

# Návod k použití

## %CDT by HPLC

Reagenční sada, 100 testů

**REF** 195-6660

### *Určení:*

Reagenční sada firmy Bio-Rad %CDT by HPLC slouží pro kvantitativní stanovení karbohydrát-deficientního transferinu v poměru k celkovému transferinu. Sada Bio-Rad % CDT měří relativní množství karbohydrát-deficientního transferinu v poměru k celkovému transferinu.

Pro diagnostické účely *in vitro*

Návod k použití

str. 1 - 30

Postup 2009

600-0095Pcz

**LOT** 000007cz

956:903

**BIO-RAD**

# %CDT by HPLC

CE



 **Bio-Rad Laboratories GmbH**

Postfach 45 01 33

80901 München

Heidemannstraße 164

80939 München

Germany

Phone +49 89 3 18 84-0

Telefax +49 89 3 18 84-100

## Určení

Reagenční sada firmy Bio-Rad %CDT by HPLC slouží pro kvantitativní stanovení karbohydrát-deficientního transferinu v lidském séru. Sada Bio-Rad % CDT měří relativní množství karbohydrát-deficientního transferinu v poměru k celkovému transferinu.

Pro *in vitro* diagnostické účely.

## Varování

Před prvním použitím soupravy je nutné se důkladně seznámit s návodem.

Každý uživatel soupravy by měl používat standardní laboratorní bezpečnostní pomůcky (brýle, plášť, rukavice).

S každým referenčním materiálem (kalibrátorem, kontrolou) a s patientskými vzorky se musí zacházet jako s potencionálně infekčním materiálem v souladu s místními bezpečnostními předpisy. Při opakovaném použití mohou být přístroje nebo nástroje kontaminovány. Dodržujte prosím místní bezpečnostní předpisy.

Likvidace nespotřebovaných roztoků, referenčních materiálu (kalibrátory a kontroly) a ostatních potencionálně infekčních složek má probíhat v souladu s vnitřním řádem laboratoře.

Materiál použitý pro výrobu kalibrátorů, kontrol a Test Mixu byl otestován akceptovanými metodami jako negativní pro Hepatitidu B povrchový antigen (HBsAg), protilátky proti Hepatitidě C (HCV), HIV-1 a HIV-2. Žádná z metod nemůže plně zaručit, že lidský materiál nebude obsahovat tyto a jiné infekční agens. V souladu se správnou laboratorní praxí se s jakýmkoli lidským materiálem musí zacházet jako s potencionálně infekčním pro hepatitidu B (HBV), hepatitidu C (HCV), HIV-1, HIV-2, HTLV-I, HTLV-II a všechny další infekční látky; proto zacházejte s kalibrátory, kontrolami a Test Mixu stejně jako s patientskými vzorky.








Všechny složky dodávané firmou Bio-Rad by neměly být po použití recyklovány vyjma složek přímo uvedených.

## Patenty

Reagenční sada firmy Bio-Rad %CDT by HPLC je založen na patentované technologii.  
U.S. patent 5.788,845  
EP 0172 496B1

## Označení a symboly

Následující **symboly** jsou použity na výrobcích firmy Bio-Rad pro *in vitro* medicínské použití.

	Pro diagnostické účely <i>in vitro</i>
	Šarže
	Použitelné do data RRRR/MM/DD
	Teplotní limity skladování
	Výrobce
	Viz návod k použití
	Katalogové číslo

Následující **označení** jsou použity pro zdravotnické prostředky *in vitro* vyráběné firmou Bio-Rad.

	Mobilní fáze 1		Kontrola 1
	Mobilní fáze 2		Kontrola 2
	Mobilní fáze 3		Kontrolní sada
	Reagencie 1		Kalibrátor 1
	Reagencie 2		Kalibrátor 2
	Reagencie 3		Kalibrační set
	Reagencie 4		Test Mix
	Reagencie 5		Sérum
	Reagenční mix		Pacientský vzorek
	Promývací roztok		Lahvička na vzorek
	Analytická kolona		
	Předkolona		
	Držák kolony		

## Ochranné známky a odkazy

Všechny ochranné známky jsou vlastnictvím jejich firem.

## Obsah

1.0	Úvod .....	1
1.1	Souhrn a vysvětlení principu testu .....	1
1.2	Princip metody .....	2
2.0	Komponenty testu.....	3
2.1	Reagenční sada %CDT by HPLC, 100 testů (REF 195-6660) .....	3
2.2	%CDT by HPLC – Analytická kolona .....	3
2.3	Doplňky dodávané firmou Bio-Rad .....	4
2.4	Odděleně dodávané položky firmou Bio-Rad .....	4
2.5	Doplňky nutné pro stanovení nedodávané firmou Bio-Rad .....	4
2.6	Systémové specifikace pro HPLC .....	5
2.7	Možnosti automatizované přípravy vzorku.....	5
3.0	Testovací postup.....	6
3.1	Sběr vzorků.....	6
3.2	Kontrola kvality.....	7
3.3	Kalibrace .....	7
3.4	Rozpuštění kontrol, CONTROL 1 a CONTROL 2 .....	8
3.5	Rozpuštění kalibrátory, CAL 1 a CAL 2 .....	8
3.6	Rozpuštění Reagencie 3, REAG 3 .....	8
3.7	Rozpuštění Test Mixu, TEST MIX .....	8
3.8	Příprava vzorků.....	9
3.9	HPLC analýza .....	10
3.10	Výpočty bez kalibrace .....	12
3.11	Výpočty s kalibrací .....	13
4.0	Interpretace výsledků.....	14
4.1	Referenční meze bez kalibrace .....	14
4.2	Vliv kalibrace na referenční meze.....	15
4.3	Chromatogram vzorků .....	16
5.0	Charakteristiky metody .....	18
5.1	Přesnost.....	18
5.2	Linearita a výtěžnost .....	19
5.3	Detekční limit .....	19
5.4	Omezení metody.....	20
5.5	Návaznosti .....	22
Dod. A	Technical Specification for Use with the VARIANT™ HPLC System.....	23
Dod. B	Technical Specification for Use with the Agilent HPLC System and Bio-Rad CDM 3.6T .....	25
Dod. C	Technical Specification for Use with the Agilent HPLC System and Agilent Chemstation.....	27
6.0	Literatura.....	30

# 1.0 Úvod

## 1.1 Souhrn a vysvětlení principu testu

Vysoký výskyt nadměrné spotřeby alkoholu je důležitý problém veřejného zdraví. Pro identifikaci jsou používány dotazníky a laboratorní testy. V současné době je CDT (karbohydrát-deficientní transferin) nejvíce specifický biochemický marker pro detekci nadměrného užití alkoholu a pro monitorování abstinence v průběhu léčby v porovnání s jinými markery např.  $\gamma$ -glutamyl transferasou ( $\gamma$ -GT), aspartát aminotransferázou (AST) nebo průměrným korpuskulárním objemem (MCV).<sup>1-4</sup>

Transferin je glykoprotein vázající železo, skládající se z dvou polysacharidových řetězců větvených na variabilní množství negativně nabitých konců zbytky kyseliny sialové. Tyto negativně nabitě kyseliny sialové umožňují separaci transferinu na několik izoform. Železem saturovaný transferin může být separován do nejméně šesti izoform,  $\alpha$ -, mono-, di-, tri-, tetra- a pentasialo.<sup>5</sup> Převládající izoformu tvoří tetrasi-alo, která reprezentuje okolo 80 % po saturaci železem, zatímco disialo izoforma normálně okolo 1 %.<sup>6</sup> Relativní množství disialo izoformy roste po nadměrném pití ( $\geq 50 - 80$  g etanolu/den) v období dvou nebo více týdnů.<sup>7</sup> Dále se mohou vyskytovat asialo a příležitostně monosi-alo izoformy.

Historicky byl součet  $\alpha$ -, mono- a disialo izoform chápán a popisován jako CDT.

V roce 2007 doporučila Pracovní skupina pro CDT při Mezinárodní federaci pro klinickou chemii a laboratorní medicínu (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Working Group of CDT, IFCC-WG CDT), aby byl disialotransferin primární cílovou sloučeninou pro stanovování CDT a byl i jediným analytem pro účely standardizace CDT. Doporučila rovněž použití HPLC metodiky jako analytického pravidla pro prozatímní referenční metodiku do té doby, než bude široce přístupná metodika hmotnostní spektrometrie.<sup>9</sup>

Reagenční sada firmy Bio-Rad %CDT by HPLC měří relativní množství jednoduchých izoform transferinu (např. disialotransferin) v poměru k celkovému množství transferinu jako procenta plochy pod píkem.

Přestože vzácné izoformy transferinu a abnormální koncentrace trisialotransferinu mohou způsobit s ostatními metodikami nesprávné výsledky (genetické D-varianty transferinu nebo zvýšený trisialotransferin falešně pozitivní a genetické B-varianty transferinu falešně negativní výsledky), je identifikace těchto variant možná při použití metodiky Bio-Rad %CDT by HPLC.

Metodika je navržena pro spolehlivé, rychlé a snadné stanovení %CDT v lidském séru a je vhodná jak pro rutinní použití, tak i pro confirmaci.

## 1.0 Úvod

### 1.1 Souhrn a vysvětlení principu testu (pokračování)

Současná omezení při analýze CDT jsou dána nedostatky ve standardizaci, které brání vzájemnému klinickému a analytickému porovnání studií. Doporučení směřující ke standardizaci měření karbohydrát-deficientního transferinu (CDT) byly publikovány Mezinárodní federací klinické chemie a laboratorní medicíny, pracovní skupinou pro CDT (IFCC-WG CDT).<sup>9</sup>

Pro podporu laboratoří při standardizaci jejich testů pomocí Bio-Rad CDT nezávisle na použitém HPLC systému, poskytuje firma Bio-Rad samostatně dostupný dvouhladinový kalibrační materiál.

### 1.2 Princip metody

150 µl séra se smíchá s 450 µl reagenční mix z reagensie 1 - reagensie 5. Po 30 min inkubaci při pokojové teplotě se precipitát odstraní centrifugací. 100 µl supernatantu se nastříkne do HPLC systému.

