

## **IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA**

Enzymeimmunoassay for the quantitative determination of 1,25-dihydroxyvitamin D in human serum or plasma

Technique immuno-enzymatique pour la détermination quantitative de la 1,25-dihydroxyvitamine D dans le sérum ou le plasma humain

Enzymimmunassay zur quantitativen Bestimmung von 1,25-dihydroxyvitamin D in menschlichem Serum oder Plasma

Dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della 1,25-diidrossivitamina D nel siero o plasma umano

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de 1,25-dihidroxivitamina D en muestras de suero o plasma humano



**REF**

AC-62F1



96

English.....	3
Français.....	11
Deutsch.....	20
Italiano.....	29
Español.....	38

## Intended Use

### *For In Vitro Diagnostic Use*

The IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA kit is a complete assay system intended for the purification of 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25D) in human serum or plasma by immunoextraction followed by quantitation by enzyme immunoassay. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in the assessment of 1,25D deficiency associated with renal disease in adult populations.

### Summary and Explanation<sup>(1)</sup>

Vitamin D is a commonly used collective term for a family of closely related molecules derived from naturally occurring 7-dehydrocholesterol (pro-vitamin D<sub>3</sub>). Pro-vitamin D<sub>3</sub> undergoes photolytic conversion in the skin to 'parent' vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) upon exposure to sunlight. This compound is biologically inactive, but enters the circulation and is hydroxylated in the liver to active 25-hydroxyvitamin D (25D). A small proportion of this becomes further hydroxylated in the kidney to the highly potent calcitropic hormone 1,25D.

1,25D is largely bound to Vitamin D Binding Protein and albumin in the circulation.

1,25D is one of the major regulators of calcium (and phosphate) metabolism, stimulating intestinal calcium absorption and increasing bone resorption. It also inhibits parathyroid hormone (PTH) production both by direct action on the parathyroid glands and indirectly by raising serum calcium levels. 1,25D production is itself stimulated by parathyroid hormone (PTH), thus providing an effective control loop.

Hypovitaminosis D is commonly associated with dietary insufficiency, most frequently with vegetarianism, and is also associated with low exposure to sunlight (e.g. the elderly and institutionalised) and skin pigmentation.

1,25D production appears to be impaired in early renal failure though this may not be a renal effect. In late-stage renal failure, 1 $\alpha$ -hydroxylation may be impaired, with low 1,25D levels as a result.

### Method Description

The IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA kit is a complete assay system for the purification of 1,25D in patient samples by immunoextraction followed by quantitation by EIA. Patient samples are delipidated and 1,25D extracted from potential cross-reactants by incubation for 90 minutes with a highly specific solid phase monoclonal anti-1,25D. The immunoextraction gel is then washed and purified 1,25D eluted directly

into glass assay tubes. Reconstituted eluates and calibrators are incubated overnight with a highly specific sheep anti-1,25D. Then a portion of this is incubated for 90 minutes with shaking in microplate wells which are coated with a specific anti-sheep antibody. 1,25D linked to biotin is then added and the plate shaken for a further 60 minutes before aspiration and washing. Enzyme (horseradish peroxidase) labelled avidin is added and binds selectively to complexed biotin and, following a further wash step, colour is developed using a chromogenic substrate (TMB). The absorbance of the stopped reaction mixtures are read in a microtitre plate reader, colour intensity developed being inversely proportional to the concentration of 1,25D.

### Warnings and Precautions

The IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IDS Limited will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

**CAUTION:** this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

### Human Serum: Controls CTRL

Human material used in the preparation of this product has been tested by FDA recommended assays for the presence of antibody to Human Immunodeficiency Virus (HIV I and II), Hepatitis B surface antigen, antibody to Hepatitis C, and found negative. As no test can offer complete assurance that infectious agents are absent, the reagents should be handled in accordance at Biosafety Level 2.

### Sodium Azide

Xn. Harmful: Calibrators CAL and Controls CTRL contain sodium azide (NaN<sub>3</sub>) >0.1% (w/w) (<1%).

R22 Harmful if swallowed.

R52/53 Harmful to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

S46 If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

S60 This material and/or its container must be disposed of as hazardous waste.

Some reagents in this kit contain sodium azide as a preservative, which may react with lead, copper or brass plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build up.

### Elution Reagent

Elution Reagent [REAG 2] contains ethanol.

R11 Highly Flammable (flashpoint 13°C).

S7 Keep container tightly closed.

S16 Keep away from sources of ignition - No Smoking.

### 0.5M hydrochloric acid

Stop Solution [HCL] contains 0.5M hydrochloric acid.

R36/38 Irritating to eyes and skin.

S26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

### Tetramethylbenzidine

TMB Substrate [TMB] contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

R21/22 Harmful by contact with skin and if swallowed.

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

### Preparation of Reagents

**Calibrators** [CAL]: Calibrators [CAL] are supplied in lyophilised form. Reconstitute immediately before use. Add 1 mL distilled or deionised water to each bottle. Replace stopper and leave to reconstitute for 5-10 minutes, inverting several times to ensure complete reconstitution. DO NOT RECONSTITUTE ON A ROLLING MIXER - this will result in potency loss.

**Controls** [CTRL]: Controls [CTRL] are supplied in lyophilised form. Reconstitute immediately before use. Add 1.2 mL distilled or deionised water to each bottle. Replace stopper and leave 15 - 20 minutes to reconstitute, inverting several times to ensure complete reconstitution.

If Calibrators [CAL] or Controls [CTRL] are to be used more than once, they must be frozen (-20°C) within 15 minutes of reconstitution. When re-using frozen Calibrators [CAL] or Controls [CTRL], thaw at room temperature, mix well and use within 15 minutes.

**Primary Antibody Solution** [Ab SOLN]: Primary Antibody Concentrate [Ab 6x] is supplied as a concentrate. Add the entire contents of the bottle of

Primary Antibody Buffer [Ab BUF], replace the stopper and invert several times to ensure complete mixing.

**1,25D Biotin solution** [1,25D BIOTIN SOLN]: 1,25D Biotin Concentrate [1,25D BIOTIN 6x] is supplied lyophilised. Add the entire contents of the bottle of the 1,25D Biotin Buffer [1,25D BIOTIN BUF]. Replace the stopper and stand for 10-15 minutes at room temperature. Invert several times to ensure complete reconstitution. If 1,25D Biotin solution [1,25D BIOTIN SOLN] is to be used more than once, it must be frozen (-20°C) within 2 hours of reconstitution. When using frozen 1,25D Biotin solution [1,25D BIOTIN SOLN] thaw at room temperature, mix well and use within 2 hours.

**Wash Solution:** Prepare by adding the contents of each bottle of Wash Concentrate [WASHBUF 20x] to 950 mL of distilled or de-ionised water. Store at room temperature.

All other reagents are supplied ready for use.

Allow all reagents to come to room temperature before use.

Reagents should be mixed by repeated inversion prior to use in the assay

### Shelf Life and Storage of Reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C.

Reconstituted Calibrators [CAL], Controls [CTRL] and 1,25D Biotin solution [1,25D BIOTIN SOLN] are stable at -20°C for 8 weeks.

Antibody Solution [Ab SOLN] is stable at 2-8°C for 8 weeks.

Unused Antibody Coated Plate [MICROPLAT] strips must be returned to the foil pouch with the desiccant sachet and selfsealed. Store at 2-8°C for up to 8 weeks.

Wash Solution can be stored at room temperature for up to 8 weeks.

### Indications of possible deterioration of kit reagents

The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents.

A decrease in the maximum binding.

A high non-specific binding.

A shift in the slope of the curve from its normal position.

### Specimen Collection and Storage

The assay should be performed using serum or plasma (EDTA or heparin) specimens. Specimens should be separated as soon as possible after collection. For long term storage, store at -20°C. Avoid repeated freeze/thaw of samples.

## Procedure

### Materials Provided

1. **CAL 0-6 - Calibrators**

(REF AC-6201A - AC-6201G):

Lyophilised BSA buffer containing 1,25-dihydroxyvitamin D and <0.4% sodium azide (0.01% reconstituted). The exact value of each calibrator is printed on the bottle label. 1 mL per bottle, 7 bottles per kit.

2. **Ab 6x - Primary Antibody Concentrate**

(REF AC-6202):

Sheep anti-1,25-dihydroxyvitamin D in BSA-phosphate buffer with 0.09% sodium azide, 2 mL per bottle.

3. **Ab BUF - Primary Antibody Buffer**

(REF AC-6202B):

Proprietary reagent containing phosphate buffer with 0.09% sodium azide. 10 mL per bottle.

4. **Sac-Wel™ SHEEP - Anti-Sheep coated plate**

(REF AC-SH02W):

Microplate with anti-sheep IgG linked to the inner surface of the polystyrene wells, 12 x 8 well strips in a foil pouch with desiccant.

5. **1,25D BIOTIN 6x - 1,25D Biotin Concentrate**

(REF AC-6203):

Lyophilised buffer containing 1,25-dihydroxyvitamin D labelled with biotin, and proprietary stabilisers, 2mL per bottle.

6. **1,25D BIOTIN BUF - 1,25D Biotin Buffer**

(REF AC-6203B):

Phosphate buffered saline with 0.09% sodium azide, 12 mL per bottle.

7. **ENZYMCONJ - Enzyme Conjugate**

(REF AC-6204):

Phosphate buffered saline containing avidin linked to horseradish peroxidase, protein, enzyme stabilisers and preservative, 24mL per bottle.

8. **CTRL 1 - CTRL 2 - Controls**

(REF AC-6205A - AC-6205B):

Lyophilised human serum containing 1,25-dihydroxyvitamin D and <1% sodium azide (0.09% reconstituted), 1.2 mL per bottle, 2 bottles per kit.

9. **SORB - Immunocapsules**

(REF AC-6206):

Capsules containing monoclonal antibody to 1,25-dihydroxyvitamin D linked to solid phase particles in suspension with vitamin D binding protein inhibitor, 80 immunocapsules per kit.

10. **REAG 1 - Delipidation Reagent**

(REF AC-6207):

A solution of dextran sulphate and magnesium chloride, 2.5 mL per bottle.

11. **REAG 2 - Elution Reagent**

(REF AC-6208):

Ethanol, 44 mL per bottle.

12. **BUF - Assay Buffer**

(REF AC-6209):

BSA buffer with 0.09% sodium azide, 12 mL per bottle.

13. **TMB - TMB Substrate**

(REF AC-TMB):

A proprietary aqueous formulation of tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide, 24 mL per bottle.

14. **HCL - Stop Solution**

(REF AC-STOP):

0.5M Hydrochloric acid, 14 mL per bottle.

15. **WASHBUF 20x - Wash Concentrate**

(REF AC-WASHL):

Phosphate buffered saline containing Tween, 50 mL per bottle.

16. **Adhesive Plate Sealer**

8 per kit.

17. **Documentation**

Package Insert and QC report.

### Materials Required but not Provided

1. Disposable 12 x 75 mm borosilicate glass tubes.
2. Disposable 12 x 75 mm polystyrene tubes (optional).
3. Precision pipetting devices to deliver 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL, 500 µL and 1 mL.
4. Repeating pipetting devices to deliver 150µL and 500 µL, e.g. Eppendorf Multipipette 4780 or similar.
5. Precision multi-channel pipettes to deliver 100 µL and 200 µL.
6. Vortex mixer.
7. End-over-end or roller mixer.
8. Heating block or water bath at 40°C.
9. Nitrogen supply and manifold.
10. Centrifuge capable of achieving 2000g.
11. Orbital shaker.
12. Automatic microplate washer (optional).
13. Photometric microplate reader and data analysis equipment.
14. Distilled or deionised water.

## Sample Preparation

1. Prepare labelled glass or plastic tubes, one for each Control [CTRL] and unknown sample. DO NOT DELIPIDATE CALIBRATORS [CAL].
2. Add **500 µL** of each Control [CTRL] or sample to appropriately labelled tubes.
3. Add **50 µL** of Delipidation Reagent [REAG 1] to each tube. Vortex all tubes.
4. Centrifuge all tubes at 2000 g for 15 minutes.

**Note:** Take care not to disturb the pellet when handling delipidated samples. If the pellet becomes suspended or if the sample is not clear, then repeat the centrifugation.

### Alternative Sample Preparation:

*Suitable for samples where the volume available is less than 500 µL.*

1. Prepare labelled conical-bottom plastic tubes or microcentrifuge tubes, one for each sample.
2. Add sample (e.g. 250 µL) to appropriately labelled tubes.
3. Add 0.1 x sample volume of Delipidation Reagent [REAG 1] (e.g. 25 µL) to each tube. Vortex all tubes.
4. Centrifuge all tubes at 2000 g for 15 minutes, or at 10000 g for 10 minutes (microcentrifuge).

## Immunoextraction Procedure

1. Prepare labelled Immunocapsules [SORB], two for each Control [CTRL] and sample DO NOT IMMUNOEXTRACT CALIBRATORS [CAL]. Note: If a Immunocapsule [SORB] shows signs of leakage or incorrect volume - do not use.
2. Vortex Immunocapsules [SORB] and allow solid phase to settle. Stand Immunocapsules [SORB] upright in foam rack for 3-5 minutes.
3. Remove top screw caps from Immunocapsules [SORB]. Add **100 µL** of delipidated sample or control to Immunocapsules [SORB] in duplicate. Replace caps securely.
4. Place Immunocapsules [SORB] in foam rack and rotate end over-end at 5-20 revolutions per minute for 90 minutes at room temperature (18-25°C). Foam racks can be easily attached to a blood tube rotator by means of cut out slots. Alternatively, foam rack may be wedged inside a suitable plastic beaker and rotated on a bottle roller.
5. Stand Immunocapsules [SORB] upright in foam rack for 3-5 minutes to allow gel to settle. Tap to dislodge any gel adhering to the screw caps. Allow gel to settle for a further 1-2 minutes. Remove screw cap and break off (do not twist off)

bottom stopper from Immunocapsules [SORB] and place each Immunocapsule [SORB] in a plastic (or glass) tube. Centrifuge at low speed (500-1000g) for approximately 1 minute to remove sample.

6. Add **500 µL** of deionised water to each Immunocapsule [SORB]. Add carefully to avoid solid phase splashing out of the Immunocapsule [SORB]. Centrifuge at low speed (500-1000g) for approximately 1 minute to wash immunoextraction gel.
7. Repeat the above wash step a further two times.
8. Prepare labelled borosilicate glass tubes, one for each Immunocapsule [SORB], and transfer Immunocapsules [SORB] to the glass tubes.
9. Add **150 µL** of Elution Reagent [REAG 2] to all Immunocapsules [SORB]. Allow reagent to soak into solid phase for 1 to 2 minutes. Centrifuge at low speed (500-1000g) for approximately 1 minute to collect eluate.
10. Repeat above step a further two times. The total elution volume collected is therefore **450 µL** for each sample.
11. Discard Immunocapsules [SORB] and place tubes in a heating block or water bath set to 40°C. Evaporate the eluates under a gentle flow of nitrogen. Evaporation should take 20 - 30 minutes. Ensure there is no remaining liquid in the tubes.
12. Add **100 µL** of Assay Buffer [BUF] to each tube and vortex to dissolve residues.

**The immunopurified samples are now ready for assay.**

## Assay Procedure

Reconstitute Calibrators [CAL] immediately before assay as described in Preparation of Reagents, or thaw previously reconstituted materials. Allow all reagents to come to room temperature before use. Mix all reagents gently before use in the assay. Prepare labelled borosilicate glass tubes, two for each Calibrator [CAL].

1. Add **100 µL** of each Calibrator [CAL] to the appropriately labelled tubes. Pipette directly to the bottom of the tube.
2. Assemble sample extract tubes from step 12 above.
3. Add **100 µL** of Primary Antibody Solution [Ab SOLN] to all tubes.
4. Vortex all tubes gently without foaming. Incubate at 2-8°C overnight (16-20 hrs).
5. Add **150 µL** of solution from step 4 to the appropriate wells of the Antibody Coated plate [MICROPLAT]. Leave the first two wells empty for substrate blanks. Cover the plate with an

adhesive plate sealer and incubate the plate on an orbital shaker (500-750rpm) at 18-25°C for 90 minutes.

