



NÁVOD K POUŽITÍ

VÁPŇÍK 600 A

KATALOGOVÉ ČÍSLO 204

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 A 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 (1g). 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 koncentrací 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 prostředí imidazolového pufru při pH=6,80 s Arsenazo III za vzniku stabilního modrého komplexu²⁻⁵, jehož barevná intenzita je lineárně závislá na koncentraci vápenatých iontů. Absorpční maximum barevného komplexu je při 650 nm.



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

SLOŽENÍ SOUPRAVY

| | | | |
|-------------|-----------|----------------------------|--------------|
| 1 CHROMOGEN | 6x100 ml: | Imidazolový pufr (pH=6,80) | 100 mmol/l |
| | | Arsenazo III | 0,116 mmol/l |
| | | Stabilizátory | |
| | | Detergenty | |

PŘÍPRAVA ČINIDEL

1 CHROMOGEN je připraven k přímému použití.

STABILITA SOUPRAVY

1 CHROMOGEN je 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 2 - 8 °C 5 dní a při teplotě - 20 °C 6 měsíců. Moč lze skladovat při teplotě 2 - 8 °C 3 dny a při teplotě - 20 °C 6 měsíců.

POSTUP ANALÝZY

| | VZOREK [μl] | STANDARD [μl] | KONTR. VZOREK [μl] |
|-------------|-------------|---------------|--------------------|
| SÉRUM | 20 | - | - |
| STANDARD | - | 20 | - |
| 1 CHROMOGEN | 1000 | 1000 | 1000 |

Vše se promíchá a za 2 min. se změří absorbance testu A₁ a standardu A₂ proti kontrolnímu vzorku. Měření se provádí při 650 nm (eventuálně 620 - 660 nm) v 10 mm skleněných kyvetách. V případě bichromatického měření se vedlejší vlnová délka nastaví na



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

hodnotu 700 nm. Vzorky moče před analýzou naředíme 2x destilovanou vodou a analyzujeme jako sérum, výsledek analýzy násobíme dvěma.

VÝPOČET

$$fS (Ca_{[mmol/l]}) = c_{St} \cdot \frac{A_1}{A_2}$$

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.

REFERENČNÍ INTERVAL

Sérum, plazma 2,10 - 2,60 mmol/l
Moč 2,50 - 7,50 mmol/den⁶

ZNAMY ANALYTICKÉ METODY

NEPŘESNOST

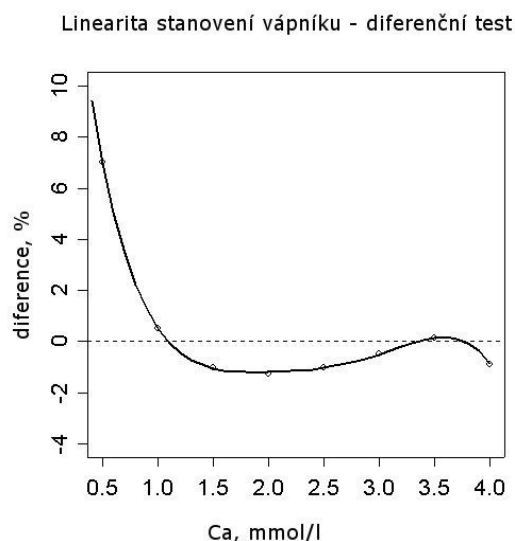
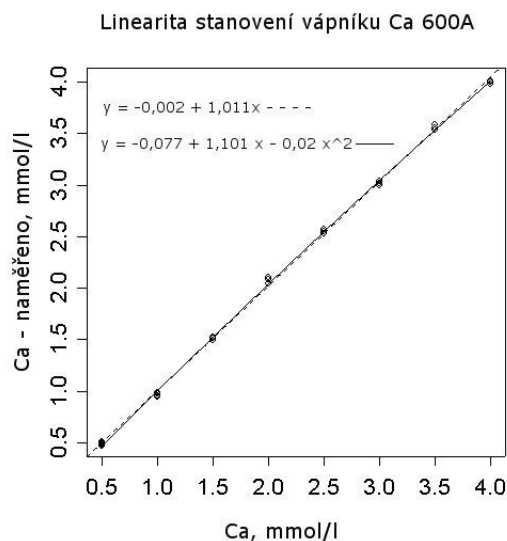
Odhady nepřesnosti v sérii a celkové nepřesnosti byly získány měřením na základě protokolu EP5-A NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)⁷. Celkový počet pozorování byl N=80 u každého séra. Výsledky v tabulce jsou platné pro měření na analyzátoru ADVIA 1650, Bayer.