Pro automatizaci přípravy vzorků nabízí firma Bio-Rad AutoPrep™ Sample Processing System (automatickou pipetovací jednotku) spolu s přídatnou možností nahradit centrifugaci filtračním krokem při použití formátu mikrotitračních destiček. Čas pro přípravu vzorku se tak podstatně zkrátí.

Izoformy transferinu jsou separovány na gradientovém HPLC systému na koloně s výměnou aniontů a měřeny UV-detektorem při 460 nm. Měření při vlnové délce 460 nm je vysoce specifické a dekuje selektivně výhradně železem saturované transferiny.



## 2.0 Komponenty testu

### 2.1 Reagenční sada %CDT by HPLC, 100 testů (REF 195-6660)

REF	Popis
195-6641	REAG 1, Reagencie 1, 1 x 1,5 ml, obsahuje FeCl <sub>3</sub> , skladujte při 2 - 8 °C
195-6642	REAG 2, Reagencie 2, 1 x 1,5 ml, obsahuje NaHCO <sub>3</sub> , skladujte při 2 - 8 °C
195-6643	REAG 3, Reagencie 3, 2 x 30 mg, obsahuje dextransulfát, skladujte při 2 - 8 °C
195-6644	REAG 4, Reagencie 4, 1 x 1,5 ml, obsahuje MgCl <sub>2</sub> , skladujte při 2 - 8 °C
195-6645	REAG 5, Reagencie 5, 1 x 75 ml, Bis-Tris pufr, obsahuje azid sodný (< 0,1 %), skladujte při 2 - 8 °C
195-6651	MP 1, Mobilní fáze 1, 1 x 1700 ml, Bis-Tris pufr, obsahuje azid sodný (< 0,1 %), skladujte při 2 - 8 °C
195-6652	MP 2, Mobilní fáze 2, 1 x 1000 ml, Bis-Tris pufr, obsahuje azid sodný (< 0,1 %), skladujte při 2 - 8 °C
195-6653	MP 3, Mobilní fáze 3, 1 x 250 ml, Bis-Tris pufr, obsahuje azid sodný (< 0,1 %), skladujte při 2 - 8 °C
195-6646	GRD CRTR, Předkolona, 1 x 1, 5 x 4,6 mm ID, pro 100 nástřiků,
195-6664	SAMP VIAL, Lahvičky na vzorky, 1 x 100
195-6661	CD-ROM obsahující Instrukce pro použití

**Poznámka:**

Pokud není jinak specifikováno, uchovávejte reagenzie při pokojové teplotě. Reagenzie jsou stabilní až do data expirace, jestliže jsou skladovány při uvedené teplotě. Pokud není uvedeno jinak, je možné skladovat tyto reagenzie při teplotě 2 – 8 °C.

**Poznámka:**

Nepoužívat po datu expirace, ani nelze míchat reagenzie z různých šarží.

**Poznámka:**

Pro detailní informace o bezpečném zacházení si vyžádejte bezpečnostní list (MSDS).

**Upozornění:**

Některé reagenzie obsahují azid sodný, který může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za vzniku potenciálně explozivních azidů kovů. Prosím dodržujte místní bezpečnostní předpisy.

Nemíchejte s kyselinami!

### 2.2 %CDT by HPLC – Analytická kolona

REF	Popis
195-6662	ANLT CRTR, Analytická kolona, (30 x 4 mm ID), pro 600 nástřiků

## 2.0 Komponenty testu

### 2.3 Doplnky dodávané firmou Bio-Rad

REF	Popis
195-6663	<b>CRTR</b> <b>HLDR</b> , Držák pro <b>ANLT</b> <b>CRTR</b> a <b>GRD</b> <b>CRTR</b>

### 2.4 Odděleně dodávané položky firmou Bio-Rad

REF	Popis
195-6669	<b>CONTROL</b> <b>SET</b> , %CDT Kontrolní sada, 2 hladiny, lyofilizovaný 2 x 1,0 ml <b>CONTROL</b> 1, 2 x 1,0 ml <b>CONTROL</b> 2, skladujte při 2 – 8 °C
195-6650	<b>CAL</b> <b>SET</b> , %CDT Kalibrační sada, 2 hladiny, lyofilizovaný 1 x 1,0 ml <b>CAL</b> 1, 1 x 1,0 ml <b>CAL</b> 2, skladujte při 2 – 8 °C
195-6665	<b>TEST</b> <b>MIX</b> , Test Mix, 1 x 1,0 ml, lyofilizovaný obsahuje azid sodný (< 0,1 %), skladujte při 2 – 8 °C
195-6654	<b>WSH</b> , Promývací roztok, 1 x 1900 ml, obsahuje azid sodný (< 0,1 %)
196-1012	Mikrozkumavky, 1,5 ml, 1 x 1000
195-5232	Perforovatelným uzávěrem pro mikrozkumavky, 1 x 500
210-0500M	AutoPrep™ Sample Processing System
270-2349	Software for %CDT by HPLC, Sample Preparation on AutoPrep™
195-5255	CDM™ Systém software pro vyhodnocení klinických výsledků

### 2.5 Doplnky nutné pro stanovení nedodávané firmou Bio-Rad

1. Odměrné pipety pro 10 µl, 400 µl, 1,0 ml a 1,5 ml.
2. Výměnná pipeta na vzorky, 150 µl.
3. Odměrná pipeta pro 450 µl, (např. Eppendorf Multipipette®)
4. Centrifuga pro 1,5 ml lahvičky na vzorky, vhodné pro centrifugaci při 10 000 x g
5. Mixér typu Vortex
6. Destilovaná/deionizovaná voda nebo voda kvality HPLC.

#### Upozornění:

Materiál pro výrobu kalibrátorů, kontrola a test mix byl otestován jako negativní pro Hepatitidu B povrchový antigen (HBsAg), protilátky proti HIV-1 a Hepatitidu C virus. Žádná z metod nemůže plně zaručit, že lidský materiál nebude obsahovat tyto a jiné infekční agens. V souladu se správnou laboratorní praxí se s jakýmkoli lidským materiálem musí zacházet jako s potenciálně infekčním pro hepatitidu B (HBV), hepatitidu C (HCV), HIV-1, HIV-2, HTLV-I, HTLV-II a jiné infekční látky. Proto zacházejte s kalibrátory i s kontrolami a test mix stejně jako s pacientskými vzorky.

## 2.0 Komponenty testu

### 2.6 Systémové specifikace pro HPLC

Vhodné jsou trojkové HPLC systémy. Požadavky na parametry jednotlivých komponent jsou následující:

1. PUMPA: Schopná průtoku 1,4 ml/min a tlaku do 100 kg/cm<sup>2</sup> a schopná vytlačit trojkový gradient pufru (podrobnosti viz příložené technické specifikace).
2. TLUMIČ PULSŮ: Schopný generovat základní linii (baseline) bez vzruchu při 10 mAUFs na UV detektoru.
3. ODPLYNĚNÍ: Je doporučeno pro zamezení tvorby vzduchových bublin používat odplyňovací zařízení.
4. INJEKTOR: Nutnost zajištění přesného nástřiku 100 µl vzorku. Může se použít jak manuální smyčka, nástřík injektorem nebo automatický dávkovač vzorku.
5. TERMOSTAT KOLONY: Musí být schopen ohřívat analytickou kolonu a držák kolony. Musí udržovat konstantní teplotu 35 °C - 40 °C (podrobnosti viz příložené technické specifikace).
6. UV DETEKTOR: Schopný měřit při 460 nm a 10 mAUFs.
7. ZAPISOVAČ/INTEGRÁTOR: Schopný monitorovat výstup z UV detektoru.

Bio-Rad VARIANT™-HPLC Systém je vhodný systém konfigurovaný pro tuto aplikaci.

Specifikace pro další vhodné HPLC systémy jsou dostupné firmou Bio-Rad. Uživatelé jiných HPLC systémů by měli validovat výkonnostní charakteristiky testu na svém HPLC systému před testováním klinických vzorků.

### 2.7 Možnosti automatizované přípravy vzorku

Existují dvě možnosti pro urychlení a usnadnění možného testování, praktická automatizovaná příprava vzorků jakožto bezobslužný proces s úsporou času a dále pak řešení pro zákazníky s vysokými objemy vzorků (více jak 100 vzorků v jednom běhu):

#### a) Použití 96-ti jamkových filtračních mikrotitračních desek

Namísto běžných mikrozku mávek na vzorky jsou použity speciální filtrační mikrotitrační desky pro odstranění sraženiny pomocí filtrace namísto centrifugace.

a/nebo

#### b) Použití systému AutoPrep™ Sample Processing System

Systém AutoPrep Sample Processing System poskytuje v kombinaci s reagenční sadou %CDT metodou HPLC automatizovanou metodiku pro výhodné zpracování vzorků. Je vhodný pro spolehlivé, rychlé a snadné pipetování lidského séra a reagensů %CDT. Systém umožňuje použití mikrozku mávek na vzorky stejně jako mikrotitračních desek.

Podrobné popisy pro obě varianty jsou k dispozici u firmy Bio-Rad.

## 3.0 Testovací postup

- Před prvním testováním, prosím, přečtěte pozorně návod k použití. Přesné dodržování návodu je nezbytné pro správné provedení testu.
- Před začátkem testování je nutné všechny reagenty, kalibrátory, kontroly a vzorky nechat vytemperovat na pokojovou teplotu (15 - 30 °C).
- Otevřené reagenty jsou stabilní 8 týdnů při uvedené skladovací teplotě. Otevřené mobilní fáze a Promývací roztok jsou stabilní 12 týdnů při pokojové teplotě. Tyto stabilita může být zajištěna pouze pokud se zamezí kontaminaci reagentů.
- Deklarované hodnoty a jejich rozpětí u konkrétních šarží kalibrátorů a kontrol se zjistí z příložených příbalových letáků.
- Při práci s reagenty a vzorky používejte ochranné rukavice
- Nepoužívejte reagenty po datu expirace, ani nemíchejte různé šarže reagentů.
- Nepoužívejte kalibrátory a kontroly jestliže je lyofilizát hnědý nebo je-li jejich lahvička poškozená.
- Jestliže dostanete po testování nesmyslné výsledky, kontaktujte zástupce firmy Bio-Rad.
- Otvírejte lahvičky opatrně. Lyofilizované reagenty jsou plněny za podtlaku.
- Současná analýza kontrol při analýze vzorků je doporučována (%CDT kontrolní sada **CONTROL SET**)

### 3.1 Sběr vzorků

Pro analýzu je zapotřebí 150 µl séra.

Vzorky séra jsou stabilní 48 hodin při 2 – 8 °C, mohou být však skladovány zamražené (< -20 °C) po dobu 3 měsíce.<sup>6</sup>

Zamražené vzorky nechte nejprve roztát, zahřát na pokojovou teplotu a zamíchat na vortexu po dobu 30 min před použitím. Vlivy opakovaného rozmrazení a zamrazení nebyly zkoumány.

#### **Upozornění:**

*S patientskými vzorky se musí zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem v souladu s místními bezpečnostními předpisy.*

## 3.0 Testovací postup

### 3.2 Kontrola kvality

- 3.2.1 Sada kontrol by se měla stanovovat s každou skupinou patientských vzorků. Jestliže všechny hodnoty kontrol jsou v udávaném rozpětí, pokračuje se s analýzou patientských vzorků. Jestliže jedna nebo více kontrol vypadne z deklarovaného rozpětí, je nutné zkontrolovat nastavené parametry a provedený postup. Po nalezení a opravě předpokládané chyby se znovu připraví kontroly a patientské vzorky. Znovu se proměří kontroly. Pokud jsou kontroly v udávaném rozpětí, proměřte vzorky.
- 3.2.2 Patientské vzorky a kontroly by měly být zpočátku měřeny duplicitně, dokud nemá laboratoř zkušenosti s prováděním testu.

### 3.3 Kalibrace

Sada kalibrátorů firmy Bio-Rad %CDT by HPLC Calibrator Set je navržena pro kalibraci kvantitativního měření disialotransferinu v lidském séru pomocí testovací soupravy Bio-Rad %CDT by HPLC. Kalibrátory Bio-Rad %CDT napomáhají laboratořím při standardizaci jejich testování pomocí Bio-Rad %CDT nezávisle na jimi použitým HPLC systémem, tudíž umožňují lepší srovnatelnost výsledků %CDT. Firma Bio-Rad vytvořila systém vnitřní návaznosti pro určení hodnot jejich CDT kalibrátorů, u kterých je pro stanovení CDT primární cílovou molekulou disialotransferin (DST).

Systém návaznosti firmy Bio-Rad je založen na připravovaných interních primárních a sekundárních CDT standardech, které byly odvozeny od vysoce čištěných glykoforem transferinu lidského původu. Pro určení hodnot bylo měření CDT nastaveno podle IFCC předpokládané HPLC referenční metody.<sup>6</sup>

- 3.3.1 Souprava kalibrátorů by měla být změřena po instalaci nové analytické kolony a/nebo po výměně předkolony.
- 3.3.2 Doporučujeme provádět měření s kalibrátory v tripletu. Zcela minimální podmínkou je provádět měření s kalibrátory v dubletu.

## 3.0 Testovací postup

### 3.4 Rozpuštění kontrol, **CONTROL 1** a **CONTROL 2**

- 3.4.1 Do kontrol **CONTROL 1** a **CONTROL 2** přidejte 1,0 ml destilované nebo deionizované vody.
- 3.4.2 Uzavřete lahvičku a nechte kontroly **CONTROL** volně stát 10 min. Opatrně protřepávejte do rozpuštění a dosažení homogenicity.
- 3.4.3 Rozpuštěná kontrola **CONTROL** je stabilní 4 dny při 2 – 8 °C.
- 3.4.4 Rozpuštěná kontrola **CONTROL** se může rozdělit na alikvotní části a ty mohou být skladovány při -20 °C po dobu 12 týdnů.

### 3.5 Rozpuštění kalibrátory, **CAL 1** a **CAL 2**

- 3.5.1 Do **CAL 1** a **CAL 2** přidejte 1,0 ml destilované nebo deionizované vody.
- 3.5.2 Uzavřete lahvičku a nechte **CAL** volně stát 10 min. Opatrně protřepávejte do rozpuštění a dosažení homogenicity.
- 3.5.3 Rozpuštěná **CAL** je stabilní 4 dny při 2 – 8 °C.
- 3.5.4 Rozpuštěná **CAL** se může rozdělit na alikvotní části a ty mohou být skladovány při -20 °C po dobu 12 týdnů.

### 3.6 Rozpuštění Reagencie 3, **REAG 3**

- 3.6.1 Do **REAG 3** přidejte 1,5 ml destilované nebo deionizované vody.
- 3.6.2 Uzavřete lahvičku a nechte **REAG 3** volně stát 10 min. Opatrně protřepávejte do rozpuštění a dosažení homogenicity.
- 3.6.3 Rozpuštěná **REAG 3** je stabilní 8 týdnů při 2 – 8 °C.

**Poznámka:**

Reagencie 3 má tendenci přilnout na stěnu a dno lahvičky a poté se pomalu rozpouští.

### 3.7 Rozpuštění Test Mixu, **TEST MIX**

- Bio-Rad **TEST MIX** se používá pro kontrolu parametrů HPLC systému. Pro **TEST MIX** není požadována žádná příprava vzorků.
- 3.7.1 Do **TEST MIX** přidejte 1,0 ml destilované nebo deionizované vody.
  - 3.7.2 Uzavřete lahvičku a nechte **TEST MIX** volně stát 10 min. Opatrně protřepávejte do rozpuštění a dosažení homogenicity.
  - 3.7.3 Pro analýzu je nastříkováno 100 µl.
  - 3.7.4 Rozpuštěný **TEST MIX** je stabilní 48 hod při 2 – 8 °C.

## 3.0 Testovací postup

### 3.8 Příprava vzorků

3.8.1 Pro každý **CAL**, **CONTROL** a **SAMP** připravte **REAG MIX** z **REAG 1** - **REAG 5** v následujícím množství:

na <b>CAL</b> , <b>CONTROL</b> a <b>SAMP</b> :	10 µl <b>REAG 1</b>
	+ 10 µl <b>REAG 2</b>
	+ 10 µl <b>REAG 3</b>
	+ 10 µl <b>REAG 4</b>
	+ 500 µl <b>REAG 5</b>

**Poznámka:**

Pro pipetování **CAL**, **CONTROL** a **SAMP** je doporučeno používat výměnné pipety.

**Poznámka:**

Každý běh se začíná s blankem. Proto prosím uvažujte o dalším objemu **REAG MIX** při přípravě vzorků.

**Poznámka:**

Po provedené centrifugaci je sedimentační peleta stabilní 1 den při pokojové teplotě a 2 dny při teplotě 4 °C. Jestliže je injekční systém/autosampler schopen nasát pouze supernatant bez dotyku sedimentační pelety, pak není nutné převádět supernatant do nové mikrozkumavky. Je rozhodně doporučeno používat pro vzorky mikrozkumavky s perforovatelným uzávěrem (viz 2.4). Je nezbytné nastavit jehly injekčního systému.

Tento **REAG MIX** musí být vždy připraven čerstvý. Připravte tedy **REAG MIX** jen v množství požadovaném pro jeden běh bezprostředně před začátkem přípravy vzorků.

3.8.2 Pro každou **CAL**, **CONTROL** a **SAMP** napipetujte **150 µl** séra do odpovídající označené lahvičky **SAMP VIAL**.

3.8.3 Přidejte **450 µl** **REAG MIX** z 3.8.1 do každé lahvičky na vzorky **SAMP VIAL**.

3.8.4 Důkladně promíchejte na mixéru typu vortex.

3.8.5 Inkubujte po dobu minimálně 30 minut a maximálně 60 minut při pokojové teplotě, nebo inkubujte 24 hodin při teplotě 2 - 8 °C.

3.8.6 Centrifugujte 10 min při 10 000 x g.

3.8.7 Opatrně napipetujte 400 µl supernatantu do lahvičky v automatickém podavači (autosampleru).

3.8.8 Pro analýzu je nastříkováno 100 µl.

3.8.9 Supernatanty je stabilní 24 hod při pokojové teplotě před jejich nástřikem.

## 3.0 Testovací postup

### 3.9 HPLC analýza

#### 3.9.1 Nastavení přístroje

Požadavky na parametry systému a nastavení přístroje jsou dostupné firmou Bio-Rad (viz dod.1 - dod. C).

#### 3.9.2 Instalace nové analytické kolony, ANLT CRTR

Nová analytická kolona ANLT CRTR s předkolonou GRD CRTR musí být vypláchnutá před **prvním** použitím. Nainstalujte kolonu ANLT CRTR s předkolonou GRD CRTR do HPLC systému se zapnutým termostatem kolony. Pumpujte mobilní fázi MP 1 do systému po dobu 20 min požadovanou rychlostí průtoku až do dosažení stabilní základní linie (baseline).

**Poznámka:**

Prosím buďte si jisti, že při průtoku používáte analytickou kolonu ANLT CRTR jen ve správném směru označeném šipkou na analytické koloně ANLT CRTR.

#### 3.9.3 Výměna krytu kolony

Pro zajištění dobré životnosti vyměňte předkolonu GRD CRTR u analytické kolony ANLT CRTR po 100 nástřicích. Pumpujte mobilní fázi MP 1 do systému po dobu 10 -15 min požadovanou rychlostí průtoku až do dosažení základní linie.

#### 3.9.4 Postup testu

3.9.4.1 Nainstalujte analytickou kolonu ANLT CRTR s předkolonou GRD CRTR do HPLC systému se zapnutým termostatem kolony. Pumpujte mobilní fázi MP 1 do systému požadovanou rychlostí průtoku na ekvilibraci systému až do dosažení baseliny.

