

# НАБІР РЕАГЕНТІВ

## 25ОН ЗАГАЛЬНИЙ ВІТАМІН D

### 25ОН Vitamin D total RIA

Кат. № : **EIA-5292**  
Кількість : **96**

Дата випуску інструкції: **03-2019**  
Версія **8.0**



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

#### 1 ПРИЗНАЧЕННЯ

Радіоімунний аналіз для *in vitro* кількісного вимірювання 25-гідроксिवітаміну D3 і D2 (25-ОН-D3 і 25-ОН-D2) в сироватці.

#### 2 КЛІНІЧНІ ПЕРЕДУМОВИ

Вітамін D є загальним терміном, який використовується для позначення вітаміну D3 або холекальциферолу та вітаміну D2 або ергокальциферолу. Люди природно виробляють вітамін D3, коли шкіра піддається впливу ультрафіолетових сонячних променів.

В основному в печінці, вітамін D3 метаболізується в 25-гідроксивітамін D3 (25-ОН-D3), який є основною формою вітаміну D, що циркулює в організмі. 25-ОН-D3 є попередником інших метаболітів вітаміну D і сам по собі має також обмежену активність.

Найбільш активним похідним є 1,25-гідроксивітамін D3, що продукується в нирці (або плаценті) за допомогою 1 $\alpha$ -гідроксилування 25-ОН-D3.

25ОН Вітамін D стимулює всмоктування кишечника як кальцію, так і фосфору, а також резорбції і мінералізації кісток.

25ОН Вітамін D також може бути активним в інших тканинах, які відповідають за транспортування кальцію (плаценти, нирки, молочні залози...) і ендокринні залози (паращитовидні залози, бета-клітини...).

Вітамін D3 і вітамін D2 також доступні при живанні через їжу або дієтичні добавки.

Оскільки, вітамін D2 метаболізується аналогічно вітаміну D3, обидва сприяють загальному статусу вітаміну D людини.

Це є причиною, чому дуже важливо вимірювати обидві форми вітаміну D 25ОН однаково для правильної діагностики дефіциту вітаміну D, недостатності або інтоксикації.

Дефіцит вітаміну D є важливим фактором ризику рахіту, остеомаляції, старечого остеопорозу, раку та результатів вагітності.

Вимірювання обох форм вітаміну D 25ОН також потрібно для визначення причини патологічних концентрацій кальцію у сироватці у пацієнтів.

Показано, що інтоксикація вітаміном D викликає пошкодження нирок і тканин.

#### 3 ПРИНЦИПИ МЕТОДУ

Спочатку калібратори, контролі та зразки (сироватка) інкубували з інкубаційним буфером безпосередньо в накритих пробірках протягом 2 годин при кімнатній температурі, на шейкері, для вивільнення вітаміну D3 25ОН і вітаміну D2 25ОН зі зв'язуючого білка вітаміну D (DBP).

Потім, без етапів промивання, до кожної пробірки додають фіксовану кількість <sup>125</sup>I міченого вітаміну D 25ОН, щоб конкурувати з вітаміном D3 25ОН і вітаміном D2 25ОН з зразків, контролів або калібраторів, для фіксованої кількості місць моноклональних антитіл, іммобілізованих до нижня і внутрішня поверхня пластикових трубок.

Після 1 години інкубації при кімнатній температурі на шейкері пробірок стадія аспірації припиняє реакцію конкуренції. Пробірки потім двічі промивали і знову аспірували. Калібрувальну криву побудували і загальна концентрація вітаміну D (D3 і D2) 25ОН в зразках визначається інтерполяцією дози з калібрувальної кривої.

#### 4 РЕАГЕНТИ, ЯКІ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Символ	Реагенти	96 тест-наборів	Розведення
ПРОБІРКИ	Пробірки покриті Mab анти 25ОН Vit D3 та D2	2 x 48	Готовий до використання
Ag <sup>125</sup> I	<sup>125</sup> Йодин позначений 25ОН Vit D (HPLC ступінь)	1 флакон 160 kBq ліофілізовані	Додайте 6 мл трейсер буфера
CAL 0	Калібратор 0: у конячій сироватці та	5 флаконів ліофілізовані	Додайте 0.5 мл дистильованої води