| Vzorek | Průměr mmol/l | Směrodatná odchylka mmol/l | | | | Celková CV% | N |
|--------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|-------------|---------|----------------|----|
| | | uvnitř série | mezi sériemi | mezi dny | celková | | |
| Nízký sérový pool | 2,025 | 0,0330 | 0,0217 | 0,0146 | 0,0422 | 2,1 | 80 |
| Vysoký sérový pool | 2,921 | 0,0171 | 0,0069 | 0,0399 | 0,0439 | 1,5 | 80 |



LINEARITA

Kvantitativní míra nelinearity stanovení⁸ 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 0,035 mmol/l, což v krajních bodech pracovního rozsahu křivky představuje chybu 7,0 resp. 0,88%. V intervalu rutinních měření koncentrace vápníku v séru i moči nepřesahují relativní difference 1,3 %, což je méně, než analytická nepřesnost. Linearita metody neovlivňuje klinickou interpretaci výsledku stanovení.



Test linearity stanovení vápníku – porovnání přímkou a polynomu II. řádu.

Přímka $y = -0,002 + 1,011x$.

Polynom druhého řádu $y = -0,077 + 1,101x - 0,02x^2$ nejvíce vyhovuje experimentálním datům.

Maximum relativního rozdílu je u koncentrace 0,5 mmol/l. V reálném pracovním rozsahu stanovení vápníku v séru je velikost rozdílu nelinearity 1,3 % menší než nepřesnost metody.



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

| Koncentrace mmol/l | Přímka, mmol/l | Polynom II. řádu, mmol/l | Diference mmol/l | Diference, % |
|--------------------|----------------|--------------------------|------------------|--------------|
| 0,5 | 0,503 | 0,468 | 0,035 | 7,0 |
| 1,0 | 1,009 | 1,004 | 0,005 | 0,5 |
| 1,5 | 1,514 | 1,529 | -0,015 | -1,0 |
| 2,0 | 2,019 | 2,044 | -0,025 | -1,25 |
| 2,5 | 2,525 | 2,550 | -0,025 | -1,0 |
| 3,0 | 3,030 | 3,045 | -0,015 | -0,5 |
| 3,5 | 3,535 | 3,530 | 0,005 | 0,14 |
| 4,0 | 4,041 | 4,005 | -0,035 | -0,88 |

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 hlediska praktického provádění stanovení. Nepřesnost metody je v laboratoři vždy známá z provádění rutinní kontroly kvality.

MEZ DETEKCE A MEZ STANOVITELNOSTI

Výpočtem z kalibrační křivky⁹ byla mez detekce stanovena na 0,06 mmol/l a mez stanovitelnosti na 0,41 mmol/l.

INTERFERENCE

- Bilirubin neinterferuje až do koncentrace 400 $\mu\text{mol/l}$.
- Silná hemolýza a lipémie mohou způsobovat falešně zvýšené hodnoty koncentrací vápníku.
- Pozitivní interferenci způsobují měďnaté ionty¹⁰, je nutné věnovat pozornost, aby nedošlo ke kontaminaci chromogenu biuretovým činidlem používaným ke stanovení celkové bílkoviny.
- Seznam látek, které mohou interferovat s tímto stanovením, publikoval Friedman et al¹¹.



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

SROVNÁNÍ S AAS

Bylo analyzováno 59 vybraných vzorků pacientů metodou AAS na atomovém absorpčním spektrometru SOLAR M6 plamenovou technikou vzduch – acetylen. Stejně vzorky byly analyzovány soupravou Ca 600 A na analyzátoru ADVIA 1650. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny neparametrickou metodou podle Passinga a Babloka¹² a diferenčního grafu. Pro vyhodnocení byl použit program¹³. Na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ není směrnice regresního vztahu signifikantně významná od 1,00 – proporcionální složka chyby není přítomna; signifikantní úsek na ose y je potvrzením přítomnosti konstantní chyby. Bias vypočtený z regresní rovnice je při koncentraci 2,50 mmol/l +1,5%.