#### 3.9.4.2 Běhu bez kalibrátoru

Připravte lahvičku SAMP VIAL s blankem, se vzorky SAMP a kontrolami CONTROL, jak je popsáno v kapitole 3.8 a umístěte je do automatického podavače (autosampler). Je doporučeno následující pořadí vzorků:

Pos 1	Blank
Pos 2	Blank
Pos 3	<span>CONTROL</span> <span>1</span>
Pos 4	<span>CONTROL</span> <span>2</span>
Pos 5 – N	<span>SAMP</span>
Pos N + 1	<span>CONTROL</span> <span>1</span>
Pos N + 2	<span>CONTROL</span> <span>2</span>

**Poznámka:**

Přidejte 2 Blank ke každému běhu.

**Poznámka:**

U Blanku umístěte lahvičku SAMP VIAL se supernatantem kontroly CONTROL nebo vzorku SAMP.

**Poznámka:**

N se vztahuje na poslední vzorek SAMP zahnutý do běhu analýzy.



## 3.0 Testovací postup

### 3.9.4 Postup testu (pokračování)

#### 3.9.4.3 Běhu s kalibrátorem

Připravte lahvičku **SAMP VIAL** s blankem, se **CAL**, **CONTROL** a **SAMP**, jak je popsáno v kapitole 3.8 a umístěte je do automatického podavače (autosampler). Je doporučeno následující pořadí vzorků:

Pos 1	Blank
Pos 2	Blank
Pos 3	<b>CAL 1</b>
Pos 4	<b>CAL 1</b>
Pos 5	<b>CAL 1</b> *
Pos 6	<b>CAL 2</b>
Pos 7	<b>CAL 2</b>
Pos 8	<b>CAL 2</b> *
Pos 9	<b>CONTROL 1</b>
Pos 10	<b>CONTROL 2</b>
Pos 11 - N	<b>SAMP</b>
Pos N + 1	<b>CONTROL 1</b>
Pos N + 2	<b>CONTROL 2</b>

\* doporučení; minimální požadavek je testování v dubletu

Kalibrace by měla být provedena po instalaci nové analytické kolony a po každé výměně předkolony (po provedení 100 nástřiků). Rekalibrace je rovněž doporučena v případě, že dojde k posunu kontrolních hodnot mimo přípustné rozpětí.

Pro kalibraci použijte průměrné hodnoty analyzovaných opakování **CAL 1** a **CAL 2**.

3.9.4.4 Nastříkněte blank, **CAL 1**, **CAL 2**, **CONTROL 1**, **CONTROL 2** a **SAMP**. Porovnejte hlavní píky s dřívějšími chromatogramy. Jemný posun retenčního času je hlavně důsledkem stárnutí **ANLT CRTR** nebo **GRD CRTR**. Proším respektujte požadavky **GRD CRTR** a **ANLT CRTR** na počet nástřiků.

3.9.4.5 Interval mezi nástřiky je přibližně 10 minut. V závislosti na použité instrumentaci může být i o několik minut delší.

3.9.4.6 Jestliže bude systém použit opět během tří dnů po ukončení analýzy, můžete **ANLT CRTR** s **GRD CRTR** nechat v HPLC systému spolu s pumpou a vypnutým UV-detektorem. Je doporučeno pravidelně proplachovat těsnění HPLC pumpy vodou (skrz určený vstup).

Pokud se stanovení provádí až za delší dobu, je doporučeno nechat **ANLT CRTR** s **GRD CRTR** 30 minut proplachovat **MP 1**, poté vyjmout ze systému a skladovat bezpečně uzavřenou. HPLC systém se propláchně 100 ml HPLC vody. Těsnění pumpy se propláchně HPLC vodou skrz určený vstup.

#### Poznámka:

Pořadí vzorků při kalibraci může být závislé na použitém integračním programu. Doporučené pořadí je používáno spolu s programem VARIANT™ HPLC a s programem Agilent Chemstation.

## 3.0 Testovací postup

### 3.10 Výpočty bez kalibrace

Po analýze kontrol a vzorků může být procentuelní hodnota izoformem k celkovému transferinu vypočtena pomocí následující rovnice:

například pro % asialotransterin (%AST):

$$\%AST = \frac{\text{plocha píku AST} \times 100}{\text{celková plocha píků (AST+MonoST+DST+TriST+TeST+PeST)}}$$

**Poznámka:**

*MonoST (Monosialotransferrin) se objevuje jen zřídka a ve velmi nízkém množství v porovnání s AST a DST.*

V souladu s doporučeními vydanými IFCC je disialotransferrin (DST) primární cílovou molekulou při stanovování CDT.<sup>9</sup>

$$\%DST = \frac{\text{plocha píku DST} \times 100}{\text{celková plocha píků (AST+MonoST+DST+TriST+TeST+PeST)}} = \%CDT$$

V závislosti na použitém analytickém software jsou procentuelní hodnoty jednotlivých hledaných izoformem (např. %AST a %DST) vypočítávány automaticky.

Další informace jsou k dispozici od místního zastoupení firmy Bio-Rad.

Reportování výsledků by mělo být ve shodě s jednotlivými laboratorními procedurami.

## 3.0 Testovací postup

### 3.11 Výpočty s kalibrací

Kalibrační běhy jsou použity pro výpočet percentuelních hodnot DST izoformy k celkovému transferinu pomocí následující rovnice:

$$\%DST = \frac{\text{plocha píků DST} \times 100}{\text{celková plocha píků (AST+MonoST+DST+TriST+TeST+PeST)}}$$

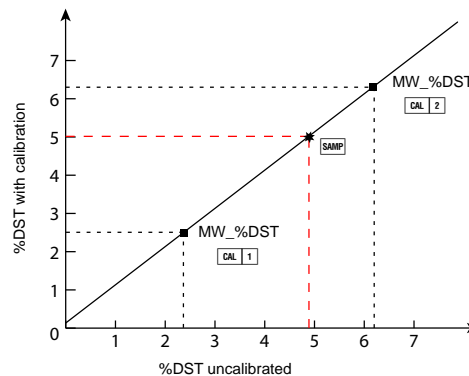
Pro obě hladiny kalibrátoru jsou průměrné hodnoty %DST vypočítávány samostatně:

$$MW\_ \%DST_{\text{CAL } 1} = \frac{(\%DST_{\text{CAL } 1_1} + \%DST_{\text{CAL } 1_2} + \dots + \%DST_{\text{CAL } 1_N})}{N}$$

$$MW\_ \%DST_{\text{CAL } 2} = \frac{(\%DST_{\text{CAL } 2_1} + \%DST_{\text{CAL } 2_2} + \dots + \%DST_{\text{CAL } 2_N})}{N}$$

V systému lineárních souřadnic jsou průměrné hodnoty %DST obou hladin kalibrátorů vloženy na x-osu grafu a cílové hodnoty kalibrátorů pak na y-osu grafu a oba vzniklé body lze proložit přímkou.

Z kalibračního grafu pak lze přímo odečítat kalibrované hodnoty %DST jednotlivých vzorků.



Při použití Bio-Rad %CDT kalibrátorů v kombinaci s integračním systémem je nutno se ujistit, že použitý integrační systém je schopen provést dvoubodovou kalibraci pro percentuelní vyhodnocení plochy. Pro pomoc při vytvoření kalibrační rovnice je doporučeno kontaktovat dodavatele integračního systému. Pro validaci kalibrační metody je doporučeno provést opětovné měření kalibrátorů a kalibrovaných vzorků jako vzorků pacientů. Hodnoty musí být shodné s hodnotami kalibrátorů.

System Bio-Rad CDM™ je schopen provádět tento druh kalibrace.

## 4.0 Interpretace výsledků

### 4.1 Referenční meze bez kalibrace

Referenční rozpětí výsledků by mělo být stanoveno každou laboratoří, aby odpovídalo charakteristice testované populace. Pro význam reference mohou být použity následující interní data až do doby, kdy laboratoř zanalyzuje dostatečný počet vzorků pro stanovení svého vlastního referenčního rozpětí.

Vzorky od 110 dospělých mužů a žen s normálním  $\gamma$ -GT byly testovány pomocí metody Bio-Rad %CDT by HPLC. Analýza byla provedena při použití přístroje Variant HPLC a přístroje Agilent 1100 Series HPLC. Pro všechny vzorky byly hodnoty DST < 2.0 % a nebyl detekován žádný AST.

#### Přístroj Variant HPLC

Průměrná hodnota %CDT byla 1,23 se standardní odchylkou 0,23 %. Interval spolehlivosti 95 % (průměr  $\pm$  2SD) byl 0,77 – 1,7 % CDT.

Tato data byla využita pro určení následujících referenčních rozsahů:

Interval spolehlivosti nad 95 % (průměr + 2SD):	1,7 % CDT
Interval spolehlivosti nad 99,7 % (průměr + 3SD):	1,9 % CDT

#### Přístroj Agilent 1100/1200 Series HPLC

Průměrná hodnota %CDT byla 1,1 se standardní odchylkou 0,24 %. Interval spolehlivosti 95 % (průměr  $\pm$  2SD) byl 0,63 – 1,57 % CDT.

Tato data byla využita pro určení následujících referenčních rozsahů:

Interval spolehlivosti nad 95 % (průměr + 2SD):	1,6 % CDT
Interval spolehlivosti nad 99,7 % (průměr + 3SD):	1,8 % CDT

Intervaly spolehlivosti se mohou měnit v závislosti na testované populaci a na vybavení, které je pro testování využíváno a musí být tedy určeny pro každou laboratoř.

U pozitivního výsledku testu musí být brán zřetel na klinické faktory a profesionální úsudek, pokud by výsledek testu vedl k vážným důsledkům pro jakoukoli osobu (viz. Kapitola 5.4, Omezení metody)

## 4.0 Interpretace výsledků

### 4.2 Vliv kalibrace na referenční meze.

Jak bylo zmíněno dříve, referenční meze si musí vytvořit samostatně každá laboratoř ve shodě s vlastnostmi a charakteristikami testované populace. Pro význam reference mohou být použity následující interní data až do doby, kdy laboratoř zanalyzuje dostatečný počet vzorků pro stanovení svého vlastního referenčního rozpětí.

