, поскольку это может привести к контаминации реагентов.
7. Для получения достоверных результатов тщательно перемешивайте содержимое лунок. Не используйте стрипы повторно.
8. Не позволяйте лункам высохнуть во время анализа; добавьте реагенты сразу после промывки.
9. Перед анализом доведите все компоненты до комнатной температуры (21-26°C). Температура влияет на показания абсорбции. Тем не менее, не будет влияния на образцы пациентов.
10. Никогда не пипетируйте ртом и избегайте контакта реагентов и образцов с кожей и слизистыми.
11. Нельзя есть, пить, курить или наносить косметику в месте работы с реагентами.
12. Надевайте одноразовые перчатки при раскапывании образцов и реагентов.
13. Работа с реагентами должна проводиться в соответствии с процедурами, утвержденными соответствующим управлением биологической безопасности и регулирования.
14. Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на этикетке.
15. Все указанные объемы должны соблюдаться в соответствии с инструкцией. Оптимальные результаты возможны только при использовании калибровочных пипеток и микропланшетного ридера.

16. Не смешивайте и не используйте компоненты из различных лотов. Рекомендуется не менять лунки разных плашек даже одного лота. Наборы могут транспортироваться или храниться в разных условиях и в результате характеристики связывания у плашек могут отличаться.
17. Избегайте контакта со стоп раствором – 0.5M H₂SO₄; 1M HCL. Это может вызвать раздражения кожи или ожоги.
18. Некоторые реагенты содержат Проклин 300, БНД и/или МИТ в качестве консервантов. В случае их контакта с глазами или кожей, промойте этот участок водой.
19. Раствор субстрата ТМБ оказывает раздражающий эффект на коже и слизистых. В случае контакта, промойте глаза с большим объемом воды и кожу с мылом и большим количеством воды. Промойте загрязненные объекты перед повторным использованием. В случае вдыхания реагентов, выведите человека на свежий воздух.
20. Химикаты и готовые и использованные реагенты должны быть утилизированы как биологически опасные в соответствии с региональными нормами.
21. Информацию об опасных реагентах, используемых в этом наборе, вы можете найти в Паспорте безопасности. Он также доступен по запросу в ДРГ.

4 РЕАГЕНТЫ

4.1 Реагенты, входящие в набор

1. **Микропланшет**, 12 x 8 (делимые) стрипы, 96 лунок; В лунках микропланшета сорбирован VDBP (Белок связывающий Витамин D)
2. **Стандарты**, (0-5), 6 флаконов по 1 мл, готовых для использования.
Концентрации 0 – 4 – 10 – 25 – 60 – 130 нг/мл.
Коэффициент пересчета: 1 нг/мл = 2,5 нмоль/л.
Стандарты откалиброваны против NIST Standard Reference Material (SRM) 2972.
Содержат безртутный консервант.
3. **Контроли: высокий и низкий**, 2 флакона по 1 мл каждый, готовы для использования.
Значения и диапазоны смотрите на этикетке флакона или паспорте качества
Содержат безртутный консервант.
4. **Денатурирующий буфер**, 1 флакон, 10 мл, готовый для использования.
5. **Нейтрализующий буфер**, 1 флакон, 25 мл, готовый для использования.
Содержит безртутный консервант.
6. **Ферментный конъюгат**, 1 флакон, 7 мл, готовый для использования. Биотинилированный 25-ОН Витамин D.
Содержит безртутный консервант.
7. **Ферментный комплекс**, 1 флакон, 7 мл, готовый для использования.
Конъюгат стрептавидин-пероксидаза хрена.
Содержит безртутный консервант.
8. **Раствор субстрата**, 1 флакон, 25 мл, готовый для использования. Тетраметилбензидин (ТМБ).
9. **Стоп-раствор**, 1 флакон, 14 мл, готовый для использования.
Содержит 0,5 M H₂SO₄
Избегать контакта со стоп-раствором. Может вызвать ожоги и раздражение кожи.
10. **Промывочный Раствор**, 1 флакон, 30 мл (40X).
См. «Приготовление Реагентов».
11. **Адгезивная пленка для микропланшета**, 1 шт.

