



NÁVOD K POUŽITÍ

VÁPNIK 600

KATALOGOVÉ ČÍSLO 207

IVD CE



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

POUŽITÍ

Souprava Vápník 600 se používá ke kvantitativnímu stanovení koncentrace vápenatých iontů v séru a moči.

SOUHRN

V lidském organismu je vázána převážná část vápníku v kostní tkáni ve formě hydroxyapatitu. Tato forma výskytu vápníku slouží jako zásoba pro extracelulární potřebu organismu. Zbytek vápníku je obsažen v extracelulární tekutině, neboť koncentrace vápníku v buňkách je velmi nízká. Denní příjem vápníku je asi 25 mmol (1 g). V plasmě se necelá polovina vápníku váže na bílkoviny, především na albumin. Tato část vápníku je označována jako nedifuzibilní, neboť nemůže pronikat semipermeabilními membránami. Asi 6 % vápníku je v plasmě ve formě komplexních sloučenin rozpustných ve vodě (citrát, laktát, bikarbonát). Asi 50 % celkového vápníku představuje ionizovaný vápník. Podíl ionizovaného vápníku je závislý na pH krve, při zvýšení hodnoty pH dojde k poklesu ionizovaného vápníku. Ztráty bílkovin, především albuminu vedou k poklesu nedifuzibilního vápníku. Koncentrace vápníku v plasmě je závislá na koncentraci anorganického fosforu. Zvýšení koncentrace fosforu má za následek snížení koncentrace vápenatých iontů, jako důsledek vzniku neionizovaného fosforečnanu vápenatého. Pro vlastní fyziologické procesy v organismu je rozhodující ionizovaný vápník. Koncentrace vápníku v plasmě je ovlivněna střevní malabsorpcí, změnami sekrece parathormonu a kalcitoninu, změnami v kostním metabolismu. Menší účinek na metabolismus vápníku mají další hormony jako kortizol a tyreoidální hormony. Sníženou koncentraci vápníku v plasmě označujeme jako hypokalcemii. Těžká hypokalcemie způsobuje křeče. Zvýšená koncentrace vápníku v plasmě je označována jako hyperkalcemie, která může vést k poruše ledvin (nefrokalcinóza) a ke vzniku močových kamenů¹.

PRINCIP METODY

Vápenaté ionty reagují v alkalickém prostředí monoetanolaminu s o-kresolftalein-komplexonem za vzniku fialového produktu, jehož barevná intenzita je lineárně závislá na koncentraci vápníku. Absorpční maximum barevného komplexu vápníku s o-kresolftalein-



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

komplexonem je při 578 nm. Interferenci hořčíku je zabráněno pomocí 8-hydroxychinolinu².

SLOŽENÍ SOUPRAVY

1 PUFŘ	3 x100 ml	Monoetanolaminový puřř	753 mmol/l
2 CHROMOGEN	3 x100 ml	Kyselina chlorovodíková	8,8 mmol/l
		8-hydroxychinolin	6,9 mmol/l
		o-kresolftalein – komplexon	0,044 mmol/l

PŘÍPRAVA ČINIDEL

1 PUFŘ a 2 CHROMOGEN jsou připraveny k přímému použití.

STABILITA SOUPRAVY

1 PUFŘ a 2 CHROMOGEN jsou při teplotě 2-25 °C stabilní až do doby expirace.

POUŽITÝ MATERIÁL

Ke stanovení se používá krevní sérum nebo moč. Sérum lze skladovat při teplotě 4 – 8 °C 24 h a při teplotě – 20 °C 32 týdnů. Moč se doporučuje okyselit 6 mol/l HCl na pH = 2, stabilita při teplotě 4 – 8 °C 24 hodin³.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

POSTUP ANALÝZY

	VZOREK [μ l]	STANDARD [μ l]	KONTR. VZOREK [μ l]
SÉRUM	5	–	–
STANDARD	–	5	–
1 PUFR	250	250	250

Vše se promíchá a za 1 min. se změří absorbance blanku standardu A_{BISt} a vzorku A_{BIVz} proti kontrolnímu vzorku.

	VZOREK [μ l]	STANDARD [μ l]	KONTR. VZOREK [μ l]
2 CHROMOGEN	250	250	250

Promíchá se a za dalších 5 minut se změří absorbance standardu A_{St} a vzorku A_{Vz} . Měření se provádí při 578 nm, případně v intervalu 560 – 580 nm. Při bichromatickém měření se vedlejší vlnová délka nastaví na hodnotu 650 nm. Vzorky moče před analýzou naředíme 2x destilovanou vodou a analyzujeme jako sérum, výsledek analýzy násobíme dvěma.

VÝPOČET

$$fS (Ca_{[mmol/l]}) = c_{St} \cdot \frac{A_{Vz} - A_{BIVz}}{A_{St} - A_{BISt}}$$

c_{St} – koncentrace Ca ve standardu (mmol/l)

KALIBRACE A KONTROLA

Ke kalibraci se používají komerčně dodávané kalibrátory například LYONORM - kalibrátor firmy ERBA-LACHEMA. Ke kontrole lze použít kontrolní séra dodávaná řadou firem, například LYONORM HUM N a HUM P firmy ERBA-LACHEMA.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

REFERENČNÍ INTERVAL⁴

Sérum, plazma		Moč	
Nedonošení	1,55 – 2,75 mmol/l	Dieta bez vápníku	0,13 – 1,0 mmol/d
0 – 10 d	1,90 – 2,60 mmol/l	S nízkým příjmem	1,25 – 3,75 mmol/d
10 d – 24 měsíců	2,25 – 2,75 mmol/l	Střední příjem (20 mmol/d)	
2 – 12 let	2,20 – 2,70 mmol/l	muži	2,50 – 7,50 mmol/d
Dospělí	2,15 – 2,50 mmol/l	ženy	10,5 – 14,0 mmol/d
Muži > 60 let	2,20 – 2,55 mmol/l		

ZNAKY ANALYTICKÉ METODY

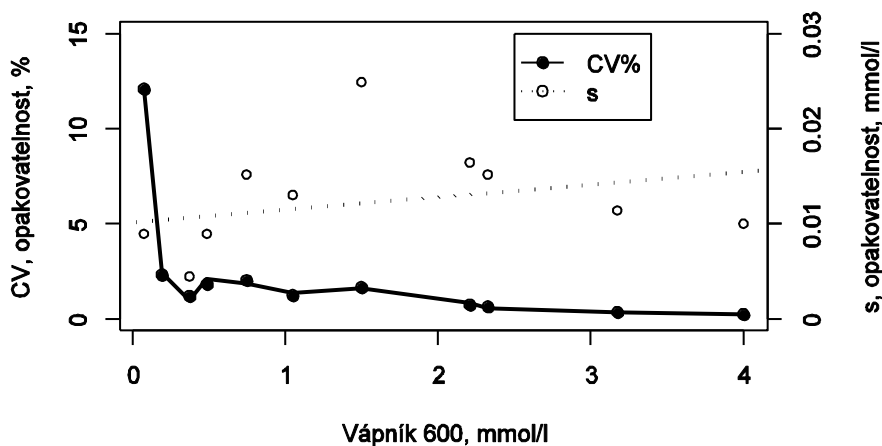
NEPŘESNOST

Odhady nepřesnosti v sérii a celkové nepřesnosti byly získány měřením na základě protokolu EP5-A NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)⁵. Celkový počet pozorování byl N=80 u každého séra. Výsledky v tabulce jsou platné pro měření na analyzátoru HITACHI 911, ROCHE.

Vzorek	Průměr mmol/l	Směrodatná odchylka mmol/l				Celková CV%	N
		uvnitř série	mezi sériemi	Mezi dny	celková		
Nízký sérový pool	1,862	0,0492	0	0,0232	0,0543	2,92	80
Vysoký sérový pool	3,163	0,0766	0	0,0409	0,0868	2,75	80

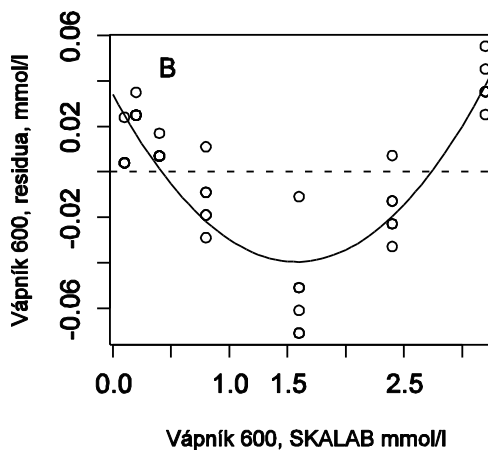
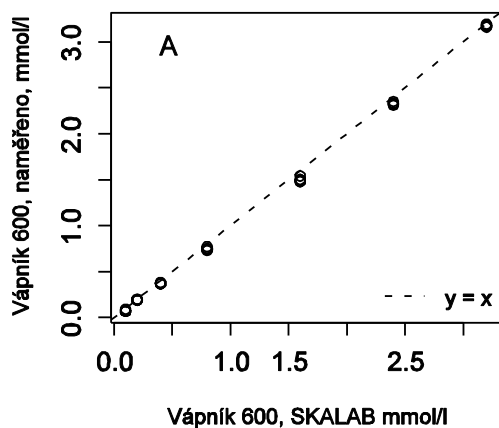
PROFIL PŘESNOSTI

Profil přesnosti byl sestaven na základě opakovaného měření vzorků sér pacientů a vzorků ředěných fyziologickým roztokem s koncentrací v rozmezí 0,1– 4,0 mmol/l. Při koncentraci 0,2 mmol/l je variační koeficient (opakovatelnost) 2,3 % a s rostoucí koncentrací vápníku postupně klesá až na hodnotu 0,25 % při koncentraci 4,0 mmol/l.



LINEARITA

Kvantitativní míra nelinearity stanovení⁶⁻⁷ vápníku je vyjádřena jako absolutní, popř. relativní rozdíl mezi polynomem druhého řádu a přímkou proloženou experimentálními daty ve zvolených bodech – viz. následující tabulka. Velikost tohoto rozdílu je obvykle porovnávána s přesností dosahovanou u kontrolních vzorků. V rozsahu koncentrací vápníku 0,5 – 4,0 mmol/l je testovaná nelinearita vyjádřena absolutní hodnotou maximálně 0,058 mmol/l, v krajních bodech pracovního rozsahu křivky představuje rozdíl 1,6 resp. 0,9 %. V intervalu rutinních měření koncentrace vápníku v séru i moči nepřesahují relativní difference 3,5 %, což jsou hodnoty blízké analytické nepřesnosti. Linearita metody neovlivňuje klinickou interpretaci výsledku stanovení.



Test linearity stanovení vápníku – porovnání přímky a polynomu IV. řádu.

Přímka $y = -0,042 + 1,015x$.

Polynom čtvrtého řádu $y = -0,016 + 1,003x - 0,012x^2 + 0,055x^3 - 0,007x^4$ nejvíce vyhovuje experimentálním datům. Maximum relativního rozdílu je u koncentrace 1,5 mmol/l.

Test linearity - tabulka diferencí koncentrace vápníku vypočtených mezi přímkou a polynomem čtvrtého řádu

Koncentrace mmol/l	Přímka, mmol/l	Polynom IV. řádu, mmol/l	Diference mmol/l	Diference, %
0,5	0,459	0,466	0,008	1,6
1,0	0,959	0,932	-0,027	-2,7
1,5	1,460	1,407	-0,053	-3,5
2,0	1,961	1,903	-0,058	-2,9
2,5	2,462	2,425	-0,037	-1,5
3,0	2,962	2,962	-0,000	-0,0
3,5	3,463	3,497	0,034	1,0
4,0	3,963	3,999	0,035	0,9

Zvolený postup kvantitativního posouzení nelinearity ve srovnání s dosahovanou analytickou nepřesností je lepší řešení, než konstatovat statistickou významnost koeficientů polynomů vyšších řádů, která nemusí být významná z hlediska praktického provádění stanovení. Nepřesnost metody je v laboratoři vždy známá z provádění rutinní kontroly kvality.



MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI

Mez detekce a mez stanovitelnosti byly vypočteny na základě analýzy slepého vzorku (mez detekce = $0 + 3,3 * S_{blanku}$, mez stanovitelnosti $0 + 10 * S_{blanku}$, $n = 20$). Mez detekce je 0,04 mmol/l, mez stanovitelnosti 0,1 mmol/l.

INTERFERENCE

Experimentálně byly ověřeny interference níže uvedených analytů. Pro stanovení interferencí jednotlivých analytů bylo stanoveno kritérium podle kterého koncentrace vápníku měřena v závislosti na rostoucí koncentrací interferentů musí ležet uvnitř intervalu průměru koncentrace vápníku $\pm 5\%$ původního vzorku bez interferentů.