Data z externí studie, kde byly použity Bio-Rad CDT kalibrátory společně se soupravou Bio-Rad CDT by HPLC ukazují, že dochází k malému posunu referenčního rozpětí. Současné intervaly spolehlivosti 95 % a 99,7 % byly přepočítány s použitím průměrného kalibračního faktoru z výsledků studie pro rutinní použití kalibrace.

#### Přístroj Variant HPLC a Přístroj Agilent 1100/1200 Series HPLC

Interval spolehlivosti nad 95 % (průměr + 2SD):	1,90 % CDT
Interval spolehlivosti nad 99,7 % (průměr + 3SD):	2,15 % CDT

Intervaly spolehlivosti se mohou měnit v závislosti na testované populaci a na vybavení, které je pro testování využíváno a musí být tedy určeny pro každou laboratoř.

U pozitivního výsledku testu musí být brán zřetel na klinické faktory a profesionální úsudek, pokud by výsledek testu vedl k vážným důsledkům pro jakoukoli osobu (viz. Kapitola 5.4, Omezení metody).

## 4.0 Interpretace výsledků

### 4.3 Chromatogram vzorků

Následující chromatogramy jsou určeny jako pomůcka při interpretaci výsledků.

Bio-Rad CDM System

PATIENT REPORT

%CDT\_by\_HPLC

Patient Data

Sample ID:  
Patient ID:  
Name:  
Sex:  
DOB:  
Physician:  
Comments:

Analysis Data

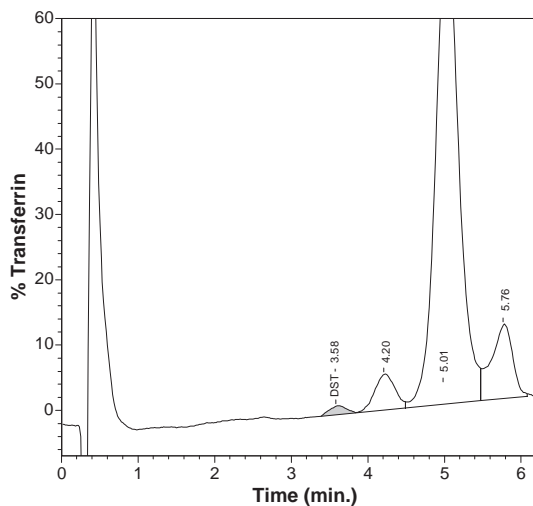
Analysis Performed:  
Injection Number:  
Run Number:  
Vial Number:  
Report Generated:  
Operator ID:  
Supervisor ID:

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min.)	Area
DST	---	1.08	3.581	3688
TriST	---	5.51	4.205	18769
TeST	---	81.75	5.011	278420
PST	---	11.66	5.765	39713

Total Area: 340590

AST concentration = %  
DST concentration = 1.08 %

Analysis comments:



**Obrázek 1:**  
Chromatogram vzorku s normálním %CDT.

## 4.0 Interpretace výsledků

### 4.3 Chromatogram vzorků (pokračování)

Bio-Rad CDM System

PATIENT REPORT

%CDT\_by\_HPLC

**Patient Data**

Sample ID:  
Patient ID:  
Name:  
Sex:  
DOB:  
Physician:  
Comments:

**Analysis Data**

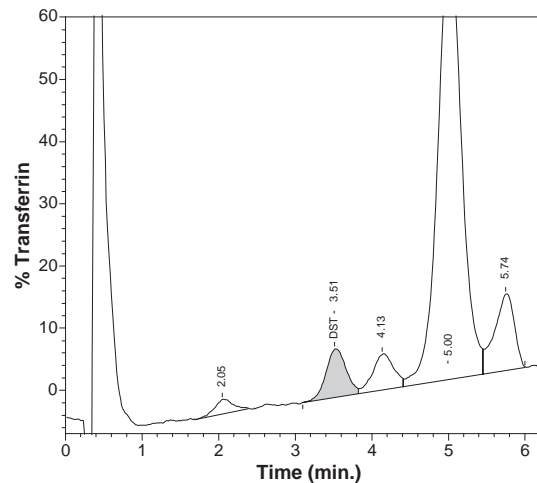
Analysis Performed:  
Injection Number:  
Run Number:  
Vial Number:  
Report Generated:  
Operator ID:  
Supervisor ID:

Peak Name	Calibrated Area %	Area %	Retention Time (min.)	Area
AST	---	1.97	2.047	4575
DST	---	6.73	3.513	15606
TriST	---	5.85	4.135	13556
TeST	---	74.63	4.996	173061
PST	---	10.82	5.744	25081

Total Area: 231879

AST concentration = 1.97 %  
DST concentration = 6.73 %

Analysis comments:



**Obrázek 2:**  
Chromatogram vzorku se zvýše-  
ným %CDT

## 5.0 Charakteristiky metody

### 5.1 Přesnost

Přesnost Bio-Rad %CDT by HPLC byla stanovena studií podle směrnic NCCLS EP5-A „Ověření charakteristiky přesnosti klinických chemických zařízení“. V této studii bylo denně prováděno duplicitní testování po dobu 20 pracovních dní. V každém běhu byly provedeny analýzy alikvotů s nízkou a vysokou koncentrací DST v dubletu. Analýza byla provedena na přístroji Agilent 1100, data pro přístroj Variant HPLC jsou k dispozici na vyžádání. Hodnoty dosažené v této studii jsou v následující tabulce:

%DST	Vzorek s nízkou koncentrací	Vzorek s vysokou koncentrací
Průměrná hodnota [% DST]	1,14	6,25
Přesnost v sérii [% CV]	4,90	1,71
Přesnost mezi dny/sériemi [% CV]	3,49	1,40
Celková přesnost [% CV]	5,91	2,17

**Tabulka 1:**  
Přesnost %DST

%AST	Vzorek s nízkou koncentrací	Vzorek s vysokou koncentrací
Průměrná hodnota [% AST]	0,96	2,73
Přesnost v sérii [% CV]	7,56	5,66
Přesnost mezi dny/sériemi [% CV]	5,05	3,58
Celková přesnost [% CV]	8,93	6,58

**Tabulka 2:**  
Přesnost %AST



## 5.0 Charakteristiky metody

### 5.2 Linearita a výtěžnost

Pro stanovení linearity a výtěžnosti Bio-Rad %CDT by HPLC v uvedeném rozpětí byly odvozeny nízké a vysoké koncentrace DST a AST následovně:

#### DST

Nízký: Vzorek séra pacienta s DST hodnotou 0,8 %.

Vysoký: Vzorek séra pacienta smíchaný s DST pro dosažení koncentrace DST 23,5 %.

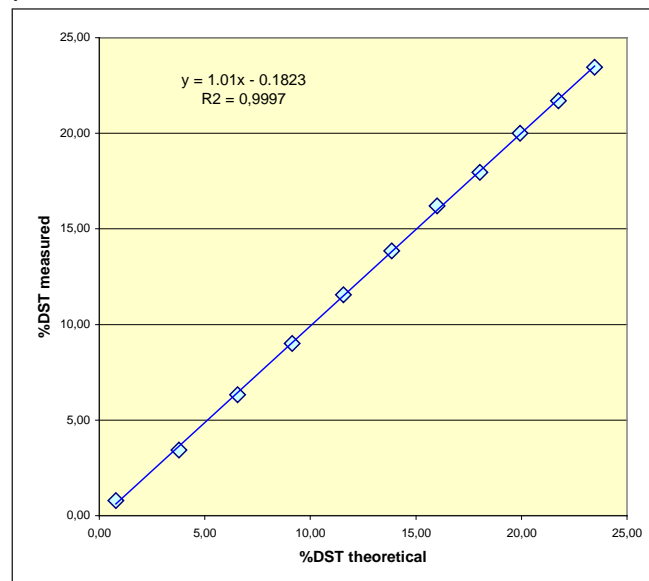
#### AST

Nízký: Vzorek séra s nedetekovatelným AST.

Vysoký: Vzorek séra pacienta s hodnotou AST 3,5 %.

Vzorek s vysokou koncentrací byl různými poměry naředěn se vzorkem s nízkou koncentrací pro dosažení specifických relativních procent DST nebo AST (teoretické procenta DST nebo AST). Tyto naředěné vzorky byly analyzovány (byly sledovány procenta DST nebo AST). Procentní výtěžnost byla stanovena dělením pozorovaných DST nebo AST procent teoretickými procenty DST nebo AST a vynásobením výsledku stokrát (viz Obrázek 3). Analýza byla provedena na přístroji Agilent 1100, data pro přístroj Variant HPLC jsou k dispozici na vyžádání.

Výtěžnost v celém lineárním rozpětí byla 98,8 % pro DST a 99,4 % pro AST.



Obrázek 3:  
Linearita %DST

### 5.3 Detekční limit

Citlivost metody závisí na citlivosti UV/VIS detektoru. Nízké hladiny jako 0,3 % DST nebo AST mohou být stanoveny dostatečně citlivým detektorem.

## 5.0 Charakteristiky metody

### 5.4 Omezení metody

#### 5.4.1 Ikterické vzorky

Pro studium vlivu ikteru na %CDT by HPLC byly analyzovány vzorky sér se zvýšenými hladinami bilirubinu.

Vyšší koncentrace bilirubinu mohou interferovat chromatografií.

#### 5.4.2 Lipemické vzorky

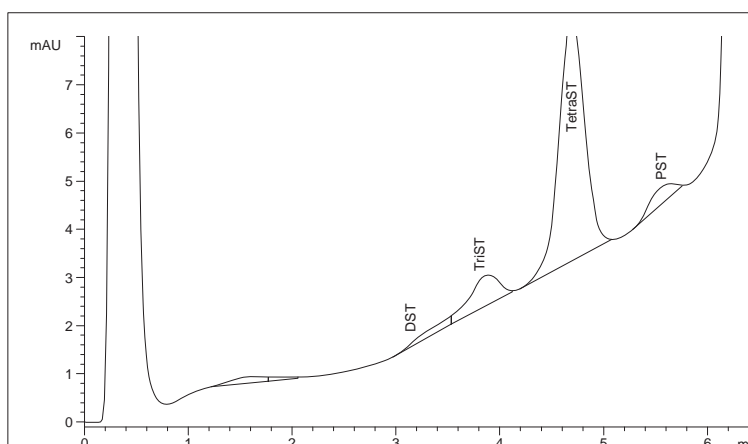
Za účelem studia vlivu obsahu triglyceridů na %CDT by HPLC byly analyzovány lipemické vzorky smíchané s analyty. Vzorek s vysokým obsahem triglyceridů byl naředěn různými poměry se vzorkem bez triglyceridů pro dosažení různé koncentrace triglyceridů.

