

ORGENTEC Diagnostika GmbH

Carl-Zeiss-Straße 49-51

55129 Mainz - Germany

Phone: +49 (0) 61 31 / 92 58-0

Fax: +49 (0) 61 31 / 92 58-58

Internet: www.orgentec.com

Návod k použití

2016-01



ORG 270 25-OH Vitamin D₃/D₂

KRÁTKÝ POPIS

Alegria[®] 25-OH vitamin D₃/D₂ je ELISA test založený systém určený pro kvantitativní měření celkové koncentrace 25-(OH)-Vitamin D₂ a 25-(OH)-Vitamin D₃ ve vzorcích lidského séra nebo plasmy (EDTA vzorků plazma, heparin plazma, citrátové plazmy), k použití při hodnocení dostatku vitamínu D. Tento výrobek je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

POUŽÍVANÉ SYMBOLY

	Diagnostický zdravotnický prostředek in vitro
	Výrobce
	Katalogové číslo
	Dostačuje pro
	Kód šarže
	Spotřebuje do
	Teplotní omezení
	Viz návod k použití
	Chraňte před slunečním světlem

	Alegria [®] Testovací stripy
	Promývací pufr
	Systémová kapalina
	Připraven k použití

PRINCIP TESTU

Test Alegria[®] obsahuje mikrostripy s názvem Alegria[®] Test Strips. Mají 8 jamek a jsou označené čárovým kódem. Každý proužek je určen pro jedno stanovení z jednoho vzorku od pacienta. Zkušební proužek Alegria[®] obsahuje úplnou sadu činidel. Součástí je enzymový konjugát, enzymový substrát, oddělovač vzorků a zvláštní zkušební kontrola. Dvě části zkušebního proužku Alegria[®] jsou potaženy protilátkou vitamínu D₃/D₂ 25-OH a slouží jako reakční zdroje pro kontrolu a vzorek od pacienta. Dvě další místa zkušebního proužku Alegria[®] jsou potažena indikátorem vitamínu D 25-OH nebo případně kontrolním vzorkem vitamínu D 25-OH.

Určení je založeno na imunisorbentním testu konkurenčních imunů (ELISA) následujícími kroky:

Vzorek je pipetou přenesený do zdroje č. 1. V analyzáru Alegria[®] s randomizovaným přístupem je vzorek smíšený s indikátorovým činidlem a vitamín D₃/D₂ 25-OH je izolovaný z pojivového proteinu. Vitamin D 25-OH a indikátorové činidlo potažené ve zdroji č. 2 pozastaveny oddělovačem. Vzorek i kontrola jsou přeneseny do reakčních zdrojů č. 3 a 3. 4, kde se vitamín D₃/D₂ 25-OH a indikátorové činidlo vitamínu D 25-OH spojí a vytvoří potaženou protilátku vitamínu D₃/D₂ 25-OH. Mezi vitamínem D₃/D₂ 25-OH a protilátkou nebo mezi indikátorovým činidlem vitamínu D 25-OH a protilátkou se vytvoří celky. Po inkubaci odstraní první omývací krok nesvázané a nespecificky vázané molekuly. Následně přidání enzymový konjugát se naváže do nepohyblivých celků indikátoru a protilátky. Po inkubaci odstraní druhý omývací krok nesvázaný enzymový konjugát. Přidání roztoku substrátu enzymu má za výsledek hydrolyzu a změnu barvy během inkubace. Intenzitu modré barvy lze měřit fotometricky na hodnotě 650 nm. Intenzita modré barvy úzce souvisí s koncentrací vitamínu D ve vzorku.

Princip testu Alegria[®] Test Strip vychází z patentované technologie SMC[®] (Sensotronic Memorized Calibration); údaje o testu, analýze a hodnocení a dále datum expirace dané šarže jsou obsaženy v čárovém kódu vytištěném na každém proužku testu Alegria[®] Test Strip.

Alegria[®] Test Strip je možné použít s diagnostickým přístrojem Alegria[®] – plně automatickým analyzátozem s přímým přístupem (Random Access). Pomocí technologie SMC[®] jsou data zakódovaná v čárovém kódu přenesena z proužku Alegria[®] Test Strip do přístroje, který automaticky provede test a vyhodnotí jej. Přístroj odečte datum expirace a je-li test Alegria[®] Test Strip prošlý, odmítne jeho další zpracování.

UPOZORNĚNÍ A PREVENCE

- Všechna činidla této sady jsou navržena pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.
- Komponenty obsahující lidské sérum byly otestovány a nebyly nalezeny HBsAg, HCV, HIV1 a HIV2 dle schválených metod FDA. Žádný test nemůže zaručit absenci HBsAg, HCV, HIV1 nebo HIV2 a je tedy nutno s každým lidským sérem, obsahujícím látky testu, manipulovat jako s infekčním materiálem.
- Bílkovina hovězího séra (BSA) použitá v komponentách byla otestována na BSE a to negativně.
- Vyhnete se kontaktu se substrátem TMB (3,3',5,5'-tetrametyl benzidín).
- Systémová kapalina obsahuje kyselinu, dle klasifikace je bezpečná. Zabraňte kontaktu s pokožkou.
- Kontrola, vzorkový roztok a mycí roztok obsahují 0.09% azidu sodného jako ochranný prostředek. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.
- Enzym konjugace obsahuje 0.05% ProClinu 300 jako ochranného prostředku. Tato koncentrace je klasifikována jako bezpečná.

Během manipulace se všemi činidly, kontrolami vzorky séra sledujte stávající nařízení pro laboratorní bezpečnost a správnou laboratorní práci:

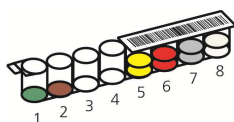
- První pomoc: V případě kontaktu s pokožkou ihned důkladně opláchněte vodou a saponátem. Sundejte kontaminovaný oděv a boty a před dalším použitím je omyjte. Dojde-li ke kontaktu systémové kapaliny s kůží, opláchnete důkladně vodou. Po kontaktu se zrakem důkladně opláchněte otevřené oči tekoucí vodou po dobu alespoň 10 minut. Dle potřeby vyhledejte lékařskou pomoc.
- Osobní opatření, ochranné vybavení a postup v případě nouze: Sledujte nařízení laboratorní bezpečnosti. Vyvarujte se kontaktu s pokožkou a očima. Nepožívejte. Nenasávejte ústy. Nejezte, nepijte, nekuřte nebo nenanášejte make up v oblastech, kde se manipuluje se vzorky nebo sadou činidel. Při vylití absorbujte inertním materiálem a políťte materiál řádně zlikvidujte.
- Limity vystavení / ochrana osob: Noste ochranné rukavice z nitrilové nebo z přírodního latexu. Noste ochranné brýle. Při používání dle určeného použití nejsou známy nebezpečné reakce.
- Situace, kterým je třeba předcházet: Roztok substrátu je citlivý na světlo. Proto skladujte proužky Alegria[®] na tmavém místě.
- Při likvidaci laboratorního odpadu je třeba dodržovat místní a národní předpisy.

Dodržujte směrnici pro provádění řízení kvality ve zdravotnických laboratořích analyzačními kontrolami a/nebo sdruženými séry.

OBSAH SOUPRAVY

24 ORG 270

ALEGRIA TEST STRIPS



Dostačuje pro 24

Alegria® testovací stripy: destička obsahující 12 modulů po 8 jamek.

Jamky 1: Zelené, potažené 25-OH vitamínu D stopovkou

Jamky 2: Hnědá, potažené 25-OH vitamínu D stopovkou + potažené 25-OH vitamínu D kontrolou

Jamky 3 a 4: potažené protilátkou (reakční jamky)

Jamky 5: Pufr: žlutá;

Jamky 6: Enzymový konjugát: světle červená; obsahuje protilidské protilátky IgG, označeno HRP; PBS, BSA, detergent, ochranný prostředek ProClin 0.05%.

Jamky 7: Matrice; matná; obsahuje matici lidského séra, Tris, BSA, konzervant azid sodný 0,09 %.

Jamky 8: TMB substrátový roztok: 3,3', 5,5'- tetramethyl-benzidin.

Protilátky zaznamenávají, zda je vitamín D₂ 25-OH a vitamín D₃ 25-OH navázán na reakční zdroje.

Kód produktu na čárový kód: **VitD**

WASH

1x 20 ml Promývací pufr; obsahuje Tris, detergent, ochranný prostředek azid sodný 0,09%; 50x koncentrát

SYSTEM FLUID

1x 2.5 ml Ředěná systémová kapalina; obsahuje kyselinu; 1000x koncentrát

i

1 Alegria® Pokyny pro použití: Alegria® Mini-DVD

i

1 Certifikát kontroly kvality

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

- Skladujte testovací sadu při 2-8°C na tmavém místě.
- Během skladování a používání nevystavujte činidla horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Skladujte testovací proužky Alegria® hermeticky uzavřeny a v suchu v dodaném zásobníku.
- Uchovatelnost neotevřené testovací je 12 měsíců od data výroby. Neotevřená činidla jsou stabilní do konce expirace sady. Viz štítky pro individuální dávku.
- Rozředěný mycí roztok a systémová kapalina jsou stabilní minimálně 30 dní, jsou-li skladovány při 2-8°C. Pro přemístění do nádoby s činidlem doporučujeme spotřebovat v tentýž den.

POTŘEBNÉ VYBAVENÍ

- mixér Vortex
- mikropipety se špičkami na jedno použití na 10 µl
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- odměrný válec na 1000 ml, 2500 ml

POMOCNÉ REAGENCIE

ORG 271 25-OH Vitamin D₃/D₂ Control Set

25-OH Vitamin D₃/D₂ Control Set je externí materiál kontroly jakosti pro kvantitativní Alegria® 25-OH Vitamin D₃/D₂ analýzu. Tento výrobek je určen pouze pro profesionální in vitro diagnostiku.

Řídící sada obsahuje 2.5 ml řízení A a řízení B každé s definovanou koncentrací 25-OH vitamínu D₃/D₂ (viz štítek) v tri 0.7%, NaCl 0.8% s maticí lidského séra, BSA 0.5% a azid sodný 0.09% jako konzervantu. Připraveno k použití. Pro 30 testů. Skladujte ORG 271 při 2-8°C na tmavém místě. Neotevřená ovládní jsou stabilní do vypršení data expirace (viz štítek). Po otevření spotřebujte do 4 měsíců. Postup při analýze Alegria®: Naberte pipetou 80 µl řízení na spodní části kavity 1 testovacího proužku Alegria. Tento výrobek je k dispozici zvlášť.

ODEBÍRÁNÍ VZORKŮ, JEJICH PŘÍPRAVA A UCHOVÁVÁNÍ

- Krevní vzorky odebírat podle platných směrnic a metod.
- Krev nechat srazit a sérum získat odstředěním.
- Používání hemolitických, lipemických a ikterických sér je potřeba se vyhnout.
- Při teplotě 2 - 8 °C chlazené vzorky séra a plazmy mohou být skladovány až 5 dní. Je-li plánováno delší skladování, měly by být vzorky rozděleny na alikvotní části a při -20 °C hluboce zmrazeny.

- Během skladování a používání nevystavujte vzorky séra a plazmy horku, slunečnímu záření nebo silnému světlu.
- Vyhnout se opakovanému rozmrazení a zmrazení!
- Používání tepelně inaktivovaných sér se nedoporučuje.

POZNÁMKY K PRACOVNÍMU POSTUPU

- Testovací sada nemůže být po uplynutí data použití používána.
- Veškerý materiál musí být ponechán před použitím při pokojové teplotě (20-28 st C).
- Aby se zabránilo kontaminaci, vyměňujte špičky mikropipet mezi vzorky.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

WASH

Naředte obsah Promývacího pufru koncentrátu (50x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 1000ml (1l). Promývací roztok se poté přeleje do výhradně k tomu určené nádoby. Pokud je třeba provést pouze jeden cyklus Alegria v jednom dni, doporučujeme transfer pouze 500 ml zředěného Promývacího pufru.

SYSTEM FLUID

Naředte obsah Ředěné systémové kapaliny koncentrátu (1000x) s destilovanou nebo deionizovanou vodou na konečný objem 2500ml před použitím. Systémová kapalina se následně přelije do připravené nádoby.

ALEGRIA TEST STRIPS

Vyjměte požadovaný počet testovacích proužků Alegria® ze zásobníku a nechejte je ohřát na pokojovou teplotu (20-28°C). Nesundávejte fóliový obal prázdných jamek, dokud nebudete připraveni začít analýzu.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ

Testovací proužky Alegria® s technologií SMC® se používají s diagnostickým zařízením Alegria®. Podrobné informace o obsluze nástroje naleznete v návodu k obsluze pro zařízení.

(1) Sejmout fólii, která pokrývá prázdné jamky 1 až 4 z potřebného testovacího proužku

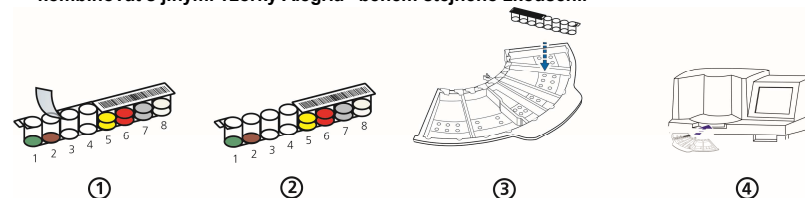
Fólie otištěná čárovým kódem, jenž pokrývá kavitu 5 až 8, není k sejmutí.

(2) Na dno kavity 1 napipetovat jamky 80 µl nezředěného vzorku pacienta nebo připraveno pro použití řízení.

(3) Vložte proužek do SysTray.

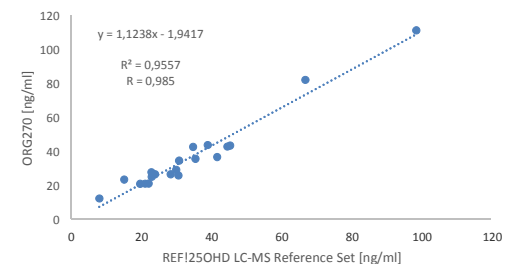
(4) Umístěte obsazený SysTrays do správné polohy v nástroji Alegria® a spusťte test. Všechny další kroky se provedou automaticky. Testovací chod je dokončen, když nástroj začne tisknout výsledky.

Pozor: Zkušební vzorky Alegria® 25-OH Vitamin D₃/D₂ vyžadují speciální provedení a proto je nelze kombinovat s jinými vzorky Alegria® během stejného zkoušení.



KALIBRACE

Kalibraci lze zpětně sledovat až po referenční přípravku REF125OHD tandemové hmotnostní chromatografie ID-LC.



VÝPOČET VÝSLEDKU

Pomocí technologie SMC® (Senzotronicky zapamatovaná kalibrace) se všechna data převádí do systému pomocí individuálních čárových kódů na testovacím proužku Alegria®. Vyhodnocení a interpretace výsledků probíhá plně automaticky.

PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY

Rozsah měření

Vypočet rozsahu analýzy Alegria® je 5 - 200 ng/ml

Interpretace výsledků

V souladu s rozsahem této dokumentace jsou navrhovány klasifikace stavu vitamínu D: (Faktory převodu: 1ng/ml = 2.5 nmol/l; 1 nmol/l = 0.4 ng/ml)

shodek:	< 12 ng/ml	(< 30 nmol/l)
nedostatek:	12 - 20 ng/ml	(30 - 50 nmol/l)
dostatek:	> 20 - 150 ng/ml	(> 50 - 375 nmol/l)

HRANICE METODY

V souladu s literaturou je navrženo několik referenčních rozsahů. Příklady:

Ref 5

Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), (ÖGE), (SGE), (SVE), Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Vitamin D. 2012; ISBN 978-3-86528-128-9).

Defizienz: <12 ng/ml; Insuffizienz: 12-20 ng/ml; Suffizienz: >20-160 ng/ml; Hypervitaminose 160-500 ng/ml

Ref 9

Holick, M.F. Vitamin D deficiency. N. Engl. J.M. 2007, 357: 266-281.

Deficiency: <20 ng/ml; Insufficiency: 21-29 ng/ml; Sufficiency: >30 ng/ml; Intoxication >150 ng/ml

Ref 16

National Osteoporosis Society 2013, Vitamin D and Bone Health: A Practical Clinical Guideline for Patient Management. Deficiency: <12 ng/ml; Insufficiency: 12-20 ng/ml; Sufficiency: >20 ng/ml

V souladu s dokumentací ovlivňují běžné úrovně vitamínu D 25-OH faktory, jako je výživa, roční období, barva pokožky, věk nebo kultura. Rozsahy koncentrace pro klasifikace dodávky vitamínu D by měly respektovat doporučení. Doporučuje se, aby si každá laboratoř stanovila vlastní rozmezí dle ISO 15189:2007 "Požadavky na kvalitu a způsobilost zejména pro zdravotnické laboratoře" nebo dalšími platnými laboratorními pokyny.

Linearita

Vzorky pacientů obsahující vysokou úroveň 25-OH vitamín D byly sériově zředěny ve vzorkovém roztoku pro ukázkou dynamického rozsahu analýzy a horního / spodního konce linearity. Aktivita pro každý roztok byla spočítána pomocí SMC® technologie.

Vzorek	Ředění	Pozorovaná [ng/ml]	Očekávaná [ng/ml]	P/O %
1	1:1	170.2	200.0	85
	1:2	101.6	100.0	102
	1:4	44.6	50.0	89
	1:8	21.7	25.0	87
2	1:16	12.9	12.5	104
	1:1	129.2	120.0	107
	1:2	62.6	60.0	104
	1:4	25.1	30.0	84
	1:8	15.3	15.0	102
3	1:16	< 5	7.5	na
	1:1	58.5	62.6	94
	1:2	28.5	31.3	91
	1:4	14.7	15.6	94
	1:8	9.7	7.8	124
	1:16	4.1	3.9	105

Limit detekce

Minimální množství zjištěných vitamínu D je 5 ng/ml

Reprodukovatelnost

Intraanalizační přesnost: Koefficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 24 nálezů v jednom cyklu. Výsledky pro přesnost analýzy jsou uvedeny v tabulce níže.

Interanalizační přesnost: Koefficient variace (CV) byl spočítán pro každý ze tří vzorků z výsledků 6 nálezů při 5 různých cyklech. Výsledky přesnosti mezi cykly jsou uvedeny v tabulce níže.

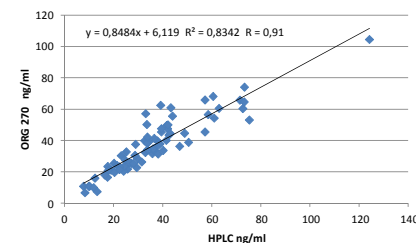
Intra-Assay			Inter-Assay		
Vzorek	Průměr [ng/ml]	% CV	Vzorek	Průměr [ng/ml]	% CV
1	16.3	10.7	1	16.5	14.7
2	50.1	6.1	2	45.6	7.9
3	107.5	3.9	3	98.9	4.2

Interference

Nebyla pozorována žádná interference se séry, která byla hemolytická (až do 1 000 mg/dl), lipemická (až do 3g/dl triglyceridů) nebo obsahovala bilirubin (až 40 mg/dl). Nicméně z praktických důvodů se doporučuje, aby hrubě hemolyzované nebo lipemické vzorky je třeba se vyhnout. Taktéž nebyly pozorovány žádné efekty interference s použitím antikoagulancií (EDTA, heparin, citrát).

Výsledky studie

Ve srovnávací studii bylo analyzováno 74 vzorků séra vitamínu D u osob ve věku od 8 do 89 let, 2/3 ženy a 1/3 muži. Mezi metodou Alegria® 25-OH Vitamín D₃/D₂ a HPLC byla nalezena vysoká korelace: R = 0.91



specificita

Měřením křížové reaktivity látek ve vztahu k vitamínu D 25-OH byla zjištěna specificita.

Křížová reaktivita je stanovena v % ve vztahu k reaktivitě vitamínu D₃ 25-OH:

25-OH Vitamin D ₃	100 %
25-OH Vitamin D ₂	100.4 %
Vitamin D ₃ (Cholecalciferol)	< 0.1 %
Vitamin D ₂ (Ergocalciferol)	< 0.6 %

REFERENCE

- Ashraf, A. et al. Threshold for effects of vitamin D deficiency on glucose metabolism in obese female African-American adolescents. J Clin Endocrinol Metab 94 (9):3200-3206, 2009.
- Baker, A. M. et al. A nested case-control study of midgestation vitamin D deficiency and risk of severe preeclampsia. J Clin Endocrinol Metab 95 (11):5105-5109, 2010.
- Crew, K. D. et al. Association between plasma 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk. Cancer Prev Res

(Phila) 2 (6):598-604, 2009.

4. Cutolo, M. Vitamin D and autoimmune rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)*, 48 (3): 210-212, 2009
5. Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE), (ÖGE), (SGE), (SVE), Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, Vitamin D. 2012; ISBN 978-3-86528-128-9.
6. Garland, C.F. et al. Vitamin D for Cancer Prevention: Global Perspective. *Ann. Epidemiol.* 2009; 19: 468-483.
7. Hayek J. El, G. Egeland, and H. Weiler. Vitamin D status of Inuit preschoolers reflects season and vitamin D intake. *J Nutr* 140 (10):1839-1845, 2010.
8. Holick, M.F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 116 (8):2062-2072, 2006.
9. Holick, M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J.M.* 2007, 357: 266-281.
10. Holick, M.F. Sunlight and Vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancer and cardiovascular disease. *Am. J.Clin. Nutr.* 2004; 80: 1678-1688.
11. Hollis B.W. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 88: 507S-10S.
12. Houghton L.A. and Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84:694-697.
13. Jorde, R. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D levels are strongly related to systolic blood pressure but do not predict future hypertension. *Hypertension* 55 (3):792-798, 2010.
14. Kamen, D. L. and Alele, J. D. Skeletal manifestations of systemic autoimmune diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17 (6):540-545, 2010.
15. Krasowski, M. D. Pathology consultation on vitamin D testing. *Am J Clin Pathol* 136 (4):507-514, 2011.
16. National Osteoporosis Society 2013, Vitamin D and Bone Health: A Practical Clinical Guideline for Patient Management.
17. Sen, D. and Ranganathan, P. Vitamin D in rheumatoid arthritis: panacea or placebo? *Discov Med* 14 (78):311-319, 2012.
18. Wen, H. and Baker, J. F. Vitamin D, immunoregulation, and rheumatoid arthritis. *J Clin Rheumatol* 17 (2):102-107, 2011.
19. Zerwekh, J.E. Blood biomarkers of Vitamin D status, *Am. J.Clin. Nutr.* 2004; 87: 1087-91.