6. Add **100 µL** of 1,25D Biotin solution [1,25D BIOTIN SOLN] to all wells except for the substrate blanks. Cover the plate with an adhesive plate sealer and incubate the plate on an orbital shaker (500-750rpm) at 18-25°C for 60 minutes.
7. Wash all wells three times with Wash Solution:
  - a. Automatic plate wash: Set plate washer to dispense at least 300 µL of Wash Solution per well. Fill and aspirate for 3 cycles.
  - b. Manual Wash: decant the contents of the wells by inverting sharply. Dispense 250 µL of Wash Solution to all wells. Decant and repeat twice.Tap the inverted plate firmly on absorbent tissue to remove excess Wash Solution before proceeding to the next step.
8. Add **200 µL** of Enzyme Conjugate [ENZYMCONJ] to all wells except for the substrate blanks using a multichannel pipette. Cover the plate with an adhesive plate sealer and incubate the plate at 18-25°C for 30 minutes.
9. Repeat Wash Step 7.
10. Add **200 µL** of TMB Substrate [TMB] to all wells including the substrate blanks using a multichannel pipette. Cover the plate with an adhesive plate sealer and incubate the plate at 18-25°C for 30 minutes.

*Note: TMB Substrate is easily contaminated. Only remove the required amount for the assay from the bottle. Dispose of unused TMB Substrate. Do not return to bottle.*
11. Add **100 µL** of Stop Solution [HCL] to all wells using a multichannel pipette.
12. Measure the absorbance of each well at 450nm (reference 650nm) using a microplate reader within 30 minutes of adding the Stop Solution.

### Quality Control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Two kit controls are provided. The controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

### Calculation of Results

Calculate the percent binding (B/Bo%) of each Calibrator, Control and unknown sample as follows:

$$B/Bo\% = \frac{(\text{mean abs.} - \text{mean abs. substrate blank})}{(\text{mean abs. for '0' cal.} - \text{mean abs. substrate blank})} \times 100$$

Prepare a calibration curve on semi-log graph paper by

plotting B/Bo% on the ordinate against concentration of 1,25-dihydroxyvitamin D on the abscissa. Calculate B/Bo% for each unknown sample and read values off the curve in pmol/L. Alternative data reduction techniques may be employed, such as automated data reduction programs, but users should confirm that the selected curve fit is appropriate and gives acceptable results. Smoothed spline or 4PL curve fits are recommended. IDS calculates results using MultiCalc (PerkinElmer) data reduction software with a 4PL curve fit plotting net absorbance versus log concentration.

The reportable range of the assay is 6–500 pmol/L. Any value that reads below the lowest calibrator, 6 pmol/L, is an extrapolated value and may be reported as “less than 6 pmol/L”.

Conversion of Units:

$$\begin{array}{l} \text{X pmol/L} \quad \times 0.42 \Rightarrow \text{Y pg/mL} \\ \leftarrow \times 2.4 \end{array}$$

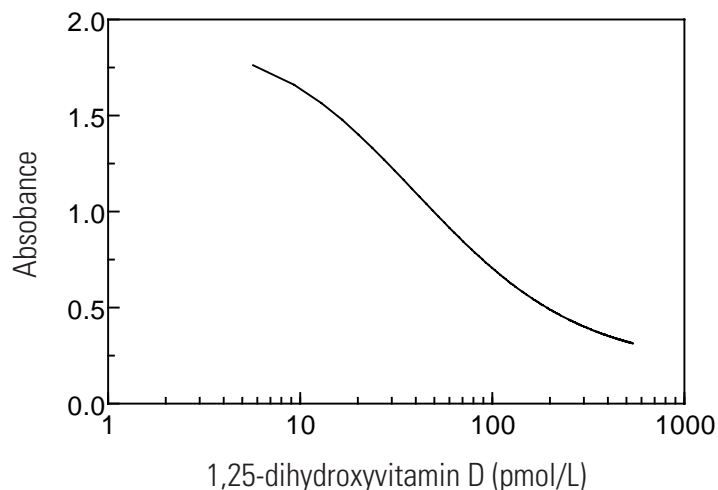
### Sample Assay Data

This data is for illustration only and must not be used for the calculation of any sample result.

Well	Description	Abs.	Mean Abs.	B/Bo%	Result pmol/L
A1, A2	Substrate blank	-0.006 0.006	0.000		
B1, B2	Calibrator 0 0 pmol/L	1.956 1.992	1.974	100.0	
C1, C2	Calibrator 1 5.7 pmol/L	1.746 1.776	1.761	89.2	
D1, D2	Calibrator 2 13.4 pmol/L	1.572 1.553	1.563	79.2	
E1, E2	Calibrator 3 34.0 pmol/L	1.132 1.179	1.156	58.5	
F1, F2	Calibrator 4 112 pmol/L	0.682 0.686	0.684	34.7	
G1, G2	Calibrator 5 246 pmol/L	0.419 0.457	0.438	22.2	
H1, H2	Calibrator 6 544 pmol/L	0.315 0.304	0.310	15.7	
A3, A4	Sample 1	1.109 1.158	1.134	57.4	37.2
B3, B4	Sample 2	0.532 0.547	0.540	27.4	169

### Typical Calibration Curve

This sample calibration curve is for illustration only.





## Limitations of Use

1. The assay may underestimate the amount of 1,25-dihydroxyvitamin D in circulation in patients receiving vitamin D<sub>2</sub> therapy.
2. Samples suspected of containing analyte concentrations in excess of the highest calibrator should be assayed in dilution.
3. The performance characteristics of this assay have not been established in a pediatric population.
4. As in the case of any diagnostic procedure results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
5. The following substances have been tested - in accordance with NCCLS EP7-A, "Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline" - and found not to interfere in the IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA assay:
 

Haemoglobin	tested up to 500 mg/dL
Bilirubin	tested up to 20 mg/dL
Lipid	tested up to 2803 mg/dL
Urea	tested up to 500 mg/dL

## Expected Values

The following ranges have been determined using the IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA kit and are provided for guidance only. Each laboratory should determine ranges for their local population. The 95% reference interval for Normal Adults, collected from 120 apparently healthy adults of US origin, was calculated by a non-parametric method following the NCCLS guideline C28-A2, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

Normal Adults 39-193 pmol/L (n=120)

End-stage renal disease\* <6-22 pmol/L (n=24)

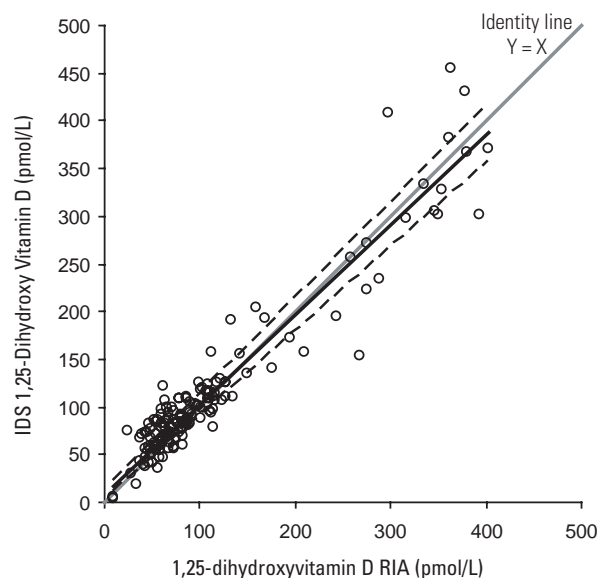
\*Observed range of values.

## Performance Data

### Accuracy

The IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D EIA kit was compared against a recognised radioimmunoassay for the quantitative determination of 1,25-dihydroxyvitamin D, following NCCLS EP-9A2, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A population of 152 samples, selected to represent a wide range of 1,25-dihydroxyvitamin D [10 - 402 pmol/L], were assayed by each method. Passing & Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

IDS = 0.94(x) + 7.2 (95% CI of the slope and intercept were 0.89 to 1.01, and 2.1 to 12.7 respectively); correlation coefficient (r) = 0.95



## Sensitivity

The sensitivity, defined as the concentration corresponding to the mean minus 2 standard deviations of 20 replicates of the zero calibrator, is 6 pmol/L (2.5 pg/mL).

## Precision

Precision was evaluated in accordance with NCCLS EP-5A2, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods". Three human serum controls were assayed in quadruplicate over 17 assay days spanning more than 49 operating days. The assays were performed by multiple operators using multiple reagents lots.

Control	n	mean (pmol/L)	Within-run		Within-device	
			SD	CV%	SD	CV%
1	28	19.0	2.0	10.7	3.8	19.7
2	28	53.2	5.6	10.5	9.1	17.1
3	28	152	14.1	9.3	26.7	17.6

## Recovery

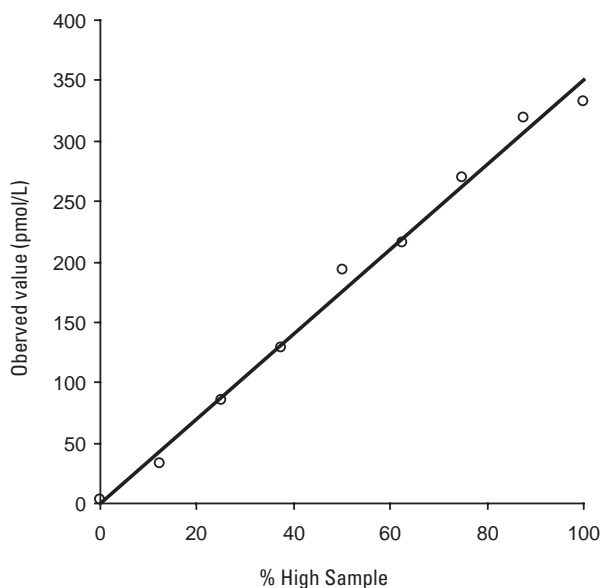
Recovery was assessed by adding 1,25D<sub>3</sub> to samples prior to extraction and assay.

Sample Conc pmol/L	125D <sub>3</sub> added pmol/L	Measured pmol/L	Recovery pmol/L	Recovery %
62.7	46.5	106.4	43.6	94%
62.7	93.0	140.7	78.0	84%
46.2	54.4	100.6	54.4	100%
46.2	108.8	161.3	115.1	106%
			<b>Mean</b>	<b>96%</b>

## Linearity

Linearity was evaluated based on NCCLS EP-6A, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach". Samples containing varying concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D were assayed in duplicate. The resulting mean concentrations were compared to predicted concentrations. Samples were prepared by diluting a high patient sample with a low patient sample prior to extraction and assay. The reportable range was determined to be <6-333 pmol/L.

Predicted Concentration pmol/L	Measured Concentration pmol/L	Variation	
		pmol/L	%
-0.1	2.5	2.6	-
43.8	32.7	-11.1	-25%
87.7	86.0	-1.7	-2%
132	129	-3.0	-2%
175	193	18.0	10%
219	215	-4.0	-2%
263	269	6.0	2%
307	319	12.0	4%
351	333	-18.0	-5%



## Specificity

The specificity of the kit was assessed with the following analytes at 50% binding of the zero calibrator.

Analyte	Cross-reactivity
1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	100 %
1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>2</sub>	39 %
24,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	0.056 %
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub>	0.009 %

## Utilisation

### *Pour usage diagnostique in vitro*

La trousse IDS 1,25-Dihydroxy Vitamine D est un système de dosage complet servant à la purification de la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25D) du sérum ou du plasma humain par immunoextraction, puis à la détermination quantitative au moyen d'un dosage immunoenzymatique. Les résultats utilisés conjointement à d'autres données cliniques et de laboratoire aident le médecin à évaluer un déficit en 1,25D associé à des maladies rénales chez l'adulte.

### **Résumé et explication <sup>(1)</sup>**

La vitamine D est un terme utilisé communément pour désigner une famille de molécules étroitement apparentées et dérivant du 7-déshydrocholestérol d'origine naturelle (provitamine D<sub>3</sub>). La provitamine D<sub>3</sub> se transforme en vitamine D<sub>3</sub> 'mère' (cholécalférol) par réaction photo lytique dans la peau en cas d'exposition à la lumière solaire. Ce composé est biologiquement inactif, mais il passe dans le sang et est hydroxylé dans le foie pour donner la 25-hydroxyvitamine D active (25D). Un petit pourcentage de cette dernière subit une autre hydroxylation dans les reins et devient l'hormone calciotrope extrêmement puissante appelée 1,25D.

La 1,25D se lie dans une grande mesure à la 'Vitamin D Binding Protein' à l'albumine dans le sang.

La 1,25D est l'un des principaux régulateurs du métabolisme du calcium (et du phosphate), en stimulant la résorption intestinale du calcium et en augmentant la résorption osseuse. Elle inhibe également la production de la parathormone (PTH), aussi bien par action directe sur les glandes parathyroïdiennes que par voie indirecte en augmentant le taux de calcium sérique. La production de la 1,25D est à son tour stimulée par la parathormone (PTH), ce qui donne une boucle de contrôle efficace.

L'hypovitaminose D est couramment associée à une insuffisance de celle-ci dans les aliments consommés, le plus souvent chez les végétariens, ainsi qu'à une faible exposition à la lumière solaire (par ex. chez les personnes âgées et internées) et à la pigmentation de la peau.

La production de la 1,25D semble perturbée en présence d'une insuffisance rénale au stade précoce, bien que cela ne soit peut-être pas dû à un effet rénal. En cas d'insuffisance rénale à un stade avancé, la 1 $\alpha$ -hydroxylation peut être perturbée, ce qui entraîne un faible taux de 1,25D.

## Description de la méthode

La trousse IDS 1,25-Dihydroxy Vitamine D est un système de dosage complet dont la purification de la 1,25D dans des échantillons de patients se fait par immunoextraction suivie d'une détermination quantitative par un dosage immunoenzymatique. Les échantillons des patients sont délipidés et la 1,25D est extraite par incubation pendant 90 heures avec un anticorps monoclonal anti-1,25D très spécifique en phase solide afin de la séparer des molécules pouvant produire des réactions croisées. Le gel d'immunoextraction est alors lavé et la 1,25D purifiée est directement éluée dans des tubes en verre. Les éluats reconstitués et les étalons sont incubés toute une nuit avec des anticorps anti-1,25D de mouton très spécifiques. Ensuite une partie est incubée pendant 90 minutes sous agitation dans les puits de la microplaque qui sont recouverts d'un anticorps anti-mouton spécifique. De la 1,25D liée à la biotine est ensuite ajoutée et la plaque est alors agitée pendant 60 minutes avant de procéder à l'aspiration et au lavage. De l'avidine marquée par une enzyme (peroxydase de raifort) est ajoutée et elle se lie de façon sélective à la biotine complexée ; après une étape supplémentaire de lavage, la couleur est développée à l'aide d'un substrat chromogène (TMB). L'absorbance des mélanges en fin de réaction est lue dans un lecteur de plaque de microtitration ; l'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration en 1,25D.

### **Mises en garde et précautions**

La trousse 1,25-Dihydroxyvitamine D est destinée à un usage diagnostique in vitro uniquement et non pas à un usage interne chez les êtres humains ou chez les animaux. Ce produit doit être employé conformément aux instructions de la notice. La société IDS Limited ne peut être tenue responsable d'aucune perte ou dommage (à l'exception des obligations légales en vigueur), quelle qu'en soit la cause, provenant du non-respect des instructions fournies.

**ATTENTION** : Cette trousse contient des matériaux d'origine humaine et/ou animale. Manipuler les réactifs de la trousse comme s'ils étaient susceptibles de transmettre un agent infectieux.

Des précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être mise en œuvre lors du stockage, de la manipulation et de l'élimination des réactifs de la trousse. Les réactifs doivent être éliminés conformément aux recommandations des autorités compétentes locales et à la réglementation en vigueur.

### Sérum humain : Contrôles CTRL

Le sérum humain utilisé dans la préparation de ce produit a été analysé selon les recommandations de la FDA et il s'est avéré négatif pour les anticorps anti-VIH 1/2, pour l'antigène AgHBs et pour les anticorps anti-VHC. Toutefois, puisque aucune méthode ne garantit l'absence totale d'agents pathogènes, tout produit d'origine humaine doit être considéré comme étant potentiellement infectieux ; il est nécessaire de manipuler les réactifs avec précaution (niveau de biosécurité 2).

### Azide de sodium

Xn. Nocif: Les étalons CAL et les contrôles CTRL contiennent l'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) >0,1% (p/p) (<1%).

R22 Nocif en cas d'ingestion.

R52/53 Nocif pour les organismes aquatiques, peut entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique.

S46 En cas d'ingestion consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette.

S36/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

S60 Éliminer le produit et son récipient comme un déchet dangereux.

Certains réactifs fournis avec cette trousse contiennent de l'azide de sodium comme conservateur. Ce sel peut réagir avec la tuyauterie en plomb ou en cuivre pour former des azides de métal extrêmement explosifs. Pour éliminer ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide.

### Réactif d'éluion

Le réactif d'éluion REAG 2 contient de l'éthanol.

R11 Facilement inflammable (point d'éclair 13 °C).