Výsledky dokazují, že koncentrace triglyceridů do 6,000 mg/dl neovlivňují %CDT.

Pro snížení rizika ucpání kolony je doporučena filtrace supernatantu při koncentraci triglyceridů nad 2000 mg/dl (Chromafil CA-20/25 filtr, Macherey & Nagel).

#### 5.4.3 Hemolytické vzorky

Pro simulaci hemolytických vzorků bylo sérum smícháno s vypranými erytrocyty k dosažení koncentrace 5 %. Vzorky byly porovnány s nesmíchaným sérem. Nebyl pozorován žádný významný vliv pro hemolytických hladiny do 0,5 %. Vyšší hemolytické hladiny zvyšují významně baselinu kvůli dalším elučním komponentám za "penta-sialo" píkem, takže interferují se stanovením % CDT (Obrázek 4).



**Obrázek 4:**  
Chromatogramy vzorků s vysokou hemolytickou hladinou

## 5.0 Charakteristiky metody

### 5.4 Omezení metody (pokračování)

#### 5.4.4 Zvýšený trisialotransferin

Ve vzorcích se zvýšenou hladinou trisialotransferinu (> 7 %) může být zaznamenána přítomnost izoformy monosialotransferin.<sup>7</sup> Jelikož monosialotransferin nelze odlišit a separovat od DST, může docházet při stanovení DST k jeho interferenci. Chromatogramy vzorků se zvýšenou hladinou trisialotransferinu musí být tedy interpretovány velmi opatrně.

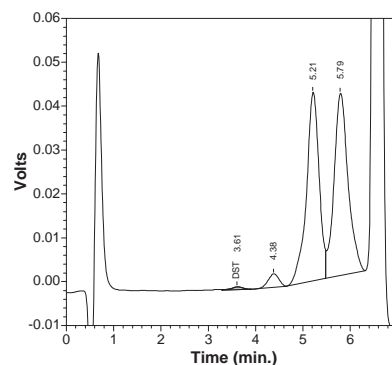
#### 5.4.5 Varianty transferinu

##### 5.4.5.1 Genetické varianty transferinu

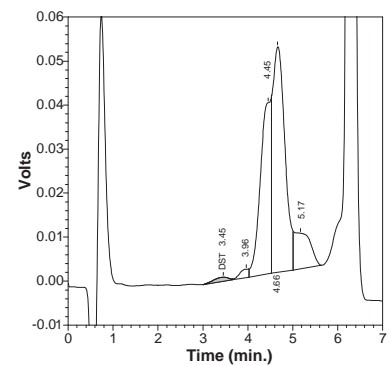
C-forma je běžnou formou transferinu. Častými variantami jsou heterozygotní formy s B- a D-formou. Pro tyto varianty (BC a CD) není možné správné měření % CDT, protože izoformy B a C, respektive C a D se přesmykují.

U BC-heterozygotního transferinu ko-eluuje DST pík B-formy s TriST píkem C-formy a TriST pík B formy se překrývá s TetraST píkem C-formy.

U CD-heterozygotního transferinu se DST pík D-izoformy eluuje před DST píkem C-formy a TriST pík D-formy ko-eluuje DST píkem C-formy.



**Obrázek 5.**  
Chromatogram BC varianty



**Obrázek 6.**  
Chromatogram CD varianty

Bio-Rad %CDT by HPLC může identifikovat všechny tyto varianty.

## 5.0 Charakteristiky metody

### 5.4 Omezení metody (pokračování)

#### 5.4.5.2 CDG syndrom

Vrozené poruchy glykosylace (CDG), dříve označované jako syndrom karbohydrát-deficientního-glykoproteinu, mohou způsobovat zvýšené hladiny %CDT.<sup>7,8</sup>

Zdraví nositelé CDG Ia mohou vykazovat zvýšené hladiny %CDT.<sup>7</sup>

Bylo prokázáno, že metoda stanovení %CDT pomocí HPLC může být použita pro předběžnou diagnostiku CDG u dětí.<sup>8</sup>

#### 5.4.6 Snížená celková plocha transferinu

Vzorky od pacientů trpících anémií nebo onemocněním jater vykazují snížené celkové plochy transferinu a tudíž i snížené plochy %CDT. Z tohoto důvodu může být tedy obtížné určit hladinu %CDT.

### 5.5 Návaznosti

System návaznosti firmy Bio-Rad je založen na připravovaných interních primárních a sekundárních CDT standardech, které byly odvozeny od vysoce čištěných glykoforem transferinu lidského původu. Pro určení hodnot bylo měření CDT nastaveno podle IFCC předpokládané HPLC referenční metody [Clin. Chem. 2003; 49: 11, 1881-90].

# Dod. A Technical Specification for Use with the VARIANT™ HPLC System

## Hardware requirements

The VARIANT™ HPLC System is a modified VARIANT™ Hemoglobin Testing System (REF 270-0021) with installed VARIANT™ HPLC System Hardware Upgrade Kit (REF 270-0576).

## System Settings

CDM provides the user with a completely configured test in the SETUP/Test Screen. CDM has an Update Kit button located on the SETUP/Test Screen that allows the user to download all assay parameters from a CD ROM media, which is included in each test kit.

## Installation of MP

Please install the reagent tubings according to the VARIANT™ Hemoglobin Testing System manual. The %CDT by HPLC test uses three different  MP and a  WSH. Please make sure that  MP 1 is connected to the inlet port "Buffer A",  MP 2 to "Buffer B",  MP 3 to "Buffer C",  WSH to "Wash".

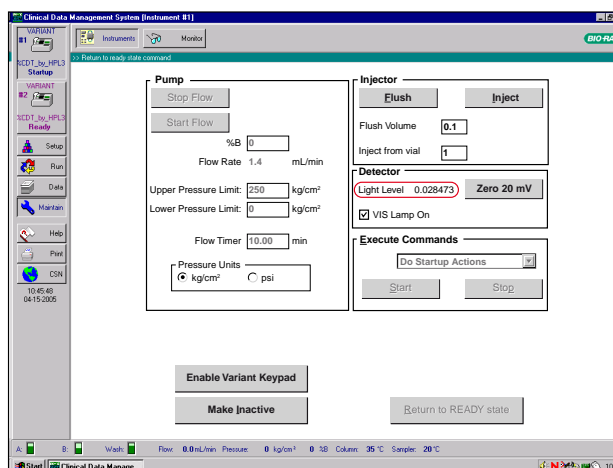
## Installation on a new system

Please use the method file located in the subdirectory "Variant\CopyTest" when installing the method on a new system with the program Copytest. Then update kit with the method file in the directory "Variant". Attention: It is absolutely important to shutdown and restart CDM after installing a new method.

## Testing the detector signal

The detector signal must be checked before **each** analysis run. Press button "Return to Active" and confirm the question "Do you want to perform the automatic warm-up operations?". Following equilibration, the detector signal shown in the window MAINTAIN, Detector: Light Level must be between 0.015 and 0.040 Volt.

If the value is outside this range, press button "Enable Keypad". Press button "Make Inactive" and negate the question "Do you want to perform the shutdown operations?". On the Variant instrument type "9" to start pump A and confirm with "Enter". Adjust pump B to 0.0 % and the Total Flow Rate to 1.4 mL/min. Choose OK and press the End button. On the VARIANT™ instrument keypad type "11" to select "AD Converter Level" (command 11 on the LCD screen) and confirm with Enter. Use right arrow key to select "One Pulse generated". Use up/down arrow keys to shift the detector voltage into the range 15.000 to 40.000. Use arrow keys to select "End" and confirm with "Enter". Press "Power" to transfer instrument control to CDM. In CDM press button "Return to Active".



## Dod. A Technical Specification for Use with the VARIANT™ HPLC System

### Note:

Prizpůsobení retenčních časů v případě potřeby se provádí v CDM softwaru v tabulce „peak table“. Retenční čas můžete modifikovat až o  $\pm 0,3$  min.

### Maintenance

#### Clean the Flow Cell

Flow cell cleaning and decontamination should be part of a regularly maintenance program. Recommended intervals: every  $\frac{1}{2}$  year or every 2000 injections. A dirty flow cell can adversely affect test results. This procedure requires the use of the VARIANT™ Flow Cell Cleaning Kit, [REF](#) 270-0197.

### Charakteristiky metody

#### Přesnost

Přesnost Bio-Rad %CDT by HPLC byla stanovena studií podle směrnic NCCLS EP5-A „Ověření charakteristiky přesnosti klinických chemických zařízení“. V této studii bylo denně prováděno duplicitní testování po dobu 10 pracovních dní. V každém běhu byly provedeny analýzy alikvotů s nízkou a vysokou koncentrací DST v dubletu.

	Vzorek s nízkou koncentrací		Vzorek s vysokou koncentrací	
	%DST	%AST	%DST	%AST
Průměrná hodnota [% DST]	1,29	1,03	6,39	2,73
Přesnost v sérii [% CV]	5,97	10,01	3,65	3,46
Přesnost mezi dny/sériemi [% CV]	4,27	7,02	2,01	2,80
Celková přesnost [% CV]	7,22	12,02	4,09	4,38

## Dod. B Technical Specification for Use with the Agilent HPLC System and Bio-Rad CDM 3.6T

### Hardware requirements

Following Agilent modules are needed for running the %CDT by HPLC test:

- Quaternary Pump G1311A or Isocratic Pump with Upgrade G1310A + G1352A
- Control Module G1323B (when using Bio-Rad CDM) / G4208A Instant Pilot
- Autosampler G1313A / G1329A
- Column Compartment G1316A
- VW Detector G1314A

Following Agilent modules are recommended for running the %CDT by HPLC test:

- Degasser G1322A or G1379A

### Hardware settings

The 6 µL preheating capillary of the Column Compartment should be used. Connect MP 1 to the pump inlet connector A, MP 2 to the inlet connector B and MP 3 to the inlet connector C.

### Installation on a new system

Please use the method file located in the subdirectory “Agilent\CDM 36T\CopyTest” when installing the method on a new system with the program Copytest. Then update kit with the method file in the directory “Agilent”. Attention: It is absolutely important to shutdown and restart CDM after installing a new method.

### System Settings

When using the Bio-Rad CDM version 3.6T to collect and process data, the Agilent 1100 system is controlled by the G1323B Control Module / G4208A Instant Pilot.

CDM provides the user with a configured test in the SETUP/Test Screen. CDM has an Update Kit button located on the SETUP/Test Screen that allows the user to download parameters from a CD-ROM media, which is included in each test kit. Following below are the evaluated instrument settings for the G1323B Control Module / G4208A Instant Pilot.

Select Settings [F1] in Analysis Screen			
<u>3</u> WP Sampler	Inj. Vol	100 µL	
	More...		
	<u>2</u> Optimization	Overlap	
		Injection Cycle	
		at 0.35 min	
		elapsed	
		runtime	
<u>4</u> Col Comp	Temp	40 °C	
<u>5</u> VW Detector	Wavelength	460 nm	
	Peakwidth	> 0.4 min (8s)	
	Analog		
	Signal Source	Absorbance	
	Attenuation	62.5 mAU	
	More...		
	Auto Balance	Prerun	

## Dod. B Technical Specification for Use with the Agilent HPLC System and Bio-Rad CDM 3.6T

Analytical Cartridges, lot number CN C036    Analytical Cartridges, lot number CN C022

Select Settings [F1] in Analysis Screen					
1 HPLC System	Stoptime	9.50 min			
	Posttime	OFF			
2 Quat Pump	%B	0.0			
	%C	0.0			
	%D	OFF			
	Flow	1.4 mL/min			
	Upper Pressure Limit	70 bar			
Timetable					
		Time	Composition		
			%B	%C	%D
		0.00	13.0	0.0	OFF
		1.47	31.0	0.0	OFF
		2.94	45.0	0.0	OFF
		3.93	61.0	0.0	OFF
		4.93	77.0	0.0	OFF
		5.20	88.0	0.0	OFF
		5.42	97.0	0.0	OFF
		5.75	0.0	100.0	OFF
		6.42	0.0	100.0	OFF
		6.45	0.0	0.0	OFF

Select Settings [F1] in Analysis Screen					
1 HPLC System	Stoptime	9.50 min			
	Posttime	OFF			
2 Quat Pump	%B	0.0			
	%C	0.0			
	%D	OFF			
	Flow	1.4 mL/min			
	Upper Pressure Limit	70 bar			
Timetable					
		Time	Composition		
			%B	%C	%D
		0.00	10.0	0.0	OFF
		2.10	30.0	0.0	OFF
		3.83	55.0	0.0	OFF
		4.83	70.0	0.0	OFF
		5.17	75.0	0.0	OFF
		5.65	80.0	0.0	OFF
		5.75	0.0	100.0	OFF
		6.42	0.0	100.0	OFF
		6.45	0.0	0.0	OFF

**Note:** Přizpůsobení retenčních časů v případě potřeby se provádí v CDM softwaru v tabulce „peak table“. Retenční čas můžete modifikovat až o  $\pm 0,3$  min.



## Dod. C Technical Specification for Use with the Agilent HPLC System and Agilent Chemstation

### Hardware requirements

Following Agilent modules are needed for running the %CDT by HPLC test:

- Quaternary Pump G1311A or Isocratic Pump with Upgrade G1310A + G1352A
- Control Module G1323B (when using Bio-Rad CDM) / G4208A Instant Pilot
- Autosampler G1313A / G1329A
- Column Compartment G1316A
- VW Detector G1314A

Following Agilent modules are recommended for running the %CDT by HPLC test:

- Degasser G1322A or G1379A

### Hardware settings

The 6  $\mu$ L preheating capillary of the Column Compartment should be used. Connect **MP 1** to the pump inlet connector A, **MP 2** to the inlet connector B and **MP 3** to the inlet connector C.

### System Settings

Following below are the evaluated instrument settings. Only modifications of the default method are listed.

Autosampler	
Injection Volume	100 $\mu$ L
Optimization	Overlap Injection Cycle 0.35 min. after Injection
Draw/Inject Speed	500 $\mu$ L/min

Column Compartment	
Temperature	40 $^{\circ}$ C

VW Detector	
Wavelength	460 nm
Peakwidth	> 0.4 min (8 s)
Attenuation	62.5 mAU
Autobalance	Prerun

**Note:** Retention times are provided as an example and may have to be adjusted for lot specific parameters.

Prizpůsobení retenčních časů v případě potřeby se provádí v tabulce „calibration table“. Retenční čas můžete modifikovat až o  $\pm 0,3$  min.

# Dod. C Technical Specification for Use with the Agilent HPLC System and Agilent Chemstation

## Analytische Kartuschen, Lot CN C036

Quaternary Pump			
Flow	1.4 mL/min		
Stop Time	9.50 min		
Post Time	OFF		
Solvents	100% A		
Maximum Pressure	70 bar		
Timetable			
	Time	Solv. B	Solv. C
	0.00	13.0	0.0
	1.47	31.0	0.0
	2.94	45.0	0.0
	3.93	61.0	0.0
	4.93	77.0	0.0
	5.20	88.0	0.0
	5.42	97.0	0.0
	5.75	0.0	100.0
	6.42	0.0	100.0
	6.45	0.0	0.0

Integration Event Table		
Initial	Slope Sensitivity	0.0277
Initial	Peak Width	0.2795
Initial	Area Reject	0.1421
Initial	Height Reject	0.0082
Initial	Shoulders	DROP
0.000	Integration	OFF
1.200	Integration	ON
1.400	Slope Sensitivity	0.001
2.400	Fixed Peak Width	0.4
2.800	Fixed Peak Width	0.1
5.500	Baseline Next Valley	ON
5.500	Slope Sensitivity	0.1
6.000	Integration	OFF

Calibration Settings		
Calculate	Area Percent	
Relative Non-ref. Window	15.00 %	
Analyte Table		
	Time	
	1.800	AST
	2.500	MonoST
	3.050	DST
	3.850	TriST
	4.800	TetraST
	5.500	PentaST

## Analytische Kartuschen, Lot CN C022

Quaternary Pump			
Flow	1.4 mL/min		
Stop Time	9.50 min		
Post Time	OFF		
Solvents	100% A		
Maximum Pressure	70 bar		
Timetable			
	Time	Solv. B	Solv. C
	0.00	10.0	0.0
	2.10	30.0	0.0
	3.83	55.0	0.0
	4.83	70.0	0.0
	5.17	75.0	0.0
	5.65	80.0	0.0
	5.75	0.0	100.0
	6.42	0.0	100.0
	6.45	0.0	0.0

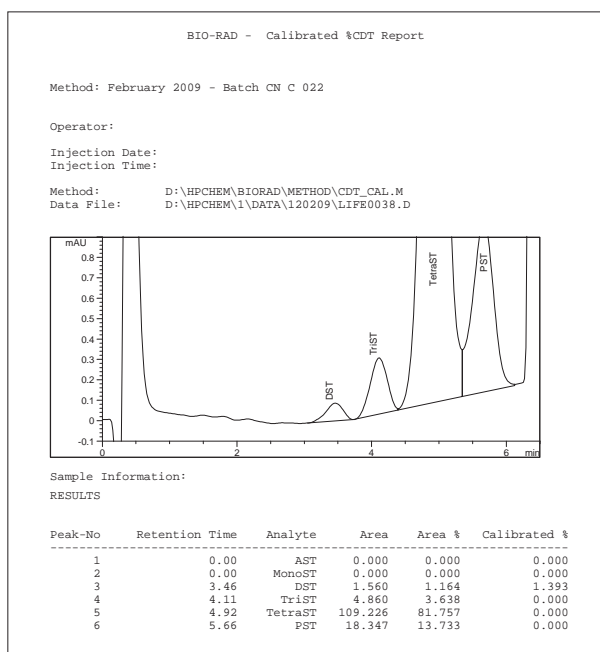
Integration Event Table		
Initial	Slope Sensitivity	0.1
Initial	Peak Width	0.1
Initial	Area Reject	0.3
Initial	Height Reject	0
Initial	Shoulders	DROP
0.000	Integration	OFF
1.200	Integration	ON
1.400	Slope Sensitivity	0.001
2.400	Fixed Peak Width	0.4
2.800	Fixed Peak Width	0.1
5.500	Baseline Next Valley	ON
5.500	Slope Sensitivity	0.1
6.200	Integration	OFF

Calibration Settings		
Calculate	Area Percent	
Relative Non-ref. Window	15.00 %	
Analyte Table		
	Time	
	1.600	AST
	3.000	MonoST
	3.400	DST
	4.100	TriST
	4.900	TetraST
	5.600	PentaST

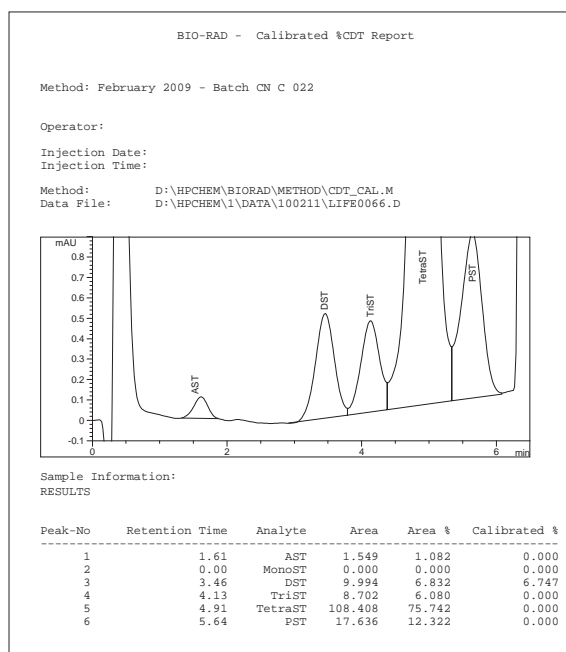
# Dod. C Technical Specification for Use with the Agilent HPLC System and Agilent Chemstation

## Integration

The following chromatograms are intended to aid in the interpretation of results. Chromatograms with different peak pattern or baseline should be carefully evaluated.