	фосфатному буфері з гентаміцином.		
CAL N	Калібратори 1-5 у конячій сироватці (див. конкретні значення на етикетках флаконів)	1 флакон ліофілізований	Додайте 0.5 дистильованої води
DIL SPE	Розчинник зразків у конячій сироватці	5 флаконів ліофілізованих	Додайте 1 мл дистильованої води
WASH SOLN CONC	Промивний розчин (TRIS-HC)	1 флакон ліофілізований	Розведіть 70 x з дистильованою водою (використовуйте магнітну мішалку)
CONTROL N	Контролі - N=2 У людській плазмі з Proclin	2 флакони ліофілізовані	Додайте 0.5 мл дистильованої води
TRACER BUF	Трейсер буфер з казеїном, гентаміцином та червоним барвником.	1 флакон 7 мл	Готовий до використання
INC BUF	Інкубаційний буфер з казеїном та Proclin	1 флакон 55 мл	Готовий до використання

**Примітка:** Використовуйте розчинник для розведення зразків, значення яких вищі за найвищий калібратор перед початком аналізу. Нема доступного референтного матеріалу.

#### 5 НЕ ПОСТАЧАЮТЬСЯ

Наступний матеріал необхідні, але не постачаються з набором:

1. Дистильована вода
2. Піпетки для: 25 мкл, 50 мкл, 500 мкл та 1 мл (рекомендується використання піпеток з одноразовими пластиковими наконечниками)
3. Вортексний міксер
4. Магнітна мішалка
5. Шейкер пробірок (від 300 до 700 об/хв)
6. 5 мл шприц, автоматичний для промивання (Cornwall)
7. Система аспірації
8. Можна використовувати будь-який гамма-лічильник, здатний до вимірювання 125I (мінімальний вихід 70%).

#### 6 ПІДГОТОВКА РЕАГЕНТІВ

##### А. Калібратори:

Розведіть калібратори 0.5 мл дистильованої води.

##### В. Контролі:

Розведіть контролі 0.5 мл дистильованої води.

##### С. Трейсер:

Розведіть ліофілізований трейсер приблизно 6 мл трейсер буфера.

##### Д. Розчинник зразка:

Розведіть ліофілізований розчинник 1 мл дистильованої води.

##### Е. Робочий промивний розчин:

Приготуйте відповідний об'єм Робочого промивного розчину додавши 69 обсягів дистильованої води до одного 1 обсягу промивного розчину (70x) Використовуйте магнітний змішувач, щоб гомогенізувати. Утилізуйте невикористаний Робочий промивний розчин наприкінці дня.

#### 7 ЗБЕРІГАННЯ ТА ТЕРМІН ПРИДАТНОСТІ РЕАГЕНТІВ

- Перед відкриттям або розведенням, всі компоненти наборів стабільні до закінчення терміну придатності, який вказано на етикетці, якщо зберігати при температурі 2°C - 8°C.
- Після розведення, калібратори та контролі стабільні протягом одного тижня при температурі 2°C - 8°C. Для довготривалого зберігання, аліквоти потрібно зробити та зберігати при температурі -20°C протягом 3 місяців. Уникайте подальших циклів розмороження-замороження.
- Свіжоприготовлений Робочий промивний розчин потрібно використати в той самий день.
- Після першого використання, трейсер стабільний, якщо зберігається в оригінальному добре закритому флаконі при температурі 4°C максимум протягом одного тижня або при температурі -20°C (з

одним розмороженням) до закінчення терміну придатності трейсера.

- Зміна фізичного вигляду реагентів набору може вказувати на нестабільність або погіршення.

## 8 ЗАБІР ТА ПІДГОТОВКА ЗРАЗКА

Цей набір підходить для зразків сироватки.

Зразки сироватки повинні зберігатися при температурі від 2 °C до 8 °C.

Якщо тест не запускається протягом 24 годин, рекомендується зберігати зразки при температурі -20 °C. Уникайте подальших циклів заморожування-розморожування.

## 9 ПРОЦЕДУРА

### 9.1 Примітки про обробку

- Не використовуйте набір або його компоненти після закінчення терміну придатності.
- Не змішуйте матеріали з різних лотів набору.
- Перед використанням доведіть усі реагенти до кімнатної температури.
- Ретельно перемішайте всі реагенти та зразки злегка збовтуючи або прокручуючи.
- Використовуйте чистий одноразовий наконечник для піпетки для додавання кожного окремого реагенту та зразка, щоб уникнути перехресного забруднення. Висока точність піпеток або автоматизованого обладнання для піпетки підвищить точність.
- Підготуйте калібрувальну криву для кожного запуску, не використовуйте дані з попередніх запусків.

### 9.2 Процедура

**Буфер для інкубації потрібно довести до кімнатної температури перед початком інкубації.**

1. Позначте покриті пробірки дублюють для кожного калібратора, контролю і зразка. Для визначення загальної кількості, позначте 2 звичайні пробірки.
2. Помістіть 25 мкл калібратора або контролю чи зразка.
3. Помістіть 500 мкл буфера для інкубації у кожну пробірку, за винятком загальної кількості.
4. Інкубувати протягом 2 годин при кімнатній температурі (24°C ± 4°C) на шейкері пробірок (300 до 700 об/хв).  
**Будьте обережні: не аспіруйте та не мийте пробірки перед дозуванням трейсера.**
5. Внесіть 50 мкл <sup>125</sup>Iodine міченого 25ОН вітаміну D, включаючи непокриті пробірки для загального підрахунку.
6. Обережно потрусіть штатив для пробірок, щоб видалити будь-які повітряні бульбашки.
7. Інкубуйте протягом 1 години при кімнатній температурі (24°C ± 4°C) на шейкері пробірок (від 300 до 700 об/хв)
8. Аспіруйте вміст кожної трубки (крім загальної кількості). Переконайтеся, що наконечник аспіратора досягає нижньої частини покритої трубки, щоб видалити всю рідину.
9. Промийте пробірки 2 мл робочого миючого розчину (за винятком загальної кількості) та аспіруйте. Уникайте спінювання під час додавання робочого миючого розчину.
10. Промийте пробірки знову з 2 мл миючого розчину (за винятком загальної кількості) та аспіруйте.
11. Дайте пробіркам настояться протягом двох хвилин і аспіруйте залишки к рідині.
12. Підрахуйте пробірки в гамма-лічильнику протягом 60 секунд.

## 10 ОБЧИСЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

1. Обчисліть середнє значення повторних визначень.
2. Обчисліть пов'язану радіоактивність у відсотках зв'язування, визначеного в точці нульового калібратора (0) за допомогою наступної формули:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Використовуючи 3 циклічний напів-логарифмічний або logit-log графічний папір, побудуйте значення (B/B<sub>0</sub> (%)) для кожної точки калібратора як функцію концентрації вітаміну D 25ОН у кожній точці калібратора. Відкидайте очевидні викиди.
4. Для побудови калібрувальної кривої можна також використовувати комп'ютерні методи. Якщо використовується автоматична обробка результатів, рекомендується встановити 4-параметрову криву.
5. За допомогою інтерполяції зразка (B/B<sub>0</sub> (%)) визначають загальну концентрацію вітаміну D 25ОН у зразках з калібрувальної кривої.
6. Для кожного аналізу слід перевіряти відсоток від загальної кількості трейсера, прикріпленого за відсутності неміченого вітаміну D ОН (B<sub>0</sub> / T).

## 11 ТИПОВІ ДАНІ

Наступні дані тільки для ілюстрації та ніколи не слід використовувати замість калібрувальної кривої реального часу.

25ОН Вітамін D загальний	срm	B/B <sub>0</sub> (%)
Загальна кількість	52033	
Калібратор 0.0 нг/мл	17721	100.0
10 нг/мл	11022	62.2
20 нг/мл	6826	38.5
40 нг/мл	3446	19.4
60 нг/мл	1469	8.3
100 нг/мл	592	3.3

Примітка: 1 нг/мл = 2.5 пмоль/мл

## 12 ЕФЕКТИВНІСТЬ ТА ОБМЕЖЕННЯ

### 12.1 Межа виявлення

LoB (межа бланку) обчислена шляхом вимірювання бланку кілька разів і розраховували як середнє – 1.65 стандартних відхилень розподілу цих значень. Розраховано, що LoB становить 1.2 пг / мл.

LoD (межа виявлення) розраховували як LoB - 1,65 стандартні відхилення зразка з низькою концентрацією, випробуваного в 10 різних запусках. Розрахунок LoD склав 5.67 пг/мл.

LoQ (межа кількісного визначення) обчислювали шляхом тестування 5 зразків з низькими значеннями 10 разів. Розрахунок LoQ склав 7 пг / мл.

### 12.2 Специфічність

Відсоток перехресної реактивності був визначений шляхом тестування сироватки з доданими та недоданими перехресними реагентами. Результати підсумовані у таблиці:

Речовина	Перехресна реактивність (%)
25ОН-Вітамін D <sub>3</sub>	100
25ОН-Вітамін D <sub>2</sub>	86
1,25(ОН) <sub>2</sub> -Вітамін D <sub>3</sub>	2.6
1,25(ОН) <sub>2</sub> -Вітамін D <sub>2</sub>	2.1
Вітамін D <sub>3</sub>	0.8
Вітамін D <sub>2</sub>	0.1
3-epi-25hydroxy Вітамін D <sub>3</sub>	0.4
24,25(ОН) <sub>2</sub> -Вітамін D <sub>3</sub>	≥100
25,26(ОН) <sub>2</sub> -Вітамін D <sub>3</sub>	≥100

На ефективність аналізу не впливають гемоліз (тестування гемоглобіну 5 г/л) і білірубінемія (тестування білірубину 0.5 г/л). Кон'югат білірубину (тестування 1 г / л), тригліцериди (тестування 2 г/л) і аскорбінова кислота (вітамін C) (1 г / л) не впливають на цей аналіз.

### 12.3 Точність

В АНАЛІЗІ				МІЖ АНАЛІЗАМИ			
Зразок	N	<X>±CV (нг/мл)	КВ (%)	Зразок	N	<X>±CV (нг/мл)	КВ (%)
A	18	13.2 ± 0.8	5.9	A	13	15.1 ± 1.1	7.3
B	18	28.5 ± 0.9	3.3	B	13	30.3 ± 1.5	4.9

SD: Стандартне відхилення; CV: коефіцієнт варіації

### 12.4 Правильність

ТЕСТ ВІДНОВЛЕННЯ

Доданий 25ОН-Віт. D <sub>3</sub> (нг/мл)	Відновлення (%)
14.8	110
45.2	105
Доданий 25ОН-Віт. D <sub>2</sub> (нг/мл)	Відновлення (%)
11.6	102
18.6	113

ТЕСТ РОЗВЕДЕННЯ

Розведення зразка	Теоретична концентрація нг/мл	Вим. конц. (нг/мл)
1/1	45.1	45.1
1/2	22.5	24.9
1/4	11.3	13.9
1/1	34.5	34.5
1/2	17.2	17.9
1/4	8.6	9.8

### 12.5 Часова затримка між останнім калібратором і внесенням зразка

Як показано нижче, результати аналізу залишаються точними навіть тоді, коли зразок вносять через 20 і 30 хвилин після додавання калібратора до пробірок з покриттям.

#### ЧАСОВА ЗАТРИМКА

	0 хвилин (нг/мл)	20 хвилин (нг/мл)	30 хвилин (нг/мл)
Зразок 1	8.9	7.9	8.9
Зразок 2	23.4	21.8	20.5
Зразок 3	36.5	35.7	37.5

### 13 ВНУТРІШНІЙ КОНТРОЛЬ ЯКОСТІ

Якщо результати, отримані для Control 1 та / або Control 2, не знаходяться в діапазоні, зазначеному на етикетці флакона, результати не можуть бути використані, якщо не надано задовільного пояснення розбіжності.

Необхідно, щоб кожна лабораторія могла скласти власні пули контрольних зразків, які повинні зберігатися замороженими в аліквотах. Не заморожуйте-розморожуйте більше, ніж два рази.

Прийнятні критерії різниці між дублюючими результатами зразків повинні залежати від доброї лабораторної практики.



#### ВИРОБНИК

ДРГ Інструментс ГмбХ  
вул. Фраунберг 18, 35039  
м. Марбург, Німеччина  
Тел: +49(0)64 21/170 00  
Факс: +49(0)64 21/17 00 50  
[www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
e-mail: [drq@drq-diagnostics.de](mailto:drq@drq-diagnostics.de)



#### УПОВНОВАЖЕНИЙ ПРЕДСТАВНИК

ТОВ «ДІАМЕБ ТРЕЙД»  
вул. Симона Петлюри, 25  
м. Івано-Франківськ, 76014  
тел.: +38 (0342) 775 122  
факс: +38 (0342) 775 123  
e-mail: [info@diameb.ua](mailto:info@diameb.ua)  
[www.diameb.ua](http://www.diameb.ua)