S7 Conserver le récipient bien fermé.

S16 Conserver à l'écart de toute flamme ou source d'étincelles - Ne pas fumer.

### Acide chlorhydrique 0,5M

La solution d'arrêt HCL contient de l'acide chlorhydrique à 0,5M.

R36/38 Irritant pour les yeux et pour la peau.

S26 En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.

S36/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

### Tétraméthylbenzidine

Le substrat TMB contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine

R21/22 Nocif par contact avec la peau et en cas d'ingestion.

S36/37 Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

### Préparation des réactifs

**Étalons CAL:** Les étalons CAL fournis sous forme lyophilisée. Reconstituer immédiatement avant d'utiliser. Ajouter 1 ml d'eau distillée ou désionisée dans chaque flacon. Remettre le bouchon et attendre 5 à 10 minutes en inversant plusieurs fois le flacon pour que la reconstitution soit complète. NE PAS RECONSTITUER DANS UN MÉLANGEUR À CYLINDRES car cela entraînerait une perte d'activité.

**Contrôles CTRL:** Les contrôles CTRL sont fournis sous forme lyophilisée. Reconstituer immédiatement avant d'utiliser. Ajouter 1,2 ml d'eau distillée ou désionisée dans chaque flacon. Remettre le bouchon et attendre 15 à 20 minutes en inversant plusieurs fois le flacon pour que la reconstitution soit complète.

Si vous prévoyez d'utiliser les étalons CAL ou les contrôles CTRL plusieurs fois, les congeler (-20 °C) dans les 15 minutes suivant la reconstitution. Pour réutiliser des étalons CAL ou des contrôles CTRL, congelés, les décongeler à la température ambiante, bien les mélanger et les utiliser en moins de 15 minutes.

### Solution d'anticorps primaire Ab SOLN:

Le concentré d'anticorps primaire Ab 6x est fournis sous la forme d'un concentré. Ajouter la totalité du flacon du tampon d'anticorps primaire Ab BUF replacer le bouchon et inverser plusieurs fois pour assurer un mélange correct.

### Solution de 1,25D-biotine 1,25D BIOTIN SOLN:

Le concentré de 1,25D-biotine 1,25D BIOTIN 6x est fournis sous forme lyophilisée. Ajouter la totalité du flacon de tampon 1,25D-biotine 1,25D BIOTIN BUF. Replacer le bouchon et laisser reposer 10-15 minutes à température ambiante. Inverser plusieurs fois pour assurer la reconstitution totale. Si vous prévoyez d'utiliser la solution de 1,25D-biotine 1,25D BIOTIN SOLN plusieurs fois, la congeler (-20 °C) dans les 2 heures suivant la reconstitution. Pour utiliser la solution de 1,25D-biotine congelée 1,25D BIOTIN SOLN, la décongeler à température ambiante, bien mélanger et utiliser dans les 2 heures.

**Solution de lavage:** Préparer en ajoutant le contenu de chaque flacon de solution de lavage concentrée WASHBUF 20x à 950 ml d'eau distillée ou désionisée.

Conserver entre température ambiante.  
Tous les autres réactifs sont fournis prêts à l'emploi.  
Amener les réactifs à température ambiante avant utilisation.  
Les réactifs doivent être homogénéisés par inversions répétées avant de les utiliser pour le dosage.

### Conservation des réactifs

Cette trousse est stable jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette, si elle est conservée comme indiqué. Conserver tous les réactifs entre 2 et 8 °C après réception.

Les étalons [CAL], les contrôles [CTRL] et la solution de 1,25D-biotine [1,25D BIOTIN SOLN] reconstitués sont stables à -20 °C pendant 8 semaines.

La solution d'anticorps [Ab SOLN] est stable à 2-8 °C pendant 8 semaines.

Les barrettes de plaque recouverte d'anticorps [MICROPLAT] non utilisées doivent être remises avec le produit déshydratant dans le sachet en aluminium qui doit ensuite être fermé hermétiquement. Conserver à 2-8 °C pendant 8 semaines.

La solution de lavage se conserve à température ambiante pendant 8 semaines.

### Indices d'une détérioration des réactifs

Présence anormale de particules en suspension dans l'un des réactifs.

Diminution de la liaison maximale.

Liaison non spécifique élevée.

Pente ou courbe d'étalonnage différente de celles obtenues normalement.

### Prélèvement et conservation des échantillons

Le dosage doit être réalisé avec des échantillons de sérum ou de plasma (EDTA ou héparine). Séparer les échantillons aussitôt après le prélèvement. Pour un stockage prolongé, les conserver à -20 °C. Éviter de répéter le cycle congélation-décongélation.

### Procédure

#### Matériel fourni

#### 1. [CAL 0] - [6] - Étalons

(REF AC-6201A - AC-6201G):

Tampon BSA lyophilisé contenant de la 1,25-dihydroxyvitamine D et de l'azide de sodium à <0,4 % (0,01 % reconstitué). La valeur exacte de chaque étalon est indiquée sur l'étiquette du flacon. 1 ml par flacon, 7 flacons par trousse.

#### 2. [Ab 6x] - Anticorps primaire concentré

(REF AC-6202):

Anticorps anti-1,25-dihydroxyvitamine D de mou-

ton dans du tampon BSA-phosphate avec de l'azide de sodium à 0,09%, 2 ml par flacon.

#### 3. [Ab BUF] - Tampon d'anticorps primaire

(REF AC-6202B):

Tampon BSA-phosphate avec de l'azide de sodium à 0,09%, 10 ml par flacon.

#### 4. Sac-Wel™ [SHEEP] - Plaque recouverte d'anticorps anti-mouton

(REF AC-SH02W):

Microplaque recouverte d'IgG anti-mouton lié à la surface interne des puits en polystyrène, barrettes de 12 x 8 puits emballées dans un sachet en aluminium avec produit déshydratant.

#### 5. [1,25D BIOTIN 6x] - Concentré de 1,25D-biotine

(REF AC-6203):

Tampon lyophilisé contenant de la 1,25-dihydroxyvitamine D marquée à la biotine et des stabilisateurs brevetés, 2 ml par flacon.

#### 6. [1,25D BIOTIN BUF] - Tampon de 1,25D-biotine

(REF AC-6203B):

Solution saline tamponnée au phosphate avec de l'azide de sodium à 0,09%, 12 ml par flacon.

#### 7. [ENZYMCONJ] - Conjugué enzymatique

(REF AC-6204):

Solution saline tamponnée au phosphate contenant de l'avidine liée à la peroxydase de raifort, des protéines, des stabilisateurs d'enzyme et un conservateur, 24 ml par flacon.

#### 8. [CTRL 1] - [CTRL 2] - Contrôles

(REF AC-6205A - AC-6205B):

Sérum humain lyophilisé contenant de la 1,25-dihydroxyvitamine D et de l'azide de sodium à <1 % (0,09 % reconstitué), 1,2 ml par flacon, 2 flacons par trousse.

#### 9. [SORB] - Immunocapsules

(REF AC-6206):

Capsules contenant de l'anticorps monoclonal dirigé contre la 1,25-dihydroxyvitamine D lié aux particules de la phase solide en suspension avec l'inhibiteur de la protéine liée à la vitamine D, 80 immunocapsules par trousse.

#### 10. [REAG 1] - Réactif de délipidation

(REF AC-6207):

Solution de dextrane-sulfate et de chlorure de magnésium, 2,5 ml par flacon.

#### 11. [REAG 2] - Réactif d'éluion

(REF AC-6208):

Éthanol, 44 ml par flacon.

12. **BUF** - Tampon de dosage  
(**REF AC-6209**):  
Tampon BSA avec de l'azide de sodium à 0,09%,  
12 ml par flacon.
13. **TMB** - Substrat TMB  
(**REF AC-TMB**):  
Solution aqueuse brevetée de tétraméthylbenzidine (TMB) et de peroxyde d'hydrogène, 24 ml par flacon.
14. **HCL** - Solution d'arrêt  
(**REF AC-STOP**):  
Acide chlorhydrique 0,5M, 14 ml par flacon.
15. **WASHBUF 20x** - Concentré de lavage  
(**REF AC-WASHL**):  
Solution salée tamponnée au phosphate contenant du Tween, 50 ml par flacon.
16. **Adhésif pour plaques**  
8 par trousse.
17. **Documentation technique**  
Notice et contrôle qualité.

### Matériel nécessaire mais non fourni

1. Tubes en verre borosilicaté, à usage unique, 12 x 75 mm.
2. Tubes en polystyrène à usage unique de 12 x 75 mm (facultatif).
3. Pipettes de précision : 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 500 µl et 1 ml.
4. Dispositifs de pipetage à répétition (150 µl et 500 µl), par exemple Eppendorf Multipipette 4780 ou similaire.
5. Pipettes de précision multi-canaux : 100 µl et 200 µl.
6. Agitateur type Vortex.
7. Mélangeur rotatif ou à cylindres.
8. Élément chauffant ou bain-marie à 40 °C.
9. Alimentateur en azote et collecteur.
10. Centrifugeuse capable d'atteindre 2000g.
11. Agitateur orbital.
12. Laveur automatique de microplaques (facultatif).
13. Lecteur photométrique de microplaques et matériel d'analyse de données.
14. Eau distillée ou désionisée.

### Préparation des échantillons

1. Préparer des tubes en verre ou en plastique étiquetés, un pour chaque **CTRL** et pour chaque échantillon à analyser. NE PAS DÉLIPIDER LES ÉTALONS **CAL**.
2. Pipeter **500 µl** de chaque contrôle **CTRL** ou échantillon dans les tubes portant les étiquettes

appropriées.

3. Ajouter **50 µl** de réactif de délipidation **REAG 1** dans chaque tube. Agiter au vortex tous les tubes
4. Centrifuger tous les tubes à 2000 g pendant 15 minutes.

**Remarque:** Faire bien attention de ne pas remuer le culot durant la manipulation des échantillons délipidés. Si le culot est en suspension ou si l'échantillon n'est pas limpide, recentrifuger.

### Autre préparation des échantillons :

Convient aux échantillons dont le volume disponible est inférieure à 500 µl.

1. Préparer des tubes en plastique à fond conique et étiquetés ou bien des tubes pour centrifugeuse, un pour chaque échantillon.
2. Pipeter l'échantillon (par ex. 250 µl) dans les tubes portant les étiquettes correspondantes.
3. Ajouter 0,1 x volume de l'échantillon de réactif de délipidation **REAG 1** (par ex. 25 µl) dans chaque tube. Agiter au vortex tous les tubes
4. Centrifuger tous les tubes à 2000 g pendant 15 minutes, ou à 10000 g pendant 10 minutes (microcentrifugeuse).

### Procédure d'immunoextraction

1. Préparer les immunogélules étiquetées **SORB**, deux pour chaque contrôle **CTRL** et échantillon. NE PAS IMMUNOEXTRAIRE LES ÉTALONS **CAL**. Remarque : Si une immunogélule **SORB** semble avoir coulé ou ne pas contenir le volume approprié, ne pas l'utiliser.
2. Agiter au vortex les immunogélules **SORB** et attendre que la phase solide se soit déposée. Placer les immunogélules **SORB** en position debout sur le portoir en mousse et attendre 3 à 5 minutes.
3. Retirer le capuchon à vis des immunogélules **SORB**. Ajouter **100 µl** d'échantillon ou de contrôle délipidé aux immunogélules **SORB** en double exemplaire. Bien revisser les capuchons.
4. Placer les immunogélules **SORB** dans le portoir en mousse et faire tourner dans le mélangeur rotatif à 5-20 tours par minute pendant 90 minutes, à température ambiante (18-25 °C). Les portoirs en mousse peuvent facilement être fixés à un agitateur rotateur pour tubes de sang au moyen des fentes découpées. Sinon, il est possible de coincer le portoir en mousse dans un bécquet en plastique adéquat et le faire tourner sur un mélangeur à cylindre pour flacons.
5. Placer les immunogélules **SORB** en position debout dans le portoir en mousse et laisser

- reposer le gel pendant 3 à 5 minutes. Tapoter pour déloger le gel qui aurait pu se coller sur les capuchons à vis. Laisser reposer le gel pendant 1 à 2 minutes de plus. Enlever le capuchon à vis et casser (sans faire tourner) le capuchon du bas des immunogélules [SORB] et placer chaque immunogélule [SORB] dans un tube en plastique (ou en verre). Centrifuger à petite vitesse (500-1000g) pendant approximativement 1 minute pour enlever l'échantillon.
6. Ajouter **500 µl** d'eau désionisée à chaque immunogélule [SORB]. Réaliser cette opération avec grand soin pour éviter des éclaboussures de la phase solide hors de l'immunogélule [SORB]. Centrifuger à petite vitesse (500-1000g) pendant approximativement 1 minute pour laver le gel d'immunoextraction.
  7. Répéter l'étape précédente deux fois de plus.
  8. Préparer des tubes en verre borosilicaté, un pour chaque immunogélule [SORB], et les transférer dans les tubes en verre.
  9. Pipeter **150 µl** de réactif d'éluion [REAG 2] dans chacune des immunogélules [SORB]. Attendre que le réactif ait pénétré dans la phase solide, soit 1 à 2 minutes. Centrifuger à petite vitesse (500-1000g) pendant environ 1 minute pour recueillir l'éluat.
  10. Répéter l'étape précédente deux fois de plus. Le volume d'éluion total recueilli est donc de **450 µl** pour chaque échantillon.
  11. Jeter les immunogélules [SORB] et placer les tubes dans un élément chauffant ou dans un bain-marie à 40 °C. Faire évaporer les éluats sous un léger courant d'azote. L'évaporation prend environ 20-30 minutes. S'assurer qu'il ne reste pas de liquide dans les tubes.
  12. Pipeter **100 µl** de tampon de dosage [BUF] dans chaque tube puis agiter au vortex pour dissoudre les résidus.

**Les échantillons immunopurifiés sont alors prêts pour le dosage.**

### Procédure de dosage

Reconstituer les étalons [CAL] immédiatement avant de réaliser le dosage, comme décrit dans la section Préparation des réactifs, ou bien dégeler les produits reconstitués auparavant. Amener les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger doucement tous les réactifs avant de les utiliser dans le dosage. Préparer des tubes en verre borosilicaté, deux pour chaque étalons [CAL].

1. Pipeter **100 µl** de chaque étalon [CAL] dans les tubes portant les étiquettes appropriées. Pipeter directement au fond du tube.

2. Rassembler les tubes d'extrait d'échantillon provenant de l'étape 12 ci-dessus.
3. Pipeter **100 µl** de solution d'anticorps primaire [Ab SOLN] dans chacun des tubes.
4. Agiter au vortex doucement les tubes sans produire de mousse. Faire incuber toute une nuit à 2-8°C (16-20 heures).
5. Pipeter **150 µl** de solution de l'étape 4 dans les puits appropriés de la plaque recouverte d'anticorps [MICROPLAT]. Laisser les deux premiers vides pour des blancs de substrat. Couvrir la plaque avec la fermeture adhésive puis l'incuber dans un agitateur orbital (500-750 tr/min) à 18-25 °C pendant 90 minutes.
6. Pipeter **100 µl** de solution de 1,25D-biotine [1,25D BIOTIN SOLN] dans chacun des puits, à l'exception des blancs de substrat. Couvrir la plaque avec la fermeture adhésive puis l'incuber dans un agitateur orbital (500-750 tr/min) à 18-25 °C pendant 60 minutes.
7. Laver tous les puits trois fois avec la solution de lavage :
  - a. Lavage automatique de la plaque : Régler le laveur de plaques pour qu'il dépose au moins 300 µl de solution de lavage par puits. Remplir et aspirer pendant 3 cycles.
  - b. Lavage manuel : Décanter le contenu des puits par inversion brusque. Pipeter 250 µl de solution de lavage dans chacun des puits. Décanter et répéter cette opération deux fois. Tapoter fermement sur la plaque à l'envers sur du papier absorbant pour éliminer la solution de lavage en excès avant de passer à l'étapesuivante.
8. Pipeter **200 µl** de conjugué enzymatique [ENZYMCONJ] dans chacun des puits, à l'exception des blancs de substrat, en utilisant une pipette multi-canaux. Couvrir la plaque avec l'adhésif pour plaque, puis l'incuber à 18-25 °C pendant 30 minutes.
9. Répéter le lavage de l'étape 7.
10. Pipeter **200 µl** de substrat TMB [TMB] dans chacun des puits, y compris les blancs de substrat, en utilisant une pipette multi-canaux. Couvrir la plaque avec l'adhésif pour plaque, puis l'incuber à 18-25 °C pendant 30 minutes.
 

*Remarque : Le substrat TMB est facilement contaminé. Ne prélever du flacon que la quantité requise pour le dosage. Jeter le substrat TMB non utilisé. Ne pas le remettre dans le flacon.*
11. Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt [HCL] dans chaque puits en utilisant une pipette multi-canaux.

- Mesurer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (référence 650 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques dans les 30 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

### Contrôle qualité

L'utilisation régulière des échantillons de contrôle à plusieurs concentrations d'analyte est conseillée pour assurer la validité des résultats au jour le jour. Deux contrôles sont fournis dans la trousse. Les contrôles doivent être testés comme inconnus. Des graphiques de contrôle de qualité doivent être mis en œuvre pour suivre la performance du dosage.

### Calcul des résultats

Calculer le pourcentage de fixation (B/Bo%) de chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu de la façon suivante :

$$B/Bo\% = \frac{(\text{abs. moy.} - \text{abs. moy. du blanc de substrat}) \times 100}{(\text{abs. moy. pour cal. '0'} - \text{abs. moy. du blanc de substrat})}$$

Tracer la courbe d'étalonnage sur papier semilogarithmique en reportant les B/Bo% correspondant à chaque étalon sur l'axe des ordonnées et leur concentration en 1,25-dihydroxyvitamine D sur l'axe des abscisses. Calculer le B/Bo% correspondant à chaque échantillon inconnu et lire la concentration en pmol/l sur la courbe. D'autres techniques de traitement des données, comme des programmes de réduction de données automatisés, peuvent être employées, mais les utilisateurs devront s'assurer que la forme de la courbe sélectionnée est appropriée et offre des résultats acceptables. Il est recommandé de calculer les courbes en utilisant la fonction « spline » ou « 4PL ». IDS calcule les résultats à l'aide du logiciel de réduction de donnée MultiCalc (PerkinElmer) avec une courbe 4PL représentant l'absorbance en fonction de la concentration (log).

La plage d'analyse du dosage est de 6 – 500 pmol/l. Toute valeur inférieure au plus petit étalon, 6 pmol/l, est un résultat extrapolé devant être indiqué comme « Inférieur à 6 pmol/l ».

Conversion des unités

$$\begin{array}{ccc} & x 0,42 \Rightarrow & \\ X \text{ pmol/L} & & Y \text{ pg/mL} \\ & \Leftarrow x 2,4 & \end{array}$$



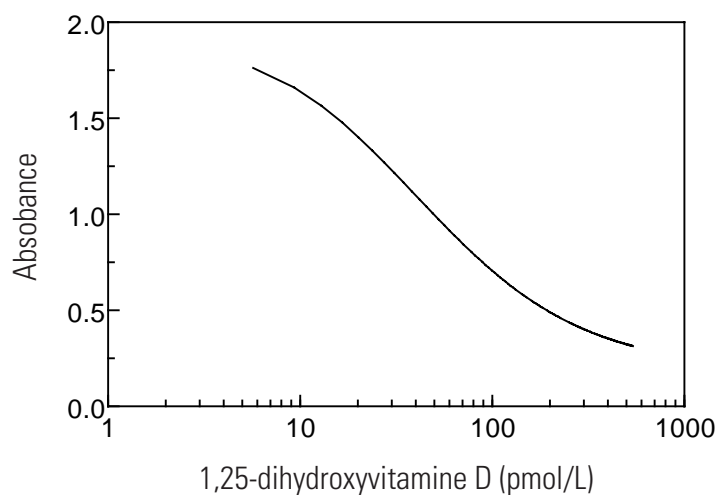
### Données de dosage – Exemple

Ces informations sont uniquement données à titre d'exemple et ne doivent pas être utilisées pour calculer les résultats des échantillons.

Puits	Description	Abs.	Abs. moy	B/Bo%	Résultat pmol/l
A1, A2	Blanc de substrat	-0,006 0,006	0,000		
B1, B2	Étalon 0 0 pmol/L	1,956 1,992	1,974	100,0	
C1, C2	Étalon 1 5,7 pmol/L	1,746 1,776	1,761	89,2	
D1, D2	Étalon 2 13,4 pmol/L	1,572 1,553	1,563	79,2	
E1, E2	Étalon 3 34,0 pmol/L	1,132 1,179	1,156	58,5	
F1, F2	Étalon 4 112 pmol/L	0,682 0,686	0,684	34,7	
G1, G2	Étalon 5 246 pmol/L	0,419 0,457	0,438	22,2	
H1, H2	Étalon 6 544 pmol/L	0,315 0,304	0,310	15,7	
A3, A4	Échantillon 1	1,109 1,158	1,134	57,4	37,2
B3, B4	Échantillon 2	0,532 0,547	0,540	27,4	169

### Exemple de courbe d'étalonnage type

Cette courbe d'étalonnage ne doit être utilisée qu'à titre d'exemple.



## Limites du dosage

- 1, Le dosage risque de sous-estimer la quantité de 1,25-dihydroxyvitamine D dans la circulation sanguine chez les patients traités par la vitamine D<sub>2</sub>,
- 2, Les échantillons suspectés de contenir des concentrations d'analytes supérieures à l'étalon le plus concentré doivent être dosés sous forme diluée,
- 3, Les caractéristiques de performances du dosage n'ont pas été établies chez les enfants,
- 4, Comme pour n'importe quelle procédure de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en même temps que le contexte clinique et toute autre information du patient à la disposition du médecin,
- 5, Les substances suivantes ont été testées, conformément à la recommandation EP7-A de la NCCLS, "Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline" (Analyse des interférences en chimie clinique, recommandations approuvées), et elles n'interfèrent pas avec le dosage IDS 1,25-Dihydroxy Vitamine D :
 

Hémoglobine	testé jusqu'à 500 mg/dL
Bilirubine	testé jusqu'à 20 mg/dL
Lipide	testé jusqu'à 2803 mg/dL
Urée	testé jusqu'à 500 mg/dL

## Valeurs attendues

Les limites suivantes ont été déterminées avec la trousse IDS 1,25-Dihydroxy Vitamine D et elles ne sont fournies ici qu'à titre indicatif, Il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs usuelles pour la population locale, L'intervalle de référence de 95% chez les adultes normaux, issu de 120 adultes présumés sains, a été calculé avec une méthode non paramétrique en suivant la recommandation C28-A2 de la NCCLS, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (Comment définir et déterminer des intervalles de référence dans les laboratoires cliniques),

Adultes normaux 39-193 pmol/l (n=120)

Patients souffrant de maladies rénales au stade avancé \* <6-22 pmol/l (n=24)

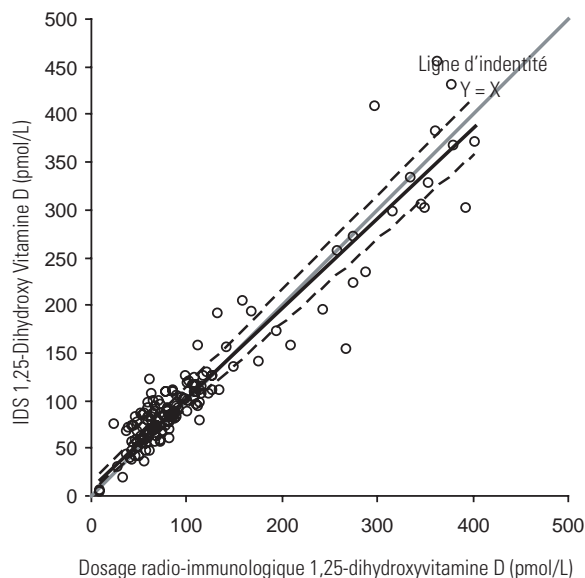
\*Intervalle de valeurs observé,

## Caractéristiques du dosage

### Exactitude

La trousse IDS 1,25-Dihydroxy Vitamine D a été comparée à un dosage radio-immunologique reconnu servant à la détermination quantitative de la 1,25-dihydroxyvitamine D, conformément à

la recommandation EP-9A2 de la NCCLS, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples" (Comparaison de méthode et évaluation de la distorsion en utilisant des échantillons de patients), Une population de 152 échantillons, sélectionnés pour représenter un large intervalle de concentration en 1,25-dihydroxyvitamine D [10 - 402 pmol/l], a été analysée avec chacune des méthodes, Les résultats ont été analysés par régression de Passing & Bablok :  $IDS = 0,94(x) + 7,2$  (Pente et intersection de l'intervalle de confiance de 95% : 0,89 à 1,01, et 2,1 à 12,7 respectivement); coefficient de corrélation ( $r$ ) = 0,95,



### Sensibilité

La sensibilité, définie comme étant la concentration qui correspond à la moyenne moins deux écarts-types de 20 doubles de l'étalon zéro, est 6 pmol/l (2,5 pg/ml),

### Précision

La précision a été évaluée conformément à la recommandation EP-5A2 de la NCCLS, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods" (Évaluation de la précision des méthodes de mesure quantitative), Trois contrôles de sérum humain ont été analysés sur 17 jours, ce qui représente une période de plus de 49 jours, Les dosages ont été réalisés par différents opérateurs en utilisant plusieurs lots de réactifs,

Contrôle	n	moyenne (pmol/L)	Intra-série		Total	
			SD	CV%	SD	CV%
1	28	19,0	2,0	10,7	3,8	19,7
2	28	53,2	5,6	10,5	9,1	17,1
3	28	152	14,1	9,3	26,7	17,6

## Récupération

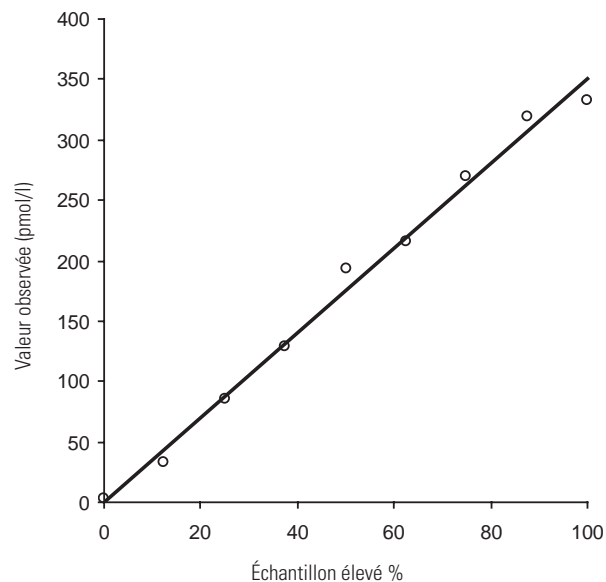
Le taux de récupération a été étudié en ajoutant de la 1,25D<sub>3</sub> aux échantillons avant de réaliser l'extraction et le dosage,

Conc, échantillon pmol/L	125D <sub>3</sub> ajoutée pmol/L	Mesurée pmol/L	Récup-ération pmol/L	Récup-eration %
62,7	46,5	106,4	43,6	94%
62,7	93,0	140,7	78,0	84%
46,2	54,4	100,6	54,4	100%
46,2	108,8	161,3	115,1	106%
			<b>Moyenne</b>	<b>96%</b>

## Linéarité

La linéarité a été évaluée conformément à la recommandation EP-6A de la NCCLS, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach" (Évaluation de la linéarité des procédures de mesure quantitative : une approche statistique), Des échantillons contenant diverses concentrations en 1,25-dihydroxyvitamine D ont été analysés en double, Les concentrations moyennes résultantes ont été comparées avec les concentrations escomptées, Les échantillons ont été préparés en diluant un échantillon patient élevé avec un échantillon patient bas avant l'extraction et le dosage, L'intervalle d'analyse est de <6-333 pmol/l,

Concentration escomptée pmol/l	Concentration mesurée pmol/l	Variation pmol/L	%
-0,1	2,5	2,6	-
43,8	32,7	-11,1	-25%
87,7	86,0	-1,7	-2%
132	129	-3,0	-2%
175	193	18,0	10%
219	215	-4,0	-2%
263	269	6,0	2%
307	319	12,0	4%
351	333	-18,0	-5%



## Spécificité

La spécificité de la trousse a été évaluée avec les analytes suivants à 50% de B/B0

Analyte	Réactivité croisée
1,25-Dihydroxyvitamine D <sub>3</sub>	100 %
1,25 Dihydroxyvitamine D <sub>2</sub>	39 %
24,25-Dihydroxyvitamine D <sub>3</sub>	0,056 %
25-Hydroxyvitamine D <sub>3</sub>	0,009 %

## Verwendungszweck

### *Nur zur in-vitro Diagnostik*

Der IDS 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Kit ist ein vollständiges Testverfahren für die Aufreinigung von 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25D) aus Humanserum oder Plasma durch Immunextraktion und nachfolgende Quantifizierung mittels Enzymimmunoassay (EIA). Die Ergebnisse, zusammen mit anderen klinischen und laborchemischen Daten, dienen dem Arzt zur Beurteilung einer 1,25D-Defizienz in Zusammenhang mit einer Nierenerkrankung bei Erwachsenen.

## Zusammenfassung und Erläuterung <sup>(1)</sup>

Vitamin D ist ein allgemein gebräuchlicher Sammelbegriff für eine Familie nah verwandter Moleküle, die vom natürlich vorkommenden 7-Dihydrocholesterin (Provitamin D<sub>3</sub>) abzuleiten sind. Das vorwiegend mit der Nahrung aufgenommene Provitamin D<sub>3</sub> setzt sich in der Haut bei Sonnenbestrahlung in einem photolytischen Prozess zu Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) um. Diese Substanz ist biologisch inaktiv, wird aber über die Blutbahn in die Leber transportiert, wo sie zu aktivem 25-Hydroxyvitamin D (25D) hydroxyliert wird. Ein kleiner Teil davon wird in der Niere weiter zu dem hoch wirksam calciotropen Hormon 1,25D hydroxyliert.

1,25D liegt im Blutkreislauf größtenteils an Vitamin D-bindendes Protein und Albumin gebunden vor. 1,25D ist einer der Hauptregulatoren des Kalzium- (und Phosphat-) Stoffwechsels. Es stimuliert die Resorption von Kalzium im Darm und erhöht den Knochenabbau. Weiterhin wird die Produktion des Parathormons (PTH) erhöht. Dies geschieht durch direkte Einwirkung auf die Nebenschilddrüsen und indirekt durch Erhöhung des Serumkalziumspiegels. Die 1,25D-Produktion wird wiederum durch PTH stimuliert und stellt somit einen effizienten Regelkreis dar.

Hypovitaminose D wird üblicherweise mit Unterversorgung durch die Nahrung in Verbindung gebracht, meist bei Vegetariern. Sie tritt auch bei ungenügender Sonnenexposition (z. B. bei älteren oder stationär in Pflege befindlichen Personen) und Hautpigmentierung auf.

Die 1,25D-Produktion scheint im frühen Stadium der Niereninsuffizienz beeinträchtigt zu sein, aber dies spiegelt nicht zwingend einen renalen Effekt wider. Im späten Stadium einer Niereninsuffizienz kann die 1 $\alpha$ -Hydroxylierung beeinträchtigt sein und somit einen niedrigen 1,25D-Spiegel bewirken.

## Beschreibung des Verfahrens

Der IDS 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Kit ist ein vollständiges Testsystem für die Aufreinigung von

1,25-Dihydroxyvitamin D aus Patientenproben durch Immunextraktion und nachfolgender Quantifizierung mittels EIA. Zunächst werden die Patientenproben von Lipiden befreit, worauf 1,25D zur Abtrennung möglicher Kreuzkontaminationen immunextrahiert wird. Die Extraktion erfolgt über 90 Minuten mit einem an eine feste Phase gekoppelten, hochspezifischen monoklonalen Anti-1,25D-Antikörper. Das Immunextraktionsgel wird gewaschen und das gereinigte 1,25D direkt in Glasröhrchen eluiert. Die rekonstituierten Eluate und Kalibratoren werden daraufhin über Nacht mit dem hochspezifischen Anti-1,25D-Schafantikörper inkubiert. Ein Teil davon wird 90 Minuten lang unter Schütteln in Vertiefungen von Mikrotiterplatten inkubiert, die mit einem spezifischen Anti-Schaf-Antikörper beschichtet sind. Daraufhin wird an Biotin gebundenes 1,25D zugegeben und die Platte weitere 60 Minuten lang geschüttelt, dann die Flüssigkeit abgesaugt und die Platten gewaschen. Dann wird Avidin, gekoppelt mit Meerrettichperoxidase, zugegeben, das selektiv an Biotinkomplexe bindet. Nach einem weiteren Waschschrift wird die Farbe mithilfe eines chromogenen Substrats (TMB) entwickelt. Die Absorption der gestoppten Reaktionsmischungen wird in einem Mikrotiterplattenlesegerät ermittelt. Die Intensität der vorhandenen Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von 1,25D.

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der IDS 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Kit ist nur für die In-Vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur so wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. IDS Limited kann über das gesetzlich festgelegte Maß hinaus nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

**VORSICHT:** Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien behandeln, als ob sie zum Übertragen von Infektionserregern fähig sind.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Kitreagenzien eingehalten werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien sollte nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.

## Humanserum: Kontrollen CTRL

Das menschliche Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch FDA empfohlene Nachweisverfahren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das humane AIDS-Virus (HIV

I und II), gegen das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus und gegen das Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß Vorgabe der Biosicherheitsstufe 2 behandelt werden.

### Natriumazid

Xn. Gesundheitsschädlich : Kalibratoren [CAL] und Kontrollen [CTRL] enthalten Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) >0,1% (G/G) (<1%).

R22 Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

R52/53 Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.

S46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.

S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

S60 Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.

Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel, das mit Blei, Kupfer oder Messing hochexplosive Metallazide bilden kann. Zum Beseitigen der Reagenzien mit viel Wasser nachspülen, um eine Azidbildung zu vermeiden.

### Elutionsmittel

Elutionsmittel [REAG 2] enthält Ethanol.

R11 Leicht entzündlich (Flammpunkt 13°C).

S7 Behälter dicht geschlossen halten.

S16 Von Zündquellen fernhalten- Nicht rauchen.

### 0,5 M Salzsäure

Die Stopp-Lösung [HCL] enthält 0,5 M Salzsäure.

R36/38 Reizt die Augen und die Haut.

S26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

### Tetramethylbenzidin

TMB Das Substrat [TMB] enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

R21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.

S36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

### Präparation der Reagenzien

**Kalibratoren [CAL]** : Kalibratoren [CAL] werden lyophilisiert geliefert. Kalibratoren direkt vor Gebrauch

verdünnen. Zu jeder Flasche 1 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser geben. Die Flasche wieder verschließen und 5-10 Minuten lang stehen lassen, dabei vorsichtig über Kopf mischen, bis die Substanz vollständig gelöst ist. NICHTAUFEINEMROLLMISCHER AUFLÖSEN – das verringert die Reaktionsstärke.

**Kontrollen [CTRL]** : Kontrollen [CTRL] werden lyophilisiert geliefert. Kalibratoren direkt vor Gebrauch verdünnen. Zu jeder Flasche 1,2 mL destilliertes oder entionisiertes Wasser geben. Die Flasche wieder verschließen und für 15-20 Minuten stehen lassen, dabei vorsichtig über Kopf mischen, bis die Substanz vollständig gelöst ist.

Sollen die Kalibratoren [CAL] oder Kontrollen [CTRL] mehr als einmal verwendet werden, müssen sie innerhalb von 15 Minuten nach dem Auflösen bei -20°C eingefroren werden. Bei erneutem Kalibratoren [CAL] oder Kontrollen [CTRL] Gebrauch bei Zimmertemperatur auftauen, gut durchmischen und innerhalb von 15 Minuten verwenden.

**Lösung mit Primärantikörper [Ab|SOLN]** : Der Primärantikörper [Ab 6x] liegt als Konzentrat vor. Den gesamten Inhalt der Flasche mit Primärantikörperpuffer [Ab|BUF] zugeben, den Stopfen wieder aufsetzen und mehrere Male umdrehen, damit die Substanzen vollständig gemischt werden

**1,25D Biotinlösung [1,25D BIOTIN|SOLN]** : Das 1,25D-Biotinkonzentrat [1,25D BIOTIN 6x] liegt in lyophilisierter Form vor. Den gesamten Inhalt der Flasche mit 1,25D-Biotinpuffer [1,25D BIOTIN|BUF] zugeben. Stopfen wieder aufsetzen und 10-15 Minuten bei Raumtemperatur stehen lassen. Mehrere Male umdrehen, damit die Substanzen vollständig gemischt werden. Soll die 1,25D-Biotinlösung [1,25D BIOTIN|SOLN] mehr als einmal verwendet werden, muss sie innerhalb von 2 Stunden nach dem Auflösen bei -20°C eingefroren werden. Bei erneutem Gebrauch bei Zimmertemperatur auftauen, gut durchmischen und innerhalb von 2 Stunden verwenden.

**Waschlösung:** Zur Herstellung der Waschlösung jede Flasche Waschkonzentrat [WASHBUF 20x] mit 950 mL destilliertem oder entionisiertem Wasser verdünnen. Bei Zimmertemperatur lagern. Alle anderen Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Vor jedem Gebrauch Reagenzien durch mehrmaliges Wenden mischen.

### Haltbarkeitsdauer und Lagerung der Reagenzien

Der Kit ist bei vorschriftsmäßiger Lagerung bis zum Ablauf des Verfalldatums verwendbar. Nach Erhalt

sind die Reagenzien bei 2-8°C zu lagern.  
Gelöste Kalibratoren **CAL** Kontrollen **CTRL** und die 1,25D-Biotinlösung **1,25D BIOTIN SOLN** sind bei -20°C 8 Wochen lang stabil.

Die Antikörperlösung **Ab SOLN** ist bei 2-8°C 8 Wochen lang stabil. Nicht verwendete, antikörperbeschichtete Mikroplattenstreifen **MICROPLAT** werden zusammen mit dem Trockenmittelbeutel zurück in den Folienbeutel gegeben und dicht verschlossen. Sie können so bis zu 8 Wochen lang bei 2-8°C aufbewahrt werden.

Die Waschlösung kann bei Raumtemperatur bis zu 8 Wochen lang aufbewahrt werden.

### Anzeichen für mögliche Unbrauchbarkeit der Kitreagenzien

Das Vorhandensein von anomalen Feststoffteilchen in den Reagenzien.

Eine Verringerung der maximalen Bindung.

Eine hohe unspezifische Bindung.

Eine Verschiebung in der Steigung der Kurve aus ihrer Normalstellung.

### Probenvorbereitung und -lagerung

Der Assay sollte mit Serum- oder Plasmaproben (EDTA oder Heparin) durchgeführt werden. Die Proben sollten so schnell wie möglich nach Abnahme abgetrennt werden. Für Langzeitlagerung sollten die Proben bei -20°C eingefroren werden. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren sind zu vermeiden.

### Testdurchführung

#### Im Kit enthaltenes Material

1. **CAL 0-6** - Kalibratoren

(**REF AC-6201A - AC-6201G**):

Lyophilisierter BSA-Puffer, der 1,25-Dihydroxyvitamin D und <0,4% Natriumazid (0,01% rekonstituiert) enthält. Für jeden Kalibrator ist der exakte Wert auf den Flaschen angegeben. 1 mL pro Flasche, 7 Flaschen pro Kit.

2. **Ab 6x** - Primärantikörperkonzentrat

(**REF AC-6202**):

Anti-1,25-Dihydroxyvitamin D vom Schaf in BSA-Phosphatpuffer mit 0,09% Natriumazid, 2 mL pro Flasche.

3. **Ab BUF** - Primärantikörperpuffer

(**REF AC-6202B**):

Anti-1,25-Dihydroxyvitamin D vom Schaf in BSA-Phosphatpuffer mit 0,09% Natriumazid, 2 mL pro Flasche.

4. **Sac-Wel™ SHEEP** - Mit Anti-Schaf-Antikörperbeschichtete Platte

(**REF AC-SH02W**):

Mikrotiterplatte mit Anti-Schaf-IgG, das an die Innenfläche der Polystyrolvertiefungen gekoppelt ist. 12 Streifen mit jeweils 8 Vertiefungen in einem Folienbeutel mit Trockenmittel.

5. **1,25D BIOTIN 6x** - 1,25D Biotinkonzentrat

(**REF AC-6203**):

Lyophilisierter Puffer, der 1,25-Dihydroxyvitamin D, markiert mit Biotin, und patentierte Stabilisatoren enthält. 2 mL pro Flasche.

6. **1,25D BIOTIN BUF** - 1,25D-Biotinpuffer

(**REF AC-6203B**):

Phosphatgepufferte Salzlösung mit 0,09% Natriumazid, 12 mL pro Flasche.

7. **ENZYMCONJ** - Enzyme Conjugat

(**REF AC-6204**):

Phosphatgepufferte Salzlösung mit Avidin, gekoppelt an Meerrettichperoxidase, Protein, Enzymstabilisatoren und Konservierungsstoffen. 24 mL pro Flasche.

8. **CTRL 1** - **CTRL 2** - Kontrollen

(**REF AC-6205A - AC-6205B**):

Lyophilisiertes Humanserum, das 1,25-Dihydroxyvitamin D und <1% Natriumazid (0,09% rekonstituiert) enthält, 1,2 mL pro Flasche, 2 Flaschen pro Kit.

9. **SORB** - Immunkapseln

(**REF AC-6206**):

Die Kapseln enthalten monoklonale Antikörper gegen 1,25-Dihydroxyvitamin D, gekoppelt mit einer festen Phase, in Suspension mit einem Inhibitor für Vitamin D-bindendes Protein. 80 Kapseln pro Kit.

10. **REAG 1** - Delipidationsmittel

(**REF AC-6207**):

Eine Lösung aus Dextransulfat und Magnesiumchlorid, 2,5 mL pro Flasche.

11. **REAG 2** - Elutionsreagenz

(**REF AC-6208**):

Ethanol, 44 mL pro Flasche.

12. **BUF** - Assaypuffer

(**REF AC-6209**):

BSA-puffer mit 0,09% Natriumazid. 12 mL pro Flasche.

### 13. **TMB** - TMB-Substrat

(**REF** **AC-TMB**):

Patentierte, wässrige Formulierung von Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid, 24 ml pro Flasche.

### 14. **HCL** - Stopp-Lösung

(**REF** **AC-STOP**):

0,5M Salzsäure, 14 mL pro Flasche.

### 15. **WASHBUF 20x** - Waschkonzentrat

(**REF** **AC-WASHL**):

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween, 50 mL pro Flasche.

### 16. Klebefolie zur Abdeckung der Platten

8 pro Kit.

### 17. Dokumentaion

Packungsbeilage und Qualitätskontrollbericht.

### Benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Materialien

1. 12 x 75 mm Borosilikat-Einwegglasröhrchen.
2. 12 x 75 mm Polystyrol-Einwegröhrchen (optional).
3. Präzisionspipetten für Volumina von 50 µL, 100 µL, 150 µL, 200 µL, 500 µL und 1mL.
4. Multipipetten für 150 µl und 500 µl, z. B. Eppendorf-Multipipette 4780 oder dergleichen.
5. Multikanal-Präzisionspipette für 100 µl und 200 µl.
6. Vortex-Mischer.
7. Überkopf- oder Rollermischer.
8. Heizblock oder Wasserbad (40°C).
9. Stickstoffzufuhr und Manifold.
10. Zentrifuge mit Leistung von 2000g.
11. Kreisschüttler.
12. Automatisches Waschgerät für Mikrotiterplatten (optional).
13. Photometer zum Messen der Mikrotiterplatten und Datenanalysegeräte.
14. Destilliertes oder entionisiertes Wasser.

### Probenvorbereitung

1. Pro Probe oder Kontrolle (**CTRL**) ein Glas- oder Plastikröhrchen beschriften. **KALIBRATOREN** (**CAL**) **NICHT ENTFETTEN!**
2. In entsprechend gekennzeichnete Reagenzgläser **500 µl** Kontrolle (**CTRL**) oder Probe geben.
3. In jedes Röhrchen **50 µL** Delipidationsreagenz (**REAG 1**) geben und vortexen. Alle Röhrchen vortexen.
4. Alle Röhrchen bei 2000 g 15 Minuten lang zentrifugieren

**Hinweis:** Pellet beim Entfetten der Proben vorsichtig behandeln. Wird das Pellet aufgewirbelt oder ist die Probe nicht klar, Zentrifugation wiederholen.

### Alternative Probenvorbereitung:

*Geeignet für Proben mit einem Volumen < 500 µL.*

1. Pro Probe ein Kunststoffröhrchen mit konischem Boden oder Mikrozentrifugenröhrchen beschriften.
2. Probe (z. B. 250 µL) in entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen geben.
3. In jedes Röhrchen das 0,1-Fache des Probenvolumens vom Delipidationsreagenz (**REAG 1**) geben (z. B. 25 µL). Alle Röhrchen vortexen.
4. Alle Röhrchen bei 2.000 g für 15 Minuten oder bei 10.000 g für 10 Minuten zentrifugieren (Mikrozentrifuge).

### Immunextraktionsverfahren

1. Immunkapseln (**SORB**) beschriften, je zwei Kapseln für jede Kontrolle (**CTRL**) und Probe. **KALIBRATOREN** (**CAL**) **NICHT IMMUNEXTRAHIEREN**. Hinweis: Immunkapsel (**SORB**) bei Anzeichen von Undichtigkeiten oder nicht ordnungsgemäßem Volumen nicht verwenden.
2. Immunkapseln (**SORB**) vortexen und Festphase absetzen lassen. Immunkapseln (**SORB**) für 3-5 Minuten senkrecht in Schaumstoff-Ständer stellen.
3. Obere Schraubverschlüsse der Immunkapseln (**SORB**) abnehmen. Zu den Immunkapseln (**SORB**) **100 µL** delipidierte Kontrolle oder Probe im Doppelansatz geben. Anschließend wieder gut verschließen
4. Immunkapseln (**SORB**) in den Schaumstoff-Ständer setzen und Ende-über-Ende rotieren lassen (5-20 Umdrehungen/Min, 90 Minuten bei Raumtemperatur, 18-25°C). Der Schaumstoff-Ständer kann dazu in einen Blutröhrchen-Rotator eingesetzt werden. Alternativ kann der Schaumstoff-Ständer in einem geeigneten Kunststoffbecher in einem Flaschen-Roller rotiert werden
5. Immunkapseln (**SORB**) für 3-5 Min. aufrecht im Schaumstoff-Ständer stellen, damit sich das Gel absetzen kann. Auf die Schraubverschlüsse klopfen, um anhaftendes Gel abzulösen. Das Gel für weitere 1-2 Minuten setzen lassen. Schraubverschlüsse entfernen und unteren Verschluss von den Immunkapseln (**SORB**) abbrechen (nicht abdrehen) und jede Immunkapsel (**SORB**) in ein Plastik- oder Glasröhrchen setzen. Bei niedriger Geschwindigkeit (500-1.000 g) für ca. 1 Min. zentrifugieren, um Probe zu entfernen.
6. In jede Immunkapsel (**SORB**) **500 µl** entionisiertes

Wasser geben. Vorsichtig zugeben, damit aus der Immunkapsel nichts herausspritzt. Bei niedriger Geschwindigkeit (500 – 1.000 g) ca. 1 Min. lang zentrifugieren, um das Immunextraktionsgel zu waschen.

7. Vorherigen Schritt noch zweimal wiederholen.
8. Für jede Immunkapsel [SORB], ein Borosilikat-Glasröhrchen beschriften und Kapseln die jeweiligen Röhrchen überführen.
9. In jede Immunkapsel **150 µL** Elutionsreagenz [REAG 2] geben. Für 1-2 Minuten in die Festphase einziehen lassen. Bei niedriger Geschwindigkeit (500-1.000g) für ca. 1 Min. zentrifugieren, um das Eluat zu gewinnen.
10. Vorherigen Schritt noch zweimal wiederholen. Das Gesamtvolumen des Eluats beträgt **450 µL** für jede Probe.
11. Immunkapseln [SORB] verwerfen und Röhrchen in einen Heizblock oder Wasserbad bei 40°C stellen. Die Eluate unter einem sanften Strom von Stickstoff verdunsten lassen. Das Verdunsten sollte 20-30 Minuten dauern. Sicherstellen, dass sich in den Röhrchen keine Flüssigkeit mehr befindet.
12. In jedes Röhrchen **100 µL** Assay-Puffer [BUF] geben und vortexen, um die Rückstände zu lösen.

**Die immungereinigten Proben sind nun bereit für die Analyse mittels Immunoassay.**

### Immunoassay-Verfahren

Kalibratoren [CAL] kurz vor dem Assay wie in "Präparation der Reagenzien" beschrieben rekonstituieren oder bereits rekonstituiertes Material auftauen. Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen. Vor Gebrauch alle Reagenzien vorsichtig mischen. Je zwei beschriftete Borosilikat-Glasröhrchen pro Kalibratoren [CAL] vorbereiten.

1. In jedes entsprechend gekennzeichnete Reagenzglas **100 µL** Kalibrator [CAL] geben. Direkt auf den Boden des Röhrchens pipettieren.
2. Probenextraktions-Röhrchen aus Schritt 12 der Immunextraktion dazu stellen.
3. In jedes Röhrchen **100 µL** primären Antikörper [Ab SOLN] geben.
4. Alle Röhrchen vorsichtig vortexen und dabei Schaumbildung vermeiden. Bei 2-8°C über Nacht (16-20 Std.) inkubieren.
5. In die entsprechenden Vertiefungen der antikörperbeschichteten Platte [MICROPLAT] jeweils **150 µL** Lösung aus Schritt 4 geben. Die ersten beiden Vertiefungen leer lassen, um den Substratleerwert zu messen. Die Platte mit einer Klebefolie verschließen und auf einem Kreisschüttler

(500-750 Umdrehungen pro Minute) bei 18-25°C 90 Minuten lang inkubieren.

6. In jede Vertiefung **100 µL** 1,25D-Biotinlösung [1,25D BIOTIN SOLN] geben. Vertiefungen zur Messung des Substratleerwerts auslassen. Die Platte mit einer Klebefolie verschließen und auf einem Kreisschüttler (500-750 Umdrehungen pro Minute) bei 18-25°C 60 Minuten lang inkubieren.
7. Jede Vertiefung dreimal mit Waschlösung waschen:

- a. Mit automatischem Plattenwaschgerät: Plattenwaschgerät so einstellen, dass mindestens 300 µL Waschlösung pro Vertiefung abgegeben werden. Je 3 Wasch- und Absaugzyklen durchführen.
- b. Waschen per Hand: Den Inhalt der Vertiefungen ausgießen, indem die Platten abrupt umgedreht werden. In jede Vertiefung 250 µL Waschlösung geben. Dekantieren und Waschvorgang zweimal wiederholen.

Die umgedrehte Platte fest auf Saugpapier ausklopfen, um überschüssigen Waschpuffer vor der Durchführung des nächsten Schritts zu entfernen.

8. In jede Vertiefung mit einer Multikanalpipette **200 µL** Enzymkonjugat [ENZYMCONJ] tgeben. Die Vertiefungen zur Messung des Substratleerwerts auslassen. Die Platte mit einer Klebefolie verschließen und bei 18-25°C 30 Minuten lang inkubieren.
9. Waschschrift 7 wiederholen.
10. In jede Vertiefung, auch in die Vertiefungen zur Messung des Substratleerwerts, mit einer Multikanalpipette **200 µL** TMB-Substrat [TMB] Die Platte mit einer Klebefolie verschließen und bei 18-25°C 30 Minuten lang inkubieren.  
*Hinweis: Das TMB-Substrat wird leicht kontaminiert. Stets nur die für den Assay erforderliche Menge aus der Flasche entnehmen. Nicht verwendetes Substrat verwerfen. Nicht wieder in die Flasche zurückgeben.*
11. In jede Vertiefung mit einer Multikanalpipette **100 µL** Stopp-Lösung [HCL] geben.
12. Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung mithilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegeräts die Absorption jeder Vertiefung bei 450 nm (Referenz 650 nm) messen.

### Qualitätskontrolle

Es empfiehlt sich, regelmäßig Kontrollproben unterschiedlicher Konzentrationen einzusetzen, um sicherzustellen, dass reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Es sind zwei Kontrollen enthalten. Die





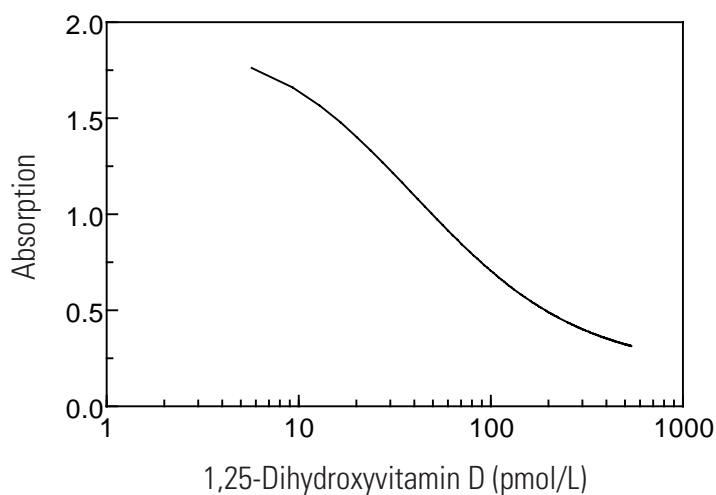
## Beispieldaten

Diese Daten dienen nur zur Illustration und sollten nicht für die Berechnung der Probenergebnisse verwendet werden.

Vertiefung	Beschreibung	Abs.	Mittlere Abs.	B/Bo%	Ergebnis pmol/L
A1, A2	Substrate blank	-0,006 0,006	0,000		
B1, B2	Kalibrator 0 0 pmol/L	1,956 1,992	1,974	100,0	
C1, C2	Kalibrator 1 5,7 pmol/L	1,746 1,776	1,761	89,2	
D1, D2	Kalibrator 2 13,4 pmol/L	1,572 1,553	1,563	79,2	
E1, E2	Kalibrator 3 34,0 pmol/L	1,132 1,179	1,156	58,5	
F1, F2	Kalibrator 4 112 pmol/L	0,682 0,686	0,684	34,7	
G1, G2	Kalibrator 5 246 pmol/L	0,419 0,457	0,438	22,2	
H1, H2	Kalibrator 6 544 pmol/L	0,315 0,304	0,310	15,7	
A3, A4	Probe 1	1,109 1,158	1,134	57,4	37,2
B3, B4	Probe 2	0,532 0,547	0,540	27,4	169

## Typische Eichkurve

Diese Eichkurve dient nur der Veranschaulichung.



## Gebrauchseinschränkungen

- 1 Die Messung kann die Menge von 1,25-Dihydroxyvitamin D im Blutkreislauf von Patienten, die eine Vitamin D<sub>2</sub>-Therapie erhalten, zu niedrig angeben.
- 2 Proben, von denen anzunehmen ist, dass sie eine höhere Konzentration als der höchste Standard aufweisen, sollten verdünnt untersucht werden.
3. Die Leistungskennzeichen dieses Tests wurden bei pädiatrischen Populationen nicht bestimmt.
4. Die Ergebnisse sollten immer gemeinsam mit dem klinischem Bild und anderen für den Arzt zur Verfügung stehenden Informationen über den Patienten gedeutet werden.
5. Die folgenden Substanzen wurden entsprechend der NCCLA-Richtlinie EP7-A, „Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline“ geprüft und haben keinen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse der IDS 1,25-Dihydroxyvitamin D-Bestimmung:

Hämoglobin	geprüft bis 500 mg/dL
Bilirubin	geprüft bis 20 mg/dL
Lipid	geprüft bis 2803 mg/dL
Harnstoff	geprüft bis 500 mg/dL

## Erwartete Ergebnisse

Die folgenden Werte wurden mit dem IDS 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Kit bestimmt und sind nur als Richtlinie angeführt. Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich für die lokale Bevölkerung festlegen. Das 95%-Referenzintervall für gesunde Erwachsene, das anhand von 120 offensichtlich gesunden Erwachsenen berechnet wurde, wurde durch ein nicht-parametrisches Verfahren entsprechend der NCCLS-Richtlinie C28-A2, „How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory“, errechnet.

Gesunde Erwachsene: 39-193 pmol/L (n=120)

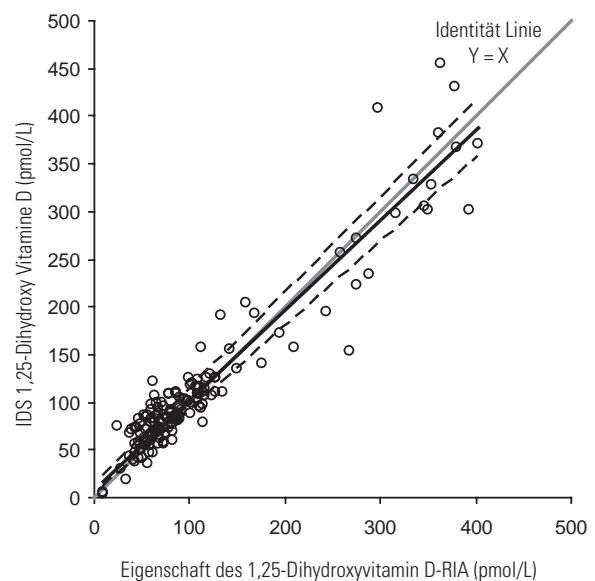
Niereninsuffizienz im Endstadium: \* <6-22 pmol/L (n=24)

\*Beobachteter Wertebereich.

## Daten zum Test

### Richtigkeit

Der IDS 1,25-Dihydroxyvitamin-D-Kit wurde mit einem anerkannten RIA zur quantitativen Bestimmung von 1,25-Dihydroxyvitamin-D entsprechend der NCCLS-Richtlinie „Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples“ verglichen. In jedem Verfahren wurde eine Population von 152 Proben getestet, die so ausgewählt waren, dass sie einen weiten Bereich von 1,25-Dihydroxyvitamin D [10 - 402 pmol/L] repräsentierten. Mit den Vergleichsdaten wurde eine Regressionsanalyse nach Passing & Bablok durchgeführt:  $IDS = 0,94(x) + 7,2$  (95% CI der Steigung und des Achsenabschnitts waren 0,89 bis 1,01 bzw. 2,1 bis 12,7); Korrelationskoeffizient ( $r$ ) = 0,95



### Sensitivität

Die Sensitivität ist definiert als jene Konzentration, die dem Mittelwert minus 2 Standardabweichungen von 20 Doppelbestimmungen des Nullkalibrators entspricht. Sie wurde als 6 pmol/L (2,5 pg/mL) bestimmt.

### Präzision

Die Präzision wurde entsprechend NCCLS EP-5A2, „Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods“ bestimmt. Über 17 Testtage und mehr als 49 Betriebsdate wurden drei Humanserumkontrollen geprüft. Die Tests wurden von mehreren Anwendern mit mehreren Reagenzienchargen durchgeführt.

Kontrolle	n	Mittelwert (pmol/L)	Intra-Assay		Gesamt	
			SD	CV%	SD	CV%
1	28	19,0	2,0	10,7	3,8	19,7
2	28	53,2	5,6	10,5	9,1	17,1
3	28	152	14,1	9,3	26,7	17,6

## Wiederfindung

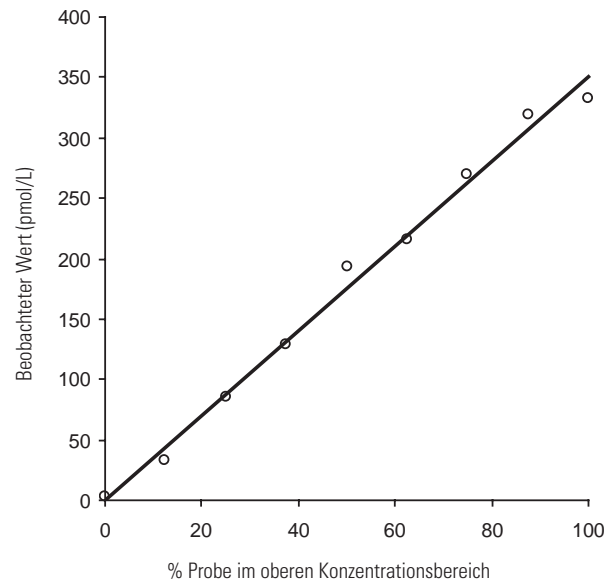
Die Wiederfindung wurde durch Zugabe von 1,25-D<sub>3</sub> vor der Extraktion und Messung bestimmt.

Probenkonz pmol/L	125D <sub>3</sub> zugegebenes pmol/L	gemessene pmol/L	Wiederfindung pmol/L	Wiederfindung %
62,7	46,5	106,4	43,6	94%
62,7	93,0	140,7	78,0	84%
46,2	54,4	100,6	54,4	100%
46,2	108,8	161,3	115,1	106%
<b>Mittelwert</b>			<b>96%</b>	

## Linearität

Die Linearität wurde entsprechend NCCLS EP-6A, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach" bestimmt. Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen von 1,25-Dihydroxyvitamin D wurden in doppelter Ausführung gemessen. Die resultierenden Konzentrationsmittelwerte wurde mit den prognostizierten Konzentrationen verglichen. Die Proben wurden durch Verdünnung einer hohe Patientenprobe mit einer niedrigen Patientenprobe vor der Extraktion und Messung vorbereitet. Der dokumentierbare Bereich wurde auf <6-333 pmol/L festgelegt.

Prognose der Konzentration pmol/L	Gemessene Konzentration pmol/L	Variation	
		pmol/L	%
-0,1	2,5	2,6	-
43,8	32,7	-11,1	-25%
87,7	86,0	-1,7	-2%
132	129	-3,0	-2%
175	193	18,0	10%
219	215	-4,0	-2%
263	269	6,0	2%
307	319	12,0	4%
351	333	-18,0	-5%



## Spezifität

Die Spezifität des Antiserums wurde mit den folgenden Analyten bei 50% Bindung des Nullkalibrators ermittelt.

Analyt	Kreuzreaktivität
1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	100 %
1,25-Dihydroxyvitamin D <sub>2</sub>	39 %
24.25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	0,056 %
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub>	0,009 %

## Uso previsto

### *Per uso diagnostico in vitro*

Il kit IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D è un sistema di dosaggio completo per la purificazione della 1,25-diidrossivitamin D (1,25D) nel siero o nel plasma umano mediante immunoestrazione seguita da quantizzazione mediante dosaggio immunoenzimatico. I risultati devono essere impiegati in associazione ad altri dati clinici e di laboratorio a supporto del clinico che valuta la carenza da 1,25D associata a nefropatia nella popolazione adulta.

## Sommario e Spiegazione <sup>(1)</sup>

Il nome vitamina D è un termine generale comunemente usato per identificare i componenti di una famiglia di molecole strettamente connesse, derivate dal 7-deidrocolesterolo (pro-vitamina D<sub>3</sub>), presente in natura. La pro-vitamina D<sub>3</sub> subisce una conversione fotolitica nella pelle per divenire la vitamina D<sub>3</sub> 'madre' (colecalfiferolo), in seguito all'esposizione alla luce solare. Questo composto è biologicamente inattivo, ma entra in circolo e viene idrossilato nel fegato nella 25-idrossivitamin D attiva (25D). Una piccola parte della 25D viene ulteriormente idrossilata nei reni nel potentissimo ormone calcitropico 1,25D.

1,25D circola in gran parte legata alla proteina di legame della vitamina D e all'albumina. La 1,25D è uno dei principali regolatori del metabolismo del calcio (e dei fosfati): stimola l'assorbimento di calcio da parte dell'intestino e aumenta il riassorbimento osseo. Inoltre inibisce la produzione dell'ormone paratiroideo (PTH) sia con azione diretta sulle ghiandole paratiroidee che indiretta aumentando i livelli di calcio nel siero. La stessa produzione di 1,25D è stimolata dall'ormone paratiroideo (PTH), determinando in questo modo un efficace sistema di controllo.

La ipovitaminosi D è comunemente associata all'insufficienza alimentare, per lo più dovuta alla dieta esclusivamente vegetariana, ed è inoltre associata ad una scarsa esposizione alla luce solare (come per le persone anziane e istituzionalizzate) e alla pigmentazione cutanea.

La produzione di 1,25D sembra essere compromessa in casi di precoce insufficienza renale, benché ciò possa non essere causato dai reni. In caso di insufficienza renale all'ultimo stadio, la 1 $\alpha$ -idrossilazione può essere compromessa determinando bassi livelli di 1,25D.

## Descrizione del metodo

Il kit IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D è un sistema di dosaggio completo per la purificazione della 1,25D in campioni di paziente mediante immunoestrazione

seguita da quantizzazione mediante EIA. I campioni di paziente vengono delipidati e la 1,25D viene separata da potenziali cross-reagenti mediante incubazione per 90 minuti con un anticorpo monoclonale anti-1,25D altamente specifico, legato alla fase solida. Il gel per l'immunoestrazione viene quindi lavato e la 1,25D purificata viene eluita direttamente in provette in vetro per il dosaggio. Gli eluati e i calibratori ricostituiti sono incubati 18-24 ore con un anticorpo anti-1,25D altamente specifico di pecora. In seguito, una porzione di questo anticorpo viene incubato per 90 minuti agitando nei pozzetti della micropiastra rivestiti di un anticorpo specifico anti-pecora. Viene quindi aggiunta la 1,25D unita alla biotina e la piastra viene agitata per altri 60 minuti prima dell'aspirazione e del lavaggio. Viene aggiunta avidina marcata con enzima (perossidasi di rafano) e si formano legami selettivi con la biotina del complesso e, dopo una ulteriore fase di lavaggio, si sviluppa colore utilizzando un substrato cromogenico (TMB). L'assorbanza delle miscele di reazione stoppate viene letta in un lettore di piastra microtiter, tenendo presente che l'intensità del colore sviluppata è inversamente proporzionale alla concentrazione di 1,25D.

## Precauzioni e avvertenze

Il kit 1,25-Dihydroxy Vitamin D è esclusivamente per uso diagnostico in vitro e non è concepito per l'uso interno in esseri umani o animali. Questo prodotto va utilizzato in ottemperanza alle istruzioni per l'uso allegate. La IDS Limited non risponderà di eventuali perdite o danni (ad eccezione di quanto predisposto dalla legge), indipendentemente dalla loro natura, sorti dal non corretto utilizzo del kit in base alle istruzioni fornite.

**ATTENZIONE:** il presente kit contiene materiale di origine umana e/o animale. Manipolare i reagenti del kit come potenziali vettori di agenti infettivi.

È necessario seguire le opportune precauzioni e le corrette prassi di laboratorio nella conservazione, manipolazione e nello smaltimento dei reagenti del kit. Lo smaltimento dei reagenti del kit va eseguito nel rispetto delle normative vigenti.

## Siero umano: Controlli CTRL

I materiali di origine umana utilizzati nella preparazione di questi prodotti sono stati testati mediante dosaggi approvati dalla FDA per quanto riguarda la presenza di anticorpi anti-HIV (HIV I e HIV II), di antigeni di superficie del virus dell'epatite B, di anticorpi anti-epatite B e hanno dato risultati negativi. Poiché nessun metodo di indagine è in grado di garantire l'assenza di agenti infettivi, questi vanno maneggiati

come materiali potenzialmente infettivi (livello 2 di biosicurezza)

### Sodio Azide

Xn. Nocivo: I calibratori [CAL] e i controlli [CTRL] contengono sodio azide ( $\text{NaN}_3$ ) >0,1% (p/p) (<1%).

R22 Nocivo in caso di ingestione.

R52/53 Nocivo per gli organismi acquatici, può provocare a lungo termine effetti negativi per l'ambiente acquatico.

S46 In caso d'ingestione consultare immediatamente un medico recando con sé l'imballaggio o l'etichetta.

S36/37 Indossare un indumento di protezione adeguato e guanti.

S60 Questo materiale e/o il suo contenitore devono essere smaltiti come rifiuti pericolosi.

Alcuni reagenti del kit contengono sodio azide come conservante. Tale sostanza può reagire con il piombo, il rame e l'ottone utilizzati nelle tubature di scarico, formando azoturi altamente esplosivi. Durante lo smaltimento attraverso i normali scarichi, per evitare l'accumulo di azoturi pericolosi, fare scorrere abbondanti volumi d'acqua.

### Reagente di Eluizione

Il reagente di eluizione [REAG 2] contiene etanolo.

R11 Altamente infiammabile (punto di infiammabilità 13°C).

S7 Conservare il recipiente saldamente chiuso.

S16 Conservare lontano da fonti di fuoco - Non fumare.

### Acido cloridrico 0,5M

La soluzione di arresto [HCL] contiene 0,5M di acido cloridrico.

R36/38 Irritante per gli occhi e per la pelle.

S26 In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con acqua abbondante e consultare un medico.

S36/37 Indossare appositi abiti e guanti di protezione.

### Tetramethylbenzidine

Il substrato [TMB] contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

R21/22 Nociva a contatto con la pelle e per ingestione.

S36/37 Indossare appositi abiti e guanti di protezione.

### Preparazione dei reagenti

**Calibratori [CAL]** : I calibratori [CAL] vengono forniti in forma liofilizzata. Ricostituire immediatamente prima dell'uso. Aggiungere 1 ml di acqua distillata o deionizzata ad ogni flacone. Rimettere il tappo e attendere 5-10 minuti, capovolgere più volte i flaconi per assicurare una ricostituzione completa. NON RICOSTITUIRE SU UN VORTEX- ne conseguirà una perdita potenza.

**Controlli [CTRL]** : I controlli [CTRL] vengono forniti in forma liofilizzata. Ricostituire immediatamente prima dell'uso. Aggiungere 1,2 ml di acqua distillata o deionizzata ad ogni flacone. Rimettere il tappo e attendere 15-20 minuti, capovolgendo più volte i flaconi per assicurare una ricostituzione completa. Sei calibratori [CAL] o i controlli [CTRL], devono essere utilizzati più di una volta, essi devono essere congelati (- 20° C) entro 15 minuti dalla ricostituzione. Quando si riutilizzano calibratori [CAL] o controlli [CTRL] congelati, far scongelare a temperatura ambiente, miscelare bene e utilizzare entro 15 minuti.

**Soluzione di anticorpo primario [Ab] [SOLN]** : Il concentrato di anticorpo primario [Ab] [6x] è fornito come concentrato. Aggiungere l'intero contenuto del flacone del tampone di anticorpo primario [Ab] [BUF], rimettere il tappo e capovolgere più volte per garantire la miscelazione completa.

**Soluzione di biotina 1,25D [1,25D BIOTIN] [SOLN]** : Il concentrato di biotina 1,25D [1,25D BIOTIN] [6x] è fornita liofilizzata. Aggiungere l'intero contenuto del flacone del tampone di biotina 1,25D [1,25D BIOTIN] [BUF]. Rimettere il tappo e lasciare riposare per 10-15 minuti a temperatura ambiente. Capovolgere più volte per garantire una ricostituzione completa. Se la soluzione di biotina 1,25D [1,25D BIOTIN] [SOLN] deve essere utilizzata più di una volta, essa deve essere congelata (-20°C) entro 2 ore dalla ricostituzione. Quando si utilizza la soluzione di biotina 1,25D [1,25D BIOTIN] [SOLN] congelata, far scongelare a temperatura ambiente, miscelare bene e utilizzare entro 2 ore.

**Soluzione di lavaggio:** Preparare aggiungendo il contenuto di ogni flacone del concentrato di lavaggio [WASHBUF] [20x] a 950 ml di acqua distillata o deionizzata. Conservare a temperatura ambiente.

Tutti gli altri reagenti sono forniti pronti per l'uso. Prima dell'uso, portare a temperatura ambiente di tutti i reagenti.

Prima dell'uso nel dosaggio, i reagenti vanno miscelati capovolgendo più volte.

## Durata e conservazione dei reagenti

Il presente kit, se correttamente conservato, è stabile fino alla data di scadenza indicata. Dopo il ricevimento, conservare tutti i reagenti a 2-8° C.

I calibratori [CAL], i controlli [CTRL] e la soluzione di biotina 1,25D [1,25D BIOTIN SOLN] ricostituiti sono stabili a -20° C per 8 settimane.

La soluzione di anticorpo [Ab SOLN] è stabile a 2-8°C per 8 settimane.

Le strisce non utilizzate della piastra rivestita di anticorpo [MICROPLAT] devono essere rimesse nella busta di alluminio unitamente al sacchetto con la sostanza essiccante; chiudere la busta con l'autosigillante. Conservare ad una temperatura di 2-8°C per un massimo di 8 settimane.

La soluzione di lavaggio può essere conservata a temperatura ambiente per un massimo di 8 settimane.

## Possibili segni di deterioramento dei reagenti del kit

Presenza di materia particolata anomala in qualsiasi reagente.

Diminuzione della capacità di legame massima.

Elevato livello di legame non specifico.

Traslazione della pendenza della curva dalla sua posizione normale.

## Raccolta e conservazione dei campioni

Il dosaggio va eseguito su campioni di siero o plasma (EDTA o eparina). I campioni vanno separati il più presto possibile dopo il prelievo. Per la conservazione a lungo termine, riporli a -20°C. Non sottoporli a cicli ripetuti di congelamento /scongelo.

## Procedura

### Materiali forniti

#### 1. [CAL] [0] - [6] - Calibratori

([REF] AC-6201A - AC-6201G):

Tampone BSA liofilizzato contenente 1,25-diidrossivitamina D e sodio azide allo <0,4% (0,01% ricostituito). L'esatto valore di ogni calibratore è stampato sull'etichetta dei flaconi. 1 ml per flacone, 7 flaconi per kit.

#### 2. [Ab] [6x] - Concentrato di anticorpo primario ([REF] AC-6202):

Anti-1,25-diidrossivitamina D di pecora in tampone BSA-fosfato con sodio azide allo 0,09%, 2 ml per flacone.

#### 3. [Ab] [BUF] - Tampone di anticorpo primario ([REF] AC-6202B):

Reagente brevettato contenente tampone fosfato con sodio azide allo 0,09%. 10 ml per flacone.

#### 4. Sac-Wel™ [SHEEP] - Piastra rivestita di anti pecora

([REF] AC-SH02W):

Micropiastra con pozzetti in polistirolo con superficie interna rivestita di anti-pecora IgG, 12 x 8 pozzetti in busta di alluminio con sostanza essiccante.

#### 5. [1,25D BIOTIN] [6x] - Concentrato di biotina 1,25D ([REF] AC-6203):

Tampone liofilizzato contenente 1,25-diidrossivitamina D marcata con biotina, e sostanze stabilizzanti brevettate, 2ml per flacone.

#### 6. [1,25D BIOTIN] [BUF] - Tampone di biotina ([REF] AC-6203B):

Soluzione fisiologica tamponata con fosfato con sodio azide allo 0,09%, 12 ml per flacone.

#### 7. [ENZYMCONJ] - Coniugato enzimatico ([REF] AC-6204):

Soluzione fisiologica tamponata con fosfato contenente avidina legata a perossidasi di rafano, proteine, stabilizzatori enzimatici e conservanti, 24ml per flacone.

#### 8. [CTRL] [1] - [CTRL] [2] - Controlli ([REF] AC-6205A - AC-6205B):

Siero umano liofilizzato contenente 1,25-diidrossivitamina D e sodio azide allo <1% (0,09% ricostituito), 1,2ml per flacone, 2 flaconi per kit.

#### 9. [SORB] - Immunocapsule ([REF] AC-6206)

Capsule contenenti anticorpo monoclonale di 1,25-diidrossivitamina D legata a particelle in fase solida in sospensione con inibitore della proteina legante la vitamina D, 80 immunocapsule per kit.

#### 10. [REAG] [1] - Reagente di delipidazione ([REF] AC-6207):

Una soluzione di dextran solfato e cloruro di magnesio, 2,5 ml per flacone.

#### 11. [REAG] [2] - Reagente di eluizione ([REF] AC-6208):

Etanolo, 44 ml per flacone.

#### 12. [BUF] - Tampone di dosaggio ([REF] AC-6209):

Tampone BSA con sodio azide allo 0,09%, 12 ml per flacone.

#### 13. [TMB] - TMB Substrato ([REF] AC-TMB):

Formula acquosa brevettata di tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno, 24 ml per flacone.

**14. HCL - Soluzione di arresto**

(REF AC-STOP):

0,5M di acido cloridrico, 14 ml per flacone.

**15. WASHBUF 20x - Soluzione di lavaggio concentrata**

(REF AC-WASHL):

Soluzione salina tamponata con fosfato contenente Tween, 50 ml per flacone.

**16. Sigillante adesivo per piastra**

8 per kit

**17. Documentazione**

Contenente le istruzioni per l'uso e rapporto sul QC (controllo qualità).

**Materiali richiesti, ma non forniti**

1. Provette da 12 x 75 mm di vetro borosilicato a perdere.
2. Provette da 12 x 75 mm in polistirolo (opzionali).
3. Pipette di precisione per dispensare 50µl, 100µl, 150µl, 200µl, 500µl, e 1ml.
4. Pipette a ripetizione per dispensare 150µl e 500µl, tipo Eppendorf Multipipette 4780 o equivalenti.
5. Pipette multicanale di precisione per dispensare 100µl e 200µl.
6. Agitatore vortex.
7. Miscelatore a ribaltamento o rotante.
8. Blocco riscaldante o bagnomaria a 40° C.
9. Bombola di azoto e collettore.
10. Centrifuga da 2000 g.
11. Agitatore orbitale.
12. Lavatore automatico per micropiastra (opzionale).
13. Lettore fotometrico di micropiastra e software per l'analisi dei dati.
14. Acqua distillata o deionizzata.

**Preparazione campioni**

1. Numerare le provette in vetro o plastica, una per ciascun controllo CTRL e campione sconosciuto. NON DELIPIDARE I CALIBRATORI CAL.
2. Aggiungere **500µl** di ogni controllo CTRL o di campione alle rispettive provette.
3. Aggiungere **50µl** di reagente di delipidazione REAG 1 ad ogni provetta. Agitare su vortex tutte le provette.
4. Centrifugare tutte le provette a 2000g per 15 minuti.

**Nota:** Fare attenzione a non risospendere i granuli mentre si maneggiano i campioni delipidati. Se i granuli entrano in sospensione o se il campione non è chiaro, ripetere la centrifugazione.

**Preparazione alternativa dei campioni:**

*Procedura per campioni con volume inferiore a 500µl.*

1. Numerare le provette in plastica con fondo conico o le provette per microcentrifuga, una per ogni campione.
2. Aggiungere il campione (ad es. 250µl) alle relative provette.
3. Aggiungere 0,1 x volume di campione di reagente di delipidazione REAG 1 (ad es. 25µl) ad ogni provetta. Agitare su vortex tutte le provette.
4. Centrifugare tutte le provette a 2000g per 15 minuti, o a 10000 g per 10 minuti (microcentrifuga).

**Procedura di immunoestrazione**

1. Numerare le immunocapsule SORB, due per ogni controllo CTRL e campione. NON PROCEDERE ALL'IMMUNOESTRAZIONE DEI CALIBRATORI CAL. Nota: Non utilizzare una immunocapsula SORB che presenti segni di perdita o un volume non corretto.
2. Agitare su vortex le immunocapsule SORB e permettere alla fase solida di depositarsi. Posizionare verticalmente le immunocapsule SORB nel portaprovette in espanso per 3-5 minuti
3. Rimuovere i tappi a vite superiori dalle immunocapsule SORB. Aggiungere in doppio **100µl** di campione delipidato o di controllo nelle immunocapsule SORB. Ritappare con cura le immunocapsule.
4. Posizionare le immunocapsule SORB sul portaprovette in espanso e far ruotare ad una velocità di 5-20 giri/minuto per 90 minuti a temperatura ambiente (18-25° C). I portaprovette in espanso possono essere agevolmente attaccati a un rotatore di provette ematiche per mezzo di fenditure ritagliate. In alternativa il portaprovette può essere infilato in un apposito beaker in plastica e fatto ruotare su un miscelatore rotante per flaconi
5. Mettere le immunocapsule SORB in posizione verticale nel portaprovette in espanso per 3-5 minuti in modo da permettere al gel di depositarsi. Picchiettare sui tappi per staccare il gel eventualmente depositato. Attendere per altri 1-2 minuti per permettere al gel di depositarsi. Rimuovere il tappo a vite e aprire il tappo del fondo (senza ruotarlo) staccandolo dalle immunocapsule SORB e collocare ogni immunocapsula SORB in una provetta in plastica (o vetro). Centrifugare a bassa velocità (500- 1000g) per circa 1 minuto per rimuovere il campione.
6. Aggiungere **500µl** di acqua deionizzata ad ogni



- immunocapsula [SORB]. Procedere con attenzione per far sì che non schizzi fuori la fase solida dall'immunocapsula [SORB]. Centrifugare a bassa velocità (500-1000g) per circa 1 minuto per allontanare la soluzione di lavaggio.
7. Ripetere la fase di lavaggio sopra descritta per altre due volte.
  8. Numerare le provette in vetro borosilicato, una per ciascuna immunocapsula [SORB], e trasferire le immunocapsule [SORB] nelle provette in vetro.
  9. Aggiungere **150µl** di reagente di eluizione [REAG 2] a tutte le immunocapsule [SORB]. Permettere al reagente di stare a contatto con la fase solida per 1-2 minuti. Centrifugare a bassa velocità (500-1000g) per circa 1 minuto per raccogliere l'eluato.
  10. Ripetere la fase di eluizione sopra descritta per altre due volte. Il volume totale di eluato raccolto è pertanto pari a **450 µL** per ogni campione.
  11. Eliminare le immunocapsule [SORB] e collocare le provette in un blocco riscaldante o a bagnomaria a 40° C. Fare evaporare gli eluati in leggera corrente di azoto. L'evaporazione deve durare 20 - 30 minuti. Verificare che nelle provette non rimanga del liquido.
  12. Aggiungere **100µl** di tampone di dosaggio [BUF] ad ogni provetta e agitare su vortex per sciogliere il residuo.

### **I campioni immunopurificati sono ora pronti per il dosaggio.**

#### **Procedura di dosaggio**

Ricostituire i calibratori [CAL] immediatamente prima della procedura di dosaggio come descritto nel paragrafo Preparazione dei Reagenti, oppure scongelare i materiali precedentemente ricostituiti. Prima dell'uso, portare a temperatura ambiente di tutti i reagenti. Miscelare tutti i reagenti delicatamente prima dell'uso nella procedura di dosaggio. Numerare le provette in vetro borosilicato, due per ogni Calibratore [CAL].

1. Aggiungere **100µl** di ogni Calibratore [CAL] nelle rispettive provette. Pipettare i calibratori direttamente alla base della provetta.
2. Riunire le provette con gli estratti di campione dal punto 12 di cui sopra.
3. Aggiungere **100µl** di soluzione di anticorpo primario [Ab SOLN] in tutte le provette.
4. Agitare delicatamente su vortex tutte le provette, evitando la formazione di schiuma. Incubare durante la notte a 2-8° C per 16-20 ore.
5. Aggiungere **150µl** di soluzione dal punto 4 ai relativi pozzetti della piastra rivestita di anticorpo [MICROPLAT]. Lasciare vuoti i primi due pozzetti

per i vuoti di substrato. Coprire la piastra con un sigillante adesivo per piastra ed incubare su uno agitatore orbitale (500-750gpm) a 18-25°C per 90 minuti.

6. Aggiungere **100µl** di soluzione di biotina 1,25D [1,25D BIOTIN SOLN] tutti i pozzetti ad eccezione dei vuoti di substrato. Coprire la piastra con un sigillante adesivo per piastra ed incubare su uno agitatore orbitale (500-750gpm) a 18-25°C per 60 minuti.
7. Lavare tutti i pozzetti tre volte con soluzione di lavaggio:
  - a. Lavaggio automatico della piastra: utilizzare almeno 300µl di soluzione di lavaggio per pozzetto. Riempire ed aspirare per 3 cicli.
  - b. Lavaggio manuale: lasciare decantare il contenuto dei pozzetti capovolgendoli con decisione. Dispensare 250µl di soluzione di lavaggio in tutti i pozzetti.

Lasciare decantare e ripetere due volte. Prima di procedere al passaggio successivo, picchiettare con decisione la piastra capovolta su una salvietta assorbente per rimuovere la soluzione di lavaggio in eccesso.

8. Aggiungere **200µl** di coniugato enzimatico [ENZYMCONJ] a tutti i pozzetti ad eccezione dei vuoti di substrato usando una pipetta multicanale. Coprire la piastra con un sigillante adesivo per piastra ed incubare la piastra a 18-25°C per 30 minuti.
9. Ripetere la fase di lavaggio 7.
10. Aggiungere **200µl** di substrato TMB [TMB] a tutti i pozzetti compresi i vuoti di substrato usando una pipetta multicanale. Coprire la piastra con un sigillante adesivo per piastra ed incubare la piastra a 18-25°C per 30 minuti.  
*Nota: il substrato TMB può essere facilmente contaminato. Prelevare dal flacone solamente la quantità richiesta per l'analisi. Il substrato TMB inutilizzato va gettato, non versato nuovamente nel flacone.*
11. Aggiungere **100µl** di soluzione di arresto [HCL] a tutti i pozzetti usando una pipetta multicanale.
12. Misurare l'assorbanza di ciascun pozzetto a 450nm (riferimento 650nm) mediante lettore di micropiastre entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

#### **Controllo di qualità**

Per garantire la validità dei risultati nelle analisi di tutti i giorni, usare regolarmente dei campioni di controllo a diversa concentrazione di analita. Il kit fornisce due controlli. Questi controlli devono essere

testati come campioni sconosciuti. I valori ottenuti dai controlli vanno inseriti in apposite tabelle di controllo della qualità, concepite per tracciare nel tempo il rendimento del metodo.

### Calcolo dei risultati

Calcolare la percentuale di legame (B/Bo%) di ogni calibratore, controllo e campione sconosciuto in base alla seguente formula:

$$B/Bo\% = \frac{\text{assorb. media. assorb.} - \text{media vuoto di substrato}}{\text{assorb. media per lo standard}} \times 100$$

(assorb. media per lo standard / assorb. - media vuoto di substrato)

Tracciare una curva di calibrazione su carta semilogaritmica, ponendo B/Bo% in ordinata e le concentrazioni di 1,25-diidrossivitamina D in ascissa. Calcolare B/Bo% per ciascun campione sconosciuto e leggere i valori dalla curva in pmol/L. Per l'interpolazione dei dati è possibile utilizzare vari algoritmi di calcolo, come i programmi di riduzione automatica dei dati; l'operatore deve comunque sempre accertarsi che la curva scelta sia appropriata e che sia in grado di fornire risultati affidabili. Si consiglia l'uso di una curva spline approssimata o di una curva logistica a 4 parametri. IDS calcola i risultati utilizzando un software MultiCalc per la riduzione dati (PerkinElmer) con una curva logistica a 4 parametri che rileva l'assorbanza netta versus la concentrazione log.

Il range di dosaggio riferibile è 6 - 500 pmol/L. Ogni valore letto al di sotto del calibratore minore, 6 pmol/L, è un valore estrapolato e può essere riportato come "inferiore a 6 pmol/L".

Conversione delle unità:

$$\begin{array}{ccc} & \times 0,42 \Rightarrow & \\ X \text{ pmol/L} & & Y \text{ pg/mL} \\ & \Leftarrow \times 2,4 & \end{array}$$

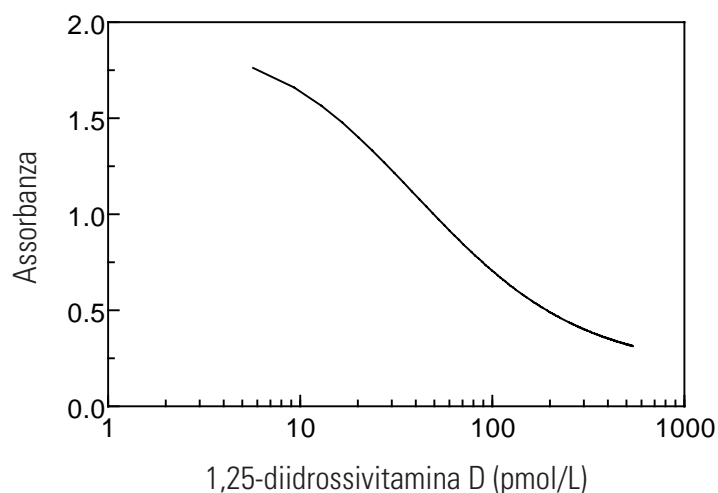
### Dati esemplificativi del dosaggio

I seguenti dati sono forniti unicamente a scopo esemplificativo e non vanno quindi utilizzati per il calcolo dei risultati dei campioni analizzati.

Pozzetto	Descrizione	Assorb.	Assorb. media.	B/Bo%	Risultato pmol/L
A1, A2	Vuoto di substrato	-0,006 0,006	0,000		
B1, B2	Calibratore 0 0 pmol/L	1,956 1,992	1,974	100,0	
C1, C2	Calibratore 1 5,7 pmol/L	1,746 1,776	1,761	89,2	
D1, D2	Calibratore 2 13,4 pmol/L	1,572 1,553	1,563	79,2	
E1, E2	Calibratore 3 34,0 pmol/L	1,132 1,179	1,156	58,5	
F1, F2	Calibratore 4 112 pmol/L	0,682 0,686	0,684	34,7	
G1, G2	Calibratore 5 246 pmol/L	0,419 0,457	0,438	22,2	
H1, H2	Calibratore 6 544 pmol/L	0,315 0,304	0,310	15,7	
A3, A4	Campione 1	1,109 1,158	1,134	57,4	37,2
B3, B4	Campione 2	0,532 0,547	0,540	27,4	169

### Curva di calibrazione tipica

La seguente curva di calibrazione è fornita unicamente a titolo esemplificativo.



## Limitazioni d'uso

1. Il dosaggio potrebbe sottovalutare la concentrazione di 1,25-diidrossivitamina D nei pazienti sottoposti alla terapia con vitamina D<sub>2</sub>.
2. E' necessario diluire i campioni che possano avere concentrazioni di analita superiori a quelle del calibratore a concentrazione più elevata.
3. Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
4. Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati vanno interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e ad altre informazioni a disposizione del medico.
5. Le seguenti sostanze sono state analizzate - secondo la linea guida EP7-A dell'NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), "Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline" (Interferenze in chimica clinica: linee guida approvate) - e non hanno mostrato interferenze nel dosaggio IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D:

Emoglobina	testata fino a 500 mg/dl
Bilirubina	testata fino a 20 mg/dl
Lipidi	testata fino a 2803 mg/dl
Urea	testata fino a 500 mg/dl

## Valori attesi

A titolo informativo vengono forniti i seguenti range di riferimento ottenuti con il kit IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D. Ogni laboratorio deve determinare i propri intervalli di riferimento in base alla popolazione locale. L'intervallo di riferimento al 95% per gli Adulti Normali, raccolto da 120 adulti apparentemente in salute, è stato calcolato mediante un metodo non-parametrico in base alla linea guida C28-A2 del NCCLS, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (Come definire e determinare gli intervalli di riferimento nella pratica clinica di laboratorio).

Adulti normali: 39-193 pmol/L (n=120)

Nefropatia in fase terminale\* <6-22 pmol/L (n=24)

\*Range di valori osservato.

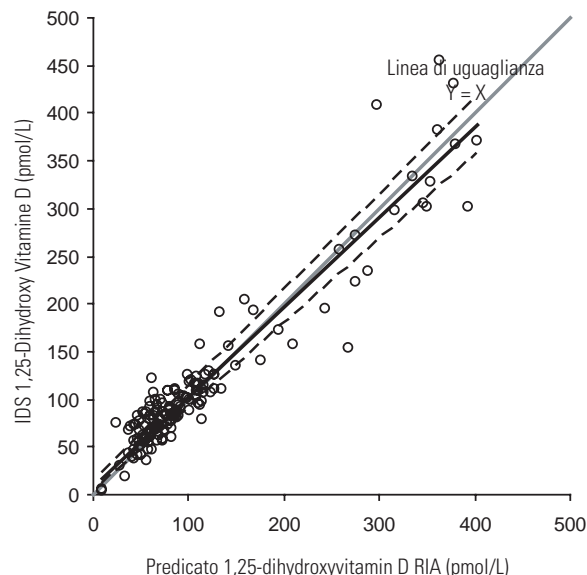
## Caratteristiche del dosaggio

### Accuratezza

Il kit IDS 1,25-Dihydroxy Vitamin D è stato messo a confronto con un dosaggio radioimmunologico noto per la determinazione quantitativa della 1,25-diidrossivitamina D, in base alla linea guida EP-9A2 del NCCLS, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples" (Metodo di confronto e valutazione degli

errori usando campioni di paziente). Una popolazione di 152 campioni, selezionati per rappresentare un vasto spettro di valori di 1,25-diidrossivitamina D [10 - 402 pmol/L], sono stati analizzati con entrambi i metodi. L'analisi della regressione di Passing e Bablok è stata effettuata sui dati comparativi:

IDS = 0,94(x) + 7,2 (IC al 95% della pendenza e dell'intercetta erano rispettivamente 0,89 di 1,01, e 2,1 di 12,7); Coefficiente di correlazione (r) = 0,95



## Sensibilità

La sensibilità, calcolata come la concentrazione corrispondente alla media meno 2 deviazioni standard di 20 replicati del calibratore zero, è risultata di 6 pmol/L (2,5 pg/mL).

## Precisione

La precisione è stata valutata in base alla linea guida EP-5A2 del NCCLS, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods" (Valutazione della precisione dei metodi di misurazione quantitativa). Sono stati dosati tre controlli di siero umano in 17 giorni di dosaggio comprendendo più di 49 giorni di operazione. I dosaggi sono stati effettuati da diversi operatori utilizzando vari lotti di reagenti.

Controllo	n	media (pmol/L)	Intra-dosaggio		Totale	
			DS	CV%	SD	CV%
1	28	19,0	2,0	10,7	3,8	19,7
2	28	53,2	5,6	10,5	9,1	17,1
3	28	152	14,1	9,3	26,7	17,6

## Recupero

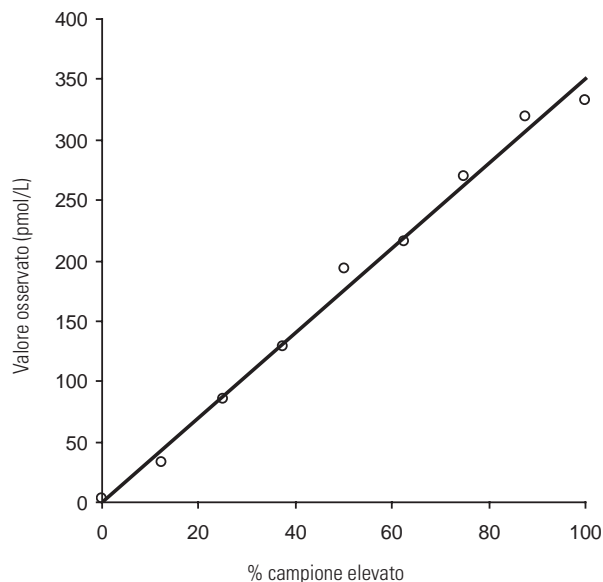
Il recupero è stato valutato aggiungendo ai campioni 1,25D<sub>3</sub> prima dell'estrazione e del dosaggio.

Conc campione pmol/L	125D <sub>3</sub> aggiunta pmol/L	Osservata pmol/L	Recupero pmol/L	Recupero %
62,7	46,5	106,4	43,6	94%
62,7	93,0	140,7	78,0	84%
46,2	54,4	100,6	54,4	100%
46,2	108,8	161,3	115,1	106%
			<b>Media</b>	<b>96%</b>

## Linearità

La linearità è stata valutata sulla base della linea guida EP-6A del NCCLS, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach" (Valutazione della linearità delle procedure di misurazione quantitativa: un approccio statistico). I campioni contenenti varie concentrazioni di 1,25-diidrossivitamina D sono stati dosati in duplicato. Le concentrazioni medie risultanti sono state confrontate con le concentrazioni previste. I campioni sono stati preparati diluendo un campione di paziente alto con un campione di paziente basso prima dell'estrazione e del dosaggio. Il range riferibile è stato determinato a <6-333 pmol/L.

Concentrazione prevista pmol/L	Concentrazione misurata pmol/L	Variazione pmol/L	%
-0,1	2,5	2,6	-
43,8	32,7	-11,1	-25%
87,7	86,0	-1,7	-2%
132	129	-3,0	-2%
175	193	18,0	10%
219	215	-4,0	-2%
263	269	6,0	2%
307	319	12,0	4%
351	333	-18,0	-5%



## Specificità

La specificità del kit è stata valutata con i seguenti analiti al 50% di legame del calibratore zero.

Analita	Reattività crociata
1,25-Diidrossivitamina D <sub>3</sub>	100 %
1,25-Diidrossivitamina D <sub>2</sub>	39 %
24.25-Diidrossivitamina D <sub>3</sub>	0,056 %
25-Idrossivitamina D <sub>3</sub>	0,009 %

## Uso previsto

### *Para uso diagnóstico in vitro*

El kit de IDS 1,25-Dihidroxi Vitamina D es un sistema de ensayo completo dirigido a la purificación de 1,25-dihidroxivitamina D (1,25D) por inmunoeextracción a partir de muestras de suero o plasma humano y cuantificación posterior por enzimoimmunoensayo. Los resultados deben usarse conjuntamente con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar al médico en la valoración del déficit de 1,25D asociado con la enfermedad renal en poblaciones adultas.

## Resumen y explicación <sup>(1)</sup>

La vitamina D es un término colectivo utilizado con frecuencia para denominar a una familia de moléculas estrechamente relacionadas entre sí, obtenidas a partir del 7-deshidrocolesterol natural (pro-vitamina D<sub>3</sub>). La pro-vitamina D<sub>3</sub> experimenta una conversión fotolítica en la piel a la vitamina D<sub>3</sub> "padre" (colecalciferol) con su exposición a la luz solar. Este compuesto es biológicamente inactivo, pero entra en la circulación y se hidroxila en el hígado generándose la 25-hidroxivitamina D activa (25D). Una pequeña proporción de la 25D sufre una hidroxilación posterior en el riñón formándose la hormona altamente calcitrópