

НАБІР ІФА

ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО 25-ГІДРОКСИВІТАМІНУ

КАР1971, 25ОН Vitamin D Total ELISA

Каталог. №: **КАР1971**

Методика від 12-05-2014

Кількість : **96**

Виробник : **DIAsource (Бельгія)**



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

I. ПРИЗНАЧЕННЯ

Імуноферментний аналіз для кількісного in-Vitro визначення 25-гідроксिवітаміну D2 і D3 (25ОН-D2 і 25ОН-D3) в сироватці крові.

III. КЛІНІЧНА ІСТОРІЯ (Див. оригінал інструкції).

IV. ОСНОВИ МЕТОДУ

Даний аналіз являє собою твердофазний імуноферментний аналіз, який виконується на титраційних мікропланшетах. Під час перших 2 годин стадії інкубації, при кімнатній температурі, загальний 25ОН Вітамін D (D2 і D3), присутній в калібраторах, контролях і зразках, дисоціює зі зв'язаних білків сироватки, щоб зафіксуватись на сайтах зв'язування специфічних моноклональних антитіл. Після 1 стадії промивки фіксована кількість 25ОН Вітаміну D, міченого біотином в присутності пероксидази хрому (HRP), конкурує з неміченим 25ОН вітаміном D2 і 25ОН вітаміном D3, присутніх на сайтах зв'язування специфічного моноклонального антитіла. Після 30 хвилин інкубації при кімнатній температурі мікротитраційний планшет промивають, щоб зупинити реакцію конкуренції. Додається хромогенний розчин (ТМБ) і інкубується протягом 15 хвилин. Реакцію зупиняють додаванням стоп-розчину і знімають показники мікротитраційного планшета при відповідній довжині хвилі. Кількість перетворення субстрату визначається колориметричним шляхом вимірюванням оптичної щільності, яка обернено пропорційна концентрації загального 25ОН вітаміну D (D2 і D3).

Будується калібрувальна крива і визначаються концентрації загального 25ОН Вітаміну D (D2 і D3) зразків шляхом інтерполяції дози з калібрувальної кривої.

V. РЕАГЕНТИ, ЩО ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Реагенти	Набір на 96 тестів	Кольоровий код	Відновлення
Мікротитраційний планшет (96 лунок) з анти 25 ОН Віт. D2 і D3 (моноклональні антитіла)	96 лунок	Синій	Готовий до використання
Калібратор 0: біологічна матриця з гентаміцином і прокліном	1 флакон, ліофілізований	Жовтий	Додати 2 мл дистильованої води
Калібратори 1-5 (див. точні значення на етикетках флаконів з реагентами) в кінській сироватці з гентаміцином і прокліном	5 флаконів, ліофілізований	Жовтий	Додати 1 мл дистильованої води
Контролі N = 2 в сироватці крові людини з прокліном	2 флакона, ліофілізований	Срібний	Додати 1 мл дистильованої води
Інкубаційний буфер з казеїном і прокліном	1 флакон 20 мл	Зелений	Готовий до використання
25 ОН Віт D Концентрований кон'югат	1 флакон 0.3 мл	Синій	Розвести 100 х з буфером кон'югату
Кон'югатний буфер з казеїном і прокліном	1 флакон 30 мл	Червоний	Готовий до використання
Концентрований HRP	1 флакон 0.2 мл	Жовтий	Розвести 200 х з буфером кон'югату
Промивний розчин (Тріс-НСІ)	1 флакон 10 мл	Коричневий	Розвести 200 х з буфером кон'югату (використовувати магнітну мішалку)

Хромогенний Розчин ТМБ (Тетраметилбензидин)	1 флакон	Коричневий	Готовий до використання
Стоп-розчин НСІ 1М	1 флакон		Готовий до використання

Примітка: Використовуйте калібратор 0 для розведення зразків зі значеннями вище найвищого калібратора.

Жоден міжнародний довідковий матеріал не доступний.

VI. Приладдя, що не поставляється

Наступні матеріали є необхідними, але в комплекті не надаються:

1. Дистильована вода
2. Піпетки на: 50 мкл, 150 мкл, 200 мкл і 1 мл (використання точної піпетки з одноразовими пластиковими наконечниками рекомендується)
3. Вортекс
4. Магнітна мішалка
5. Шейкер (300 – 700 об./хвилину)
6. Вошер для мікротитровальних пластин
7. Рідер здатний читати на довжині хвилі 450 нм і 650 нм (біхроматичне зчитування)

VII. ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

- A. Калібратор 0: Відновити Калібратор 0 з 2 мл дистильованої води.
- B. Калібратори 1-5: Відновити Калібратори 1-5 з 1 мл дистильованої води.
- C. Контролі: Відновити Контролі з 1 мл дистильованої води.
- D. Робочий розчин HRP кон'югату:

!Робочий розчин HRP кон'югату повинен бути підготовлений протягом інкубації і мінімум за 1 годину 45 хвилин до його використання.

Підготуйте достатній об'єм робочого розчину HRP кон'югату шляхом змішування концентрованого кон'югату, концентрованого HRP і буфера кон'югату відповідно до кількості використовуваних смуг, як показано в таблиці нижче: наприклад, для 6 смужок (48 лунок): 100 мкл концентрованого кон'югату і 50 мкл концентрованого HRP до 10 мл буфера кон'югату.

Використовуйте вортекс для гомогенізації.

До його використання зберігати робочий HRP кон'югат при кімнатній температурі і уникати прямих сонячних променів або використовуйте коричневий скляний флакон для його підготовки.

Отриманий робочий HRP кон'югат не стабільний і повинен бути знищений, якщо не використовується.

Кількість смужок	Об'єм Концентрованого Кон'югату (мкл)	Об'єм Концентрованого HRP (мкл)	Об'єм Кон'югатного Буфера (мл)
1	30	15	3
2	50	25	5
3	60	30	6
4	80	40	8
5	90	45	9
6	100	50	10
7	120	60	12
8	140	70	14
9	160	80	16
10	180	90	18
11	200	100	20
12	220	110	22

- E. Промивний Робочий Розчин: Підготувати необхідний об'єм Промивного Робочого Розчину шляхом додавання 199 частин дистильованої води на 1 частину Промивного Розчину (200x). Використовуйте магнітну мішалку для гомогенізації. Знищити невикористаний Промивний Робочий Розчин в кінці дня.

VIII. ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ РЕАГЕНТІВ

- Перед відкриттям або відновленням всі компоненти набору є стабільними до закінчення терміну придатності, зазначеному на етикетці, якщо зберігаються при 2-8 °С.
- Після відновлення калібратори і контролі стабільні протягом восьми тижнів при 2-8 °С. Для більш тривалого зберігання приготувати аліквоти і зберігати їх при -20 °С протягом не більше 4 місяців. Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.
- Свіжоприготовлений Промивний Робочий Розчин слід використовувати в той же день.
- Зміни у зовнішньому вигляді реагентів комплексу можуть свідчити про нестабільність або погіршення.

IX. ЗАБІР І ПІДГОТОВКА ЗРАЗКІВ

- Цей набір призначений для використання зразків сироватки.

- Зразки сироватки повинні зберігатися при температурі 2-8 °С.
- Якщо тест не виконується протягом 24 годин рекомендується проводити забір зразків і їх зберігання при температурі -20 °С.
- Уникайте повторних циклів заморожування-відтавання.

X. ПРОЦЕДУРА ПРОВЕДЕННЯ ТЕСТУ

A. Зауваження по роботі

Не використовуйте набір або його компоненти з вичерпаним терміном придатності.

Не змішуйте матеріали різних наборів.

Приведіть всі реагенти до кімнатної температури перед використанням.

Ретельно перемішайте всі реагенти і зразки обережним перемішуванням або обертанням.

Аналізуйте калібратори, контролю і зразки у двох примірниках.

Вертикальне вирівнювання рекомендується.

Використовуйте чистий пластиковий контейнер для приготування Розчину для Промивання.

Щоб уникнути перехресного забруднення, використовувати чисті одноразові піпетки для додавання кожного реагенту і зразка.

Для дозування Хромогенного Розчину і Стоп-Розчину уникнути використання піпеток з металевими частинами.

Високоточні піпетки або автоматизоване обладнання для піпетування дозволять поліпшити точність.

Дотримуйтесь часу інкубації.

Щоб уникнути затримки, час між піпетуванням першого калібратора і останнього зразка повинен бути обмежений часом, вказаним в розділі XIII пункт E (затримка часу).

Побудувати калібрувальну криву для кожного запуску, не використовуйте дані з попередніх запусків.

Вносити Хромогенний Розчин протягом 15 хвилин після миття мікротитраційного планшета.

Під час інкубації з Хромогенним Розчином уникати прямих сонячних променів на мікротитраційному планшеті.

B. Процедура

1. Виберіть необхідну кількість смужок для аналізу. Невикористані стрипи повинні бути запечатані в пакет з осушувачем і зберігатися при температурі 2-8 °С.
2. Закріпити смужки в тримачі.
3. Внести 50 мкл кожного калібратора, контролю та зразка у відповідні лунки.
4. Внести 150 мкл Буфера для Інкубації в кожну з лунок.
5. Інкубувати протягом 2 годин при кімнатній температурі на планшетному шейкері (300-700 об./хвилину)
Підготуйте Робочий розчин HRP кон'югату під час інкубації і мінімум за 1 годину 45 хвилин до його використання.
6. Відібрати рідину з кожної лунки.
7. Промити пластину 3 рази:
 - внесенням 0.35 мл Розчину для Промивання в кожну лунку
 - аспірацією вмісту кожної лунки
8. Піпетувати 200 Мкл Робочого розчину кон'югату HRP в кожну лунку мікротитраційного планшета. Інкубувати протягом 30 хвилин при кімнатній температурі на планшетному шейкері (300-700 об./хвилину).
9. Відібрати рідину з кожної лунки.
10. Промити пластину 3 рази:
 - внесенням 0.35 мл Розчину для Промивання в кожну лунку
 - аспірацією вмісту кожної лунки
11. Внести 100 мкл Хромогенного Розчину в кожну лунку протягом 15 хвилин після стадії промивки.
12. Інкубувати мікропланшет протягом 15 хвилин при кімнатній температурі на шейкері (300-700 об./хвилину), уникати прямих сонячних променів.
13. Внести 100 мкл Стоп-Розчину в кожну лунку.
14. Зчитати оптичну при 450 нм (референсний фільтр 630 нм або 650 нм) протягом 1 години і розрахувати результати, як описано в розділі XI.

XI. РОЗРАХУНОК РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Зчитати планшет при 450 нм проти контрольного фільтру, встановленого на 650 нм (або 630 нм).
2. Розрахуйте середнє двох визначень.
3. Ми рекомендуємо використовувати комп'ютерні програми для побудови калібрувальної кривої. 4-параметрова логістична крива є найбільш підходящим методом. Відхилити очевидні значення, які випадають за межі.
4. Інтерполяцією значень ОЩ зразків визначити концентрації 25ОН Вітаміну D зразків за калібрувальною кривою.

XII. ТИПОВІ ДАНІ

Наступні дані призначені тільки для ілюстрації і не повинні бути використані замість реальних значень калібрувальної кривої.

Набір 25OH-ELISA		Одиниці ОЩ
Калібратор	0 нг/мл	2.66
	5.3 нг/мл	2.39
	15.0 нг/мл	1.83
	25.7 нг/мл	1.46
	54.3 нг/мл	0.81
	133 нг/мл	0.21

Примітка: 1 нг/мл = 2.5 пмоль/мл

XIII. ТЕХНІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ І ОБМЕЖЕННЯ

A. Межі виявлення

Межа Бланку (LoB), Межа виявлення (LoD) і межа кількісного визначення (LoQ) були визначені відповідно до CLSI керівництв EP17-A.

LoB розраховували шляхом вимірювання Бланку кілька разів, і обчислення 95-й перцентилі розподілу контрольних значень. LoB була розрахована як 1.69 нг/мл.

LoD розраховували, як описано в директиві. LoD була розрахована як 2.81 нг/мл.

LoQ розраховували шляхом тестування 5 зразків низької якості 14 разів у різних тістах. LoQ була розрахована як 4.39 нг/мл з CV 20%.

B. Специфічність

Перехресна реактивність даного тесту визначали шляхом тестування сироватки з насиченими і ненасиченими перехресними реагентами. Результати наведені в наступній таблиці:

(Див. оригінал інструкції).

Оцінювали ефект потенційних речовин, що впливають на зразки, з використанням даного набору. Різні рівні Гемоглобіну, Тригліцеридів, Вітаміну С, Білірубину кон'югованого і некон'югованого і Zemplar в зразках сироватки були проаналізовані на зразках з різними концентраціями 25ОН Вітаміну D. Наші прохідним критерієм було перехресна реактивність менше 10%. Тестовані речовини не впливають на продуктивність даного набору.

(Табличку Див. оригінал інструкції).

C. Точність

Точність аналізу була розрахована шляхом запуску зразків на протязі принаймні 20 днів в 3 різних партіях. Результати наведені в таблиці нижче:

(Див. оригінал інструкції).

D. Відтворюваність

Відтворюваність аналізу було оцінено шляхом тестування трьох зразків у двох примірниках протягом п'яти днів, два рази на день, на трьох ділянках з двома техніками на кожній ділянці. Середні результати наведені в таблиці нижче:

(Див. оригінал інструкції).

E. Точність

Відновлення оцінювали шляхом додавання різних рівнів 25ОН вітаміну D в зразки. Результати наведені в таблиці нижче:

(Див. оригінал інструкції).

Два зразка з концентрацією в межах діапазону вимірювання були випробувані в еквідистантних розведеннях для визначення лінійного діапазону аналізу. Лінійний регресійний аналіз було проведено. Результати наведені в наступній таблиці:

(Див. оригінал інструкції).

Лінійний діапазон аналізу був встановлений як 7.7 нг/мл до 122.9 нг/мл.

F. Затримка в часі

Результати затримки в часі між внесенням останнього Калібратора і зразка представлені у наступній таблиці.

(Див. оригінал інструкції).

Результати аналізу залишаються точними навіть при внесенні інкубаційного буфера через 10 і 20 хвилин після внесення Калібратора в лунки.

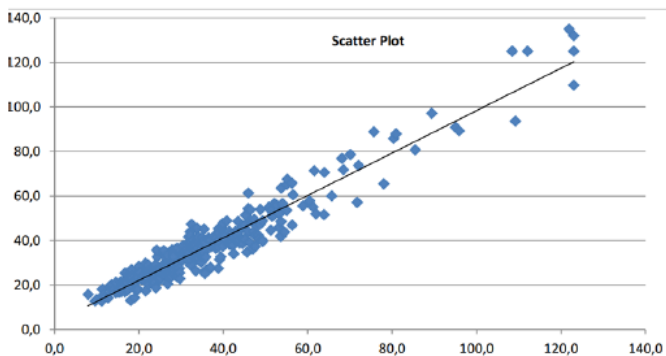
G. Обмеження методу

1. Тест є допомогою при діагностиці і повинен бути використаний в поєднанні з клінічними даними.
2. Робота цього аналізу не була перевірена в педіатрії.
3. Зразки, які імовірно містять концентрації вищі за значення найвищого калібратора, повинні аналізуватись в розведенні.
4. Гемолізовані зразки не повинні бути використані.

H. Порівняння методів

Продуктивність даного аналізу визначали шляхом проведення

кореляційного вивчення в трьох різних місцях з використанням в загальній кількості 356 зразків. Зразки були випробувані на обох, *DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA* тесті і комерційно доступному *25OH Вітамін D ELISA тесті*. Результати варіювалися від 8.0 нг/мл до 123.0 нг/мл, коефіцієнт кореляції між цими двома методами склав 0.917, з 95% довірчим інтервалом від 87.6% до 93.6%, нахил 0.954 і Y-перехоплення 3.05. Наступний графік демонструє узагальнені результати:



XIV. ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

- Якщо результати, отримані для Контролю 1 та/або Контролю 2 не в межах, зазначених на етикетці флакона, результати не можуть бути використані, якщо задовільного пояснення розбіжності не було дано.
- Кожна лабораторія може зробити свої власні пули контрольних зразків, які повинні бути збережені в аликвотах замороженими. Контролі, які містять азид, будуть впливати на ферментативну реакцію і не можуть бути використані.
- Прийнятні критерії для різниці між повторюваними результатами зразків повинні визначитися належною лабораторною практикою.
- Рекомендується аналізувати Контролі у звичайному порядку як невідомі зразки для вимірювання мінливості аналізу. Проведення аналізу повинно перевірятись відповідно до карт контролю якості.
- Необхідно візуально перевіряти криву апроксимації, вибрану за допомогою комп'ютера.

XV. ОЧІКУВАНІ ЗНАЧЕННЯ

Дієта, раса, сезон і вік, як відомо, впливають на нормальні рівні 25 OH Vit D3.

Кожна лабораторія повинна встановити свій власний діапазон залежно від місцевого населення.

Останніми дослідженнями запропоновано наступні діапазони для класифікації статусу 25OH вітаміну D:

Рівень	нг/мл
Дефіцитний	< 10
Недостатній	10-29
Достатній	30-100
Потенційна токсичність	> 100

Референтні діапазони були встановлені на основі аналізу 150 практично здорових осіб. Окремі зразки сироватки пацієнта, які використовувались, були отримані з сертифікованих комерційних джерел і були отримані від ліцензованого центру донорів FDA з інформованої згоди. 50 зразків були з Північної частини США (Пенсільванія), 50 зразків були з Центральної частини США (Теннесі), і 50 зразків були з Південної частини США (Флорида). Зразки були зібрані в зимові місяці (січень - березень), були у віці від 21-92 років і включали як світлошкіре так і темношкіре населення. Донори, в яких були відібрані зразки, не приймали добавки вітаміну D, не мали сімейну історію на захворювання паразитовидних залоз або кальційної регуляторної хвороби, не мали ніякої історії на захворювання нирок, печінки, паразитовидних залоз, кальцій захворювання або баріатричної хірургії. У наступній таблиці наводяться результати:

(Див. оригінал інструкції).

XVI. ЗАСТЕРЕЖЕННЯ ТА ПОПЕРЕДЖЕННЯ

Безпека

Тільки для діагностики in-Vitro.

Компоненти крові людини, які входять до цього набору, були протестовані методами, схваленими і затвердженими FDA і виявились негативним до HBsAg, анти-HCV, анти-ВІЛ-1 і 2. Немає відомих методів, які можуть дати повну гарантію, що похідні крові людини не будуть передавати гепатит, СНІД та інші інфекційні захворювання. Тому, роботу з реагентами, зразками сироватки

проводити у відповідності з місцевими правилами техніки безпеки.

Всі продукти тваринного походження і їх похідні були отримані від здорових тварин. Компоненти великої рогатої худоби походять з країн, де не було зареєстровано BSE. Тим не менш, компоненти, що містять речовини тваринного походження, повинні розглядатися як потенційно інфіковані.

Уникати контакту зі шкірою всіх реагентів; Стоп-Розчину містить HCl. У разі контакту ретельно промити водою.

Не курити, не пити, не їсти і не застосовувати косметику в робочій зоні. Не набирати ротом. Використовуйте захисний одяг і одноразові рукавички.



ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР

ТОВ «ДІАМЕБ»
вул. Чорновола, 97
м. Івано-Франківськ, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com