- Bilirubin neinterferuje až do koncentrace 435 $\mu\text{mol/l}$.
- Hemoglobin neinterferuje do koncentrace 4,0 g/l
- Triacylglyceridy neinterferují do koncentrace 16 mmol/l
- Hořčík neinterferuje do koncentrace 3,0 mmol/l

SROVNÁNÍ SE SOUPRAVOU CALCIUM LIQUID FIRMY SENTINEL

Bylo analyzováno 50 vybraných vzorků pacientů soupravou Calcium Liquid firmy Sentinel CH. na analyzátoru Hitachi 911. Stejně vzorky byly analyzovány soupravou Ca 600 na analyzátoru Hitachi 911. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny neparametrickou metodou podle Passinga a Babloka⁸ a diferenčního grafu. Pro vyhodnocení byl použit program⁹. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ není směrnice významně rozdílná od hodnoty 1,0, rovněž úsek na ose y je nevýznamný. Bias vypočtený z regresní rovnice je při koncentraci 2,50 mmol/l - 0,2%. Medián diferencí mezi metodami je blízký nule.

Srovnání soupravy Ca 600 se soupravou Calcium Liquid firmy Sentinel CH.

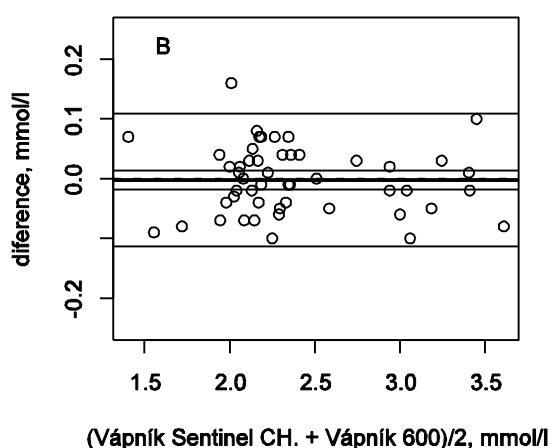
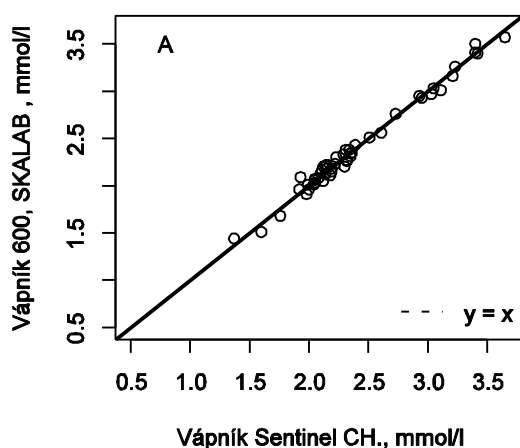
Passingova-Bablokova regrese	n	Směrnice (95% CI)	Intercept (95% CI)	r *
	50	1,000	-0,005	0,976
		(0,962 až 1,040)	(-0,102 až 0,094)	

* pořadový korelační koeficient



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

Celková povolená analytická chyba (TEa, CLIA)¹⁰ pro vápník je $\pm 0,25$ mmol/l, biologická variabilita¹¹ klade požadavky asi 4 x přísnější (2,4%), které fotometrické metody nejsou schopny splnit.



LITERATURA

1. Racek J. et al.: *Klinická biochemie*, Galen, Praha, 1999, 97-101.
2. Škavrada J.: *Autorské osvědčení č. 216 388*.
3. Jabor A., Zámečník M.: *Preanalytická fáze 2005, Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi*. ČLS JEP a SEKK, Praha 2005, s.52. ISBN 80-239-5198-X.
4. Burtis C.A., Ashwood E.R. (Ed): *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3-rd ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, 1804, ISBN 0-7216-5610-2.
5. National Committee for Clinical Chemistry Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Device; Approved Guideline. NCCLS document EP5-A, 1997.
6. National Committee for Clinical Chemistry Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Device; Approved Guideline. NCCLS document EP5-A, 1997.



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
tel.: +420 461 531 163, +420 777 176 107, +420 777 324 399
fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

7. Kroll MH., Emancipátor K.: A Theoretical Evaluation of Linearity. *Clin. Chem.*1993;39:405.
8. Passing H., Bablok W. A New Biometrical Procedures for Testing the Equality of Measurements from Two Different Analytical Methods. *J. Clin. Chem .Clin. Biochem.* 1983;21:709-720.
9. Linnet K.: *A Program for Statistical Analysis in Clinical Biochemistry*. Version 4.2.0.
10. <http://www.westgard.com/cli.htm> , dostupné 31.8.2007.
11. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>, dostupné 31.8.2007.

Datum poslední revize: 14. 4. 2015

Výrobce:



SKALAB s.r.o., Slovenská 723/61, 568 02 Svitavy
Tel.: +420 461 531 163
Mobil: +420 777 176 107, +420 777 324 399
Fax: +420 461 530 619
<http://www.skalab.cz>, e-mail: skalab@skalab.cz