Srovnání metody Ca 600 A s metodou stanovení vápníku AAS

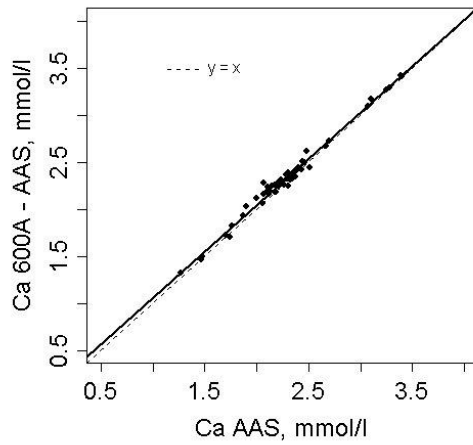
| Passingova-Bablokova regrese | n | Směrnice (95% CI) | Intercept (95% CI) | r * |
|-------------------------------------|----------|--------------------------|---------------------------|------------|
| | 59 | 0,985 (0,947 – 1,010) | 0,076 (0,015 – 0,165) | 0,963 |

* pořadový korelační koeficient

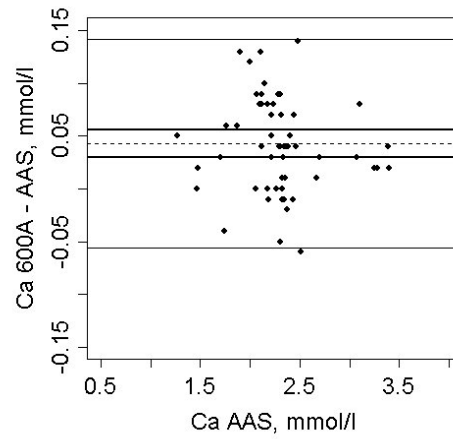
Celková povolená analytická chyba (TEa, CLIA) pro vápník je 0,25 mmol/l, ze srovnávacího grafu je zřejmé, že také chyby není dosaženo ani v nepříznivém případě kombinace náhodné chyby a systematické chyby (bias + 3*s, tj. $0,045 + 3 * 0,042 = 0,17$ mmol/l¹⁴).



Srovnání s AAS



Diferenční graf





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

LITERATURA

1. Racek J. et al.: *Klinická biochemie*, Galen, Praha, 1999, 97-101.
2. Bauer P. J.: *Anal. Biochem.* 110 (1981) 71-72.
3. Michaylova V. and Ilkova P.: *Anal. Chim. Acta* 53 (1971) 194-198.
4. Smith H. G. Jr. and Bauer P.: *Biochemistry* 18 (1979) 5067-5073.
5. Leary N. O., Pembroke A. and Duggan P. F.: *Clin. Chem.* 38/7 (1992) 1342-1345.
6. Tietz N.W. (Ed): *Textbook of Clinical Chemistry*. WB Saunders, 1986, 1350.
7. National Comitée for Clinical Chemistry Laboratory Standards. Evaluation of Precision Performance of Clinical Laboratory Device; Approved Guideline. NCCLS document EP5-A, 1997.
8. Kroll MH., Emancipátor K.: A Theoretical Evaluation of Linearity. *Clin. Chem.* 1993;39:405.
9. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice Plus. Praha 1994, str. 505-6.
10. Janssen J. W. and Helbingar: *Eur. J. Clin. Chem., Biochem.*, 29 (1991) 197-201.
11. Friedman R. B. et al.: *Clin. Chem.* 26 (1980) 61D-4D.
12. 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.
13. Linnet K.: *A Program for Statistical Analysis in Clinical Biochemistry*. Version 4.2.0.
14. Metod Validation – *The comparison of Methods Experiment*
<http://www.westgard.com/lesson23.htm> - dostupné 11.11.2004.



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

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