Obrazek 7: Chromatogram vzorku s normálním %CDT



Obrazek 8: Chromatogram vzorku se zvýšeným %CDT

## 6.0 Literatura

1. Stibler H., "Carbohydrate-Deficient Transferrin in Serum: A New Marker of Potentially Harmful Alcohol Consumption Reviewed", *Clin. Chem.*, 37:12, 2029-37 (1991)
2. Stibler H., "Diagnosis of alcohol-related neurological diseases by analysis of carbohydrate-deficient transferrin in serum", *Acta Neurol. Scand.* 88, 279-83 (1993)
3. Meerkerk G. J., Njoo K. H., Bongers I. M., Trienekens P., van Oers J. A., "The specificity of the %CDT assay in general practice: the influence of common chronic diseases and medication on the serum %CDT concentration", *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 22:4, 908-913 (1998)
4. Arndt T., "Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation", *Clin. Chem.*, 47, 13-27 (2001)
5. Jeppsson J. O., "Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)", in: Thomas L, ed. *Clinical Laboratory Diagnostics*. Frankfurt; TH-Books, 656-659 (1998)
6. Helander A., Husa A., Jeppsson J. O., "Improved HPLC Method for Carbohydrate-deficient Transferrin in Serum", *Clin. Chem.*, 49:11, 1881-1890 (2003)
7. Helander A., Eriksson G., Stibler H., Jeppsson J. O., "Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin Quantification in the Identification of Alcohol Abuse", *Clin. Chem.*, 47:7, 1225-1233 (2001)
8. Helander A., Bergström J., Freeze H.H., "Testing for Congenital Disorders of Glycosylation by HPLC Measurement of Serum Transferrin Glycoforms", *Clin. Chem.*, 50:5, 954-957 (2004)
9. Jeppson J. O., Arndt T., Schellenberg F., Wielders J. P. M., Anton F. A., Whitfield J. B., Helander A., "Towards standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method", *Clin. Chem. Lab. Med.*, 45(4): 558-562 (2007)
10. Helander A., Bergström J. P., "Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum using the Bio-Rad %CDT by HPLC test", *Clin. Chim. Acta*, 371: 187-190 (2006)
11. Oberrauch W., Bergmann A. C., Helander A., "HPLC and mass spectrometric characterization of a candidate reference material for the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT)", *Clin. Chim. Acta* (2008), in press



600-0095Pcz

Lot 000007cz

956.903

**BIO-RAD**

## Deutschland

### Bio-Rad Laboratories GmbH

Postfach 45 01 33

80901 München

Heidemannstraße 164

80939 München

Phone +49 89 3 1884-0

Telefax +49 89 3 18 84-100

AUSTRALIA, Bio-Rad Laboratories Pty. Ltd. Unit 1 Block Y, 391 Park Road, Regents Park NSW 2143 • Phone 61-2-9914-2800 • Telefax 61-2-9914-2888  
AUSTRIA, Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H., Hummelgasse 88/3-6, A-1130 Vienna • Phone 43-1-877-8901 • Telefax 43-1-876-5629  
BELGIUM, Bio-Rad S.A.-N.V. Begoniastraat 5, B-9810 Nazareth Eke • Phone 32-9-385-5511 • Telefax 32-9-385-6554  
BRAZIL, Bio-Rad do Brasil, Rua dos Invalidos 212, 5 Andar, Lapa CEP 20231-020, Rio de Janeiro • Phone 5521-507-6191 • 5521-224-6524  
CANADA, Bio-Rad Laboratories, Ltd., 2403 Guénette Montreal, Québec H4R2E9 • Phone 1-514-334-4372 • Telefax 1-514-334-4415  
CZECH REPUBLIC, Bio-Rad spol. s.r.o., Nad ostrovem 1119/7, 147 00 Prague 4 • Phone 420-2-41430532 • Telefax 420-2-41431642  
CHINA, Bio-Rad China Limited, 14 Zhi Chun Road, Haidian District, Beijing 100088 • Phone 86-10-6205-1850 • Telefax 86-10-6205-1876  
DENMARK, Bio-Rad Laboratories, Generatorvej 8 C, 2730 Herlev, Denmark • Phone 45-4452-1000 • Telefax 45-4452-1001  
FINLAND, Bio-Rad Laboratories, Pihatorma 1 A, FIN-02240 Espoo • Phone 358-9-804-22-00 • Telefax 358-9-804-11-10  
FRANCE, Bio-Rad S.A., 3 boulevard Raymond Poincaré 92430 Marnes-la-Coquette • Phone 33-1-4795-6000 • Telefax 33-1-4741-9133  
GREECE, Bio-Rad Laboratories Mepe, 2-4 Mesogion Avenue, Athens Tower, 11527-Athens • Phone 30-210-7774345 • Telefax 30-210-7774376  
HONG KONG, Bio-Rad Pacific Ltd., Unit 1101, 11/F, DCH Commercial Centre, 25 Westlands Road, Quarry Bay, Hongkong • Phone 852-2789-3300 • Telefax 852-2789-1257  
INDIA, Bio-Rad Laboratories (India) Pte. Ltd., C-248 Defence Colony, New Delhi 110024 • Phone 91-11-460-3676 • Telefax 91-11-461-0765  
ISRAEL, Bio-Rad Laboratories Ltd., 14 Homa Street, New Industrial Area, Rishon Le Zion 75150 • Phone 972-3-9514127 • Telefax 972-3-9514129  
ITALY, Bio-Rad Laboratories S.r.l., Via Cellini 18/A, 20090 Segrate, Milan • Phone 39-02-216091 • Telefax 39-02-21609-399  
JAPAN, Nippon Bio-Rad Laboratories K.K., 7-18 Higashi-Nippori 5-Chome, Arakawa-ku, Tokyo 116-0014 • Phone 81-3-5811-6290 • Telefax 81-3-5811-6282  
KOREA, Bio-Rad Korea Ltd., 10th FL., Hyunjuk Building, 832-41, Gangnam-gu, Seoul 135-080, Korea • Phone 82-2-3473-4460 • Telefax 82-2-3472-7003  
LATIN AMERICA, Bio-Rad Latin America, 14100 Palmetto Frontage Road, Suite 101, Miami Lakes, Florida 33016 • Phone 305-894-5950 • Telefax 305-894-5960  
MEXICO, Bio-Rad Laboratorios Mexico, S.A. de C.V., Moras No 759 Col Del Valle, C.P. 03100 Mexico, D.F. • Phone 525-534-2552 • Telefax 525-524-5555  
THE NETHERLANDS, Bio-Rad Laboratories BV, Fokkerstraat 10, 3905 KV Veenendaal • Phone 31-318-540666 • Telefax 31-318-542216  
NEW ZEALAND, Bio-Rad New Zealand, Unit B 156 Bush Road, Albany, Auckland • Phone 64-9-415-2280 • Telefax 64-9-415-2284  
NORWAY, Bio-Rad Laboratories, Johan Scharffenbergs vei 91, N-0694 Oslo • Phone 47-23-38-41-30 • Telefax 47-23-38-41-39  
POLAND, Bio-Rad Laboratories, ul Barburki 8, 04511 Warsaw • Phone 48-22-815-39-51 • Telefax 48-22-812-66-82  
PORTUGAL, Bio-Rad Laboratories Lda, Edifício Prime, Av. Quinta Grande, n° 53-3B, Alfragide, 2610-156 Amadora • Phone 351-21-472-7700 • Telefax 351-21-472-7777  
RUSSIA, Bio-Rad Laboratories Ltd., 23/3 Posledny Pereulok, 103045 Moscow • Phone 7-095-721-14-00 • Telefax 7-095-721-14-12  
SINGAPORE, Bio-Rad Laboratories (Singapore) Pte. Ltd., 211 Henderson Road #03-02, Henderson Industrial Park, Singapore 159552 • Phone 65-272-9877 • Telefax 65-273-4835  
SOUTH AFRICA, Bio-Rad Laboratories (Pty) Ltd., 34 Bolton Road, Parkwood, Johannesburg 2193 • Phone 27-11-442-85-08 • Telefax 27-11-442-85-25  
SPAIN, Bio-Rad Laboratories S.A., Lopez de Hoyos 245-247, 28043 Madrid • Phone 34-91-590-5200 • Telefax 34-91-590-5211  
SWEDEN, Bio-Rad Laboratories A.B., Ekensbergsv., 128, Vintergatan 1, Box 1097, S-172 22, Sundbyberg • Phone 46-8-555-127-00 • Telefax 46-8-555-127-80  
SWITZERLAND, Bio-Rad Laboratories Nenzlingenweg 2, CH-4153 Reinach BL • Phone 41-61-717-95-55 • Telefax 41-61-717-95-50  
THAILAND, Bio-Rad Laboratories Ltd., 1st & 2nd Floor, Lumpini I Bldg., 239/2 Rajdamri Rd., Lumpini, Pathumwan, Bangkok 10330 • Phone 662-651-8311 • Telefax 662-651-8312  
UNITED KINGDOM, Bio-Rad Laboratories Ltd., Bio-Rad House, Maxted Road, Hemel Hempstead, Herts HP2 7DX • Phone 44-208-328-2000 • Telefax 44-208-328-2550  
USA, Bio-Rad Laboratories, 4000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547 • Phone 01 510 724 7000 • Telefax 01 510 741 5824