Внимание: Дополнительный Нулевой Стандарт для разведения образцов доступен по запросу.

4.2 Дополнительные материалы и приборы:

- Флаконы для денатурации VDBP и освобождения 25-ОН Витамина D
- Инкубатор 37 °C
- Микротитровальный ридер (450 ± 10 nm) (напр. Микротитровальный ридер DRG Instruments).
- Калибровочные микропипетки различного объема.
- Абсорбирующая бумага.
- Дистиллированная или деионизированная вода
- Таймер
- Бумага для построения кал.кривой или программное обеспечение для обработки данных

4.3 Хранение и стабильность реагентов

При хранении при $2^{\circ} \div 8^{\circ}\text{C}$ не вскрытые реагенты сохраняют активность до истечения срока годности. Не использовать реагенты по истечении срока годности.

Открытые реагенты хранить при $2^{\circ} \div 8^{\circ}\text{C}$. Микротитровальные лунки хранить при $2^{\circ} \div 8^{\circ}\text{C}$. После использования части лунок необходимо хранить оставшиеся лунки в герметично закрытой упаковке.

Открытый набор сохраняет активность в течение 2 месяцев при условиях хранения описанных выше.

4.4 Приготовление реагентов

Перед использованием доведите все реагенты и необходимое количество стрипов до комнатной температуры.

Промывочный раствор:

Добавьте деионизированную воду к 40х концентрату Промывочного раствора.

Разведите 30 мл. концентрированного Промывочного раствора в 1170 мл. деионизированной воды до полного объема 1200 мл. Разведенный Промывочный раствор стабилен 2 недели при комнатной температуре.

4.5 Утилизация набора

Утилизация набора должна проводиться в соответствии с национальными регламентами. Специальная информация есть в Паспорте Безопасности.

4.6 Повреждение Набора

В случае серьезного повреждения набора или его компонентов, ДРГ должно быть проинформировано в письменной форме, самое позднее в течение 1 недели после получения набора. Поврежденные компоненты не могут быть использованы в постановках. Они должны храниться в холодильнике до финального решения. После этого они должны быть утилизированы в соответствии с официальными нормами.

5 ЗАБОР И ХРАНЕНИЕ ОБРАЗЦОВ

В этом исследовании могут использоваться сыворотка или плазма (ЭДТА, гепариновая или цитратная).

Не использовать сильно гемолизированные, гиперлипидные и мутные образцы.

Обратите внимание: образцы содержащие азид натрия не могут использоваться с этим набором.

5.1 Забор образцов

Сыворотка:

Соберите кровь венопункцией, дайте свернуться и отделите сыворотку центрифугированием при комнатной температуре. Не центрифугируйте до полного свертывания крови. У образцов пациентов с антикоагулянтной терапией на свертывание может потребоваться больше времени.

Плазма:

Цельная кровь забирается в центрифужные пробирки, содержащие антикоагулянт, и немедленно центрифугируется.

5.2 Хранение и Подготовка образцов

Образцы могут храниться до 3 дней при $2 - 8^{\circ}\text{C}$ перед исследованием.

В случае более длительного промежутка времени до исследования образцы должны храниться при -20°C (до 2 месяцев). Перед исследованием размороженные образцы следует несколько раз перевернуть. Избегайте повторного замораживания / размораживания.

5.3 Разведение образцов

Если во время начального анализа обнаружили, что концентрация образца выше самого высокого стандарта, образец необходимо развести Нулевым Стандартом, и исследовать повторно согласно процедуре Анализа.

Для расчета концентрации необходимо учитывать фактор разведения.

Например:

А) разведение 1:10 10 мкл сыворотки + 90 мкл Нулевого Стандарта (тщательно смешайте)

Б) разведение 1:100 10 мкл разведенной сыворотки А) 1:10 + 90 мкл Нулевого Стандарта (тщательно смешайте)

6 ПРОЦЕДУРА АНАЛИЗА

6.1 Общие замечания

- Все реагенты и образцы должны быть комнатной температуры. Все реагенты должны быть смешаны без образования пены
- После начала процедуры, все шаги должны быть проведены без остановки.
- Используйте новые пластиковые насадки для дозатора для каждого стандарта, контроля и образца для предотвращения контаминации
- Поглощение это функция времени инкубации и температуры. Перед началом анализа рекомендуется подготовить все реагенты, снять все крышки и закрепить необходимое количество стрипов в держателе. Это позволит придерживаться одинакового времени между пипетированием.
- Как обычно ферментная реакция линейно пропорциональна времени и температуре.

6.2 Процедура анализа

Каждая постановка теста должна включать стандартную кривую

Все стандарты, образцы и контроли следует ставить в дублях. Условия для стандартов, образцов и контролей должны быть идентичны.

6.2.1 Пробоподготовка

1. Закрепить необходимое количество пробирок или лунок (без антител), необходимых для извлечения 25-ОН Витамина D (соответствующие пробирки и стрипы не входят в состав набора).
2. Поместить **25 мкл каждого стандарта, контроля и образца** в пробирки или лунки микропланшета, используя новые наконечники для дозатора.
3. Добавить **50 мкл денатурирующего буфера** в каждую пробирку или лунку.
4. Закрыть пробирки или лунки фольгой и инкубировать **30 мин** при температуре **37 °С**.
5. Добавить **200 мкл нейтрализующего буфера** в каждую пробирку или лунку.
6. Внести **50 мкл ферментного конъюгата** в каждую пробирку или лунку.
7. Добавить **50 мкл ферментного комплекса** в каждую пробирку или лунку.
8. Тщательно перемешать в течение 10 секунд. Важно добиться полного перемешивания на этом этапе. Для постановки теста использовать **200 мкл** смеси.

6.2.2 ИФА

1. Установить необходимое количество микротитровальных лунок в рамке держателя.
2. Поместить по **200 мкл смеси**, полученной на этапе пробоподготовки (6.2.1) в соответствующие лунки.
3. Закрыть лунки фольгой и инкубировать **60 мин** при **37 °С**.
4. Резко вытряхнуть содержимое планшета после инкубации.

Промыть лунки **4 раза** разведенным Промывочным раствором (**300 мкл** на лунку). Резко постучать плашкой по абсорбирующей бумаге (не входит в состав набора), чтобы удалить остатки влаги.

Важное замечание:

Чувствительность и воспроизводимость теста зависит от качества промывки на этом этапе.

5. Добавить **200 мкл раствора субстрата** к каждой лунке, соблюдая временные интервалы.
6. Инкубировать **15 минут** при комнатной температуре.

7. Остановить ферментную реакцию, добавив **100 мкл Стоп-раствора** к каждой лунке.
8. Определить величины абсорбции для каждой лунки при 450 ± 10 нм в течение 10 минут после внесения Стоп-раствора.

6.3 Подсчет результатов

1. Рассчитать средние значения абсорбции для каждого набора стандартов, контролей и образцов.
2. Построить стандартную кривую: отложить значения абсорбции каждого стандарта напротив их концентраций, абсорбции - на оси Y, концентрации - на оси X.
3. Используя среднее значение абсорбции образцов пациентов определить соответствующую концентрацию по стандартной кривой.
4. Автоматизированный метод: результаты данной инструкции были посчитаны с использованием подгонки кривой по 4-параметрической логистической функции (4 PL). 4 PL – это предпочтительный метод. Другие методы обработки данных могут дать отличный (от данного) результат.
5. Концентрации образцов можно считать прямо с данной стандартной кривой. Образцы с концентрацией выше, чем максимальный стандарт, необходимо разбавить или обозначить концентрацию как >130 нг/мл. При подсчете результатов необходимо учитывать кратность разведения.

6.3.1 Пример стандартной кривой

Следующие данные приведены только для демонстрации и не могут использоваться для получения результатов во время анализа.

Стандарт	Поглощение (450 нм)
Стандарт 0 (0 нг/мл)	2,13
Стандарт 1 (4 нг/мл)	1,91
Стандарт 2 (10 нг/мл)	1,63
Стандарт 3 (25 нг/мл)	1,12
Стандарт 4 (60 нг/мл)	0,57
Стандарт 5 (130 нг/мл)	0,24

7 ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

Для каждой лаборатории рекомендуется устанавливать свои собственные нормальные и ненормальные значения.

В исследовании, проведенном на нормальных здоровых взрослых людях, используя набор DRG ELISA, были получены следующие данные:

Обследуемые	Кол-во	Возврат (лет)	Средний возраст	Средняя конц. (нг/мл)	5% Перцентиль (нг/мл)	95% Перцентиль (нг/мл)
Мужчины	77	14 – 79	58	26,1	11,7	46,8
Женщины	82	17 - 79	55	30,2	14,3	56,9

Образцы были собраны в сентябре.

Результаты анализа не могут быть единственной причиной терапевтического заключения. Результат должен коррелировать с другими клиническими исследованиями и диагностическими тестами.

В литературе рекомендуют следующую классификацию статуса Витамина Д:

Статус Витамина Д	25-ОН Витамин Д (нг/мл)	25-ОН Витамин Д (нмоль/л)
Отсутствие/дефицит	<10	<25
Недостаточность	10-29	25-72,5
Достаточность	30-100	75-250
Токсичность	>100	>250

8 КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА

- Лабораторная практика требует, чтобы контроль ставили для каждой калибровочной кривой. Статистически значимое число контролей должно быть проанализировано, чтобы установить средние значения и приемлемые диапазоны для обеспечения нормального режима работы лаборатории.
- Рекомендуется использовать контрольные образцы в соответствии с государственными и федеральными нормами.
- Постановка контрольных образцов рекомендуется для обеспечения повседневной достоверности результатов.
- Ставьте контроли с нормальными и патологическими уровнями.
- Контроли и соответствующие им результаты, полученные Лабораторией Контроля Качества, указаны в Паспорте Качества, приложенном к набору. Значения и диапазоны, указанные на листе КК всегда относятся к текущему лоту набора и должны использоваться для прямого сравнения результатов.
- Также рекомендуется использовать национальные или международные программы оценки качества для того, чтобы обеспечить точность результатов. Используйте соответствующие статистические методы для анализа контрольных значений и тенденций. Если результаты анализа не соответствуют установленным приемлемым диапазонам контрольных материалов, результаты пациента должны быть признаны недействительными. В этом случае, пожалуйста, проверьте следующие технические параметры: пипетирование и таймеры; фотометр, срок годности реагентов, условия хранения и инкубации, аспирацию и методы промывки.
- После проверки указанных выше элементов, не найдя ошибок, свяжитесь с вашим дистрибьютором или ДРГ напрямую.

9 ХАРАКТЕРИСТИКИ АНАЛИЗА

9.1 Динамический диапазон исследования

Диапазон данного исследования составляет **2,89 – 130 нг/мл**

9.2 Специфичность антител (кросс-реактивность)

Следующие субстанции были протестированы на наличие кросс-реакции:

25-ОН Витамин Д ₃ :	100,0 %
25-ОН Витамин Д ₂ :	74,7 %
1,25 (ОН) ₂ Витамин Д ₃ :	<0,1 %
Витамин Д ₃ :	3,6%

9.3 Чувствительность

Аналитическая чувствительность была подсчитана с помощью среднего значения + 2 стандартных отклонения двадцати повторных анализов нулевого стандарта = < **2,89 нг/мл**.

9.4 Коэффициент вариации (CV)

9.4.1 Интра-анализ

Вариабельность внутри одной постановки:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	25.1	4.4
2	20	43.2	3.0
3	20	93.7	6.6

9.4.2 Интер-анализ

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	40	23.7	9.9
2	40	47.8	10.7
3	40	64.2	8.6

9.5 Воспроизведение

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [IU/mL]		60.5	36.4	82.6
Average Recovery		105.2	104.1	92.5
Range of Recovery [%]	from	96.9	92.9	88.2
	to	111.3	112.4	94.1

9.6 Линейность

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration [IU/mL]		104.8	69.4	88.7
Average Recovery		114.8	104.6	98.4
Range of Recovery [%]	from	105.7	85.8	94.7
	to	109.2	97.8	103.3

10 ОГРАНИЧЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Надежные и воспроизводимые результаты будут получены, если процедура осуществляется с полным пониманием приложенной инструкции и с соблюдением надлежащей лабораторной практики. Любое неправильное обращение с образцами или модификация данного теста могут повлиять на результаты.

10.1 Интерферирующие вещества

Гемоглобин (до 4 мг/мл), билирубин (до 0,5 мг/мл) и триглицериды (до 30 мг/мл) не влияют на результаты исследования.

10.2 Влияние медикаментов

На сегодняшний день неизвестны медикаменты, которые имеют влияние на измерение 25-ОН Витамина в образце.

10.3 Хук-Эффект

В этом анализе хук-эффект не обнаружен.

11 ПРАВОВЫЕ АСПЕКТЫ**11.1 Достоверность результатов**

Тест должен быть выполнен в соответствии с инструкциями изготовителя по применению. Кроме того, пользователь должен строго придерживаться правила GLP (хорошей лабораторной практики) или других применимых национальных стандартов и / или законов. Это особенно актуально для использования контрольных реагентов. Важно всегда включать, в рамках проведения анализа, достаточное количество

контролей для проверки достоверности и точности теста.

Результаты действительны, только если все контроли находятся в пределах заданного диапазона, и, если все остальные параметры теста, также в рамках данных характеристик анализа. В случае каких-либо сомнений, пожалуйста, свяжитесь с ДРГ.

11.2 Терапевтические заключения

Терапевтические заключения никогда не должны быть основаны только на результатах лабораторных анализов, даже если результаты всех тестов находятся в согласии, как указано в пункте 11.1. Любой лабораторный результат только часть общей клинической картины пациента.

Только в тех случаях, когда результаты лабораторных исследований соответствуют общей клинической картине, может быть сделано терапевтическое заключение.

Результат теста никогда не должен быть единственным определяющим фактором для получения любого терапевтического заключения.

11.3 Ответственность

Любое изменение набора и / или обмен или замена каких-либо компонентов разных партий из одного набора на другой может негативно сказаться на ожидаемых результатах и обоснованности анализа вообще. В случае таких изменений и / или замен любое требование о замене набора недействительно. Претензии, поданные в связи с неверной интерпретацией результатов анализа клиентом, в соответствии с пунктом 11.2. также недействительны.

Несмотря на это, в случае каких-либо претензий, ответственность производителя не должна превышать стоимость набора. Вред, причиненный набору при транспортировке, не подлежит ответственности производителя.

12 ЛИТЕРАТУРА

1. Armas LAG., Hollis M., Heaney RP. Vitamin D₂ is much less effective than vitamin D₃ in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(11) 5387-91.
2. Houghton LA., Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement. *Am. J. Nutr.* 2006; 84, 694-97.
3. Holick M. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 2002; 9(1) 87-98.
4. Pilz S. et al. Vitamin D: clinical implications beyond musculoskeletal diseases. *J. Lab. Med.* 2011; 35(4) 211-16.
5. Visser M. et al. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84(3) 616-22.
6. Souberbielle JC. Et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev.* 2010; 9 709-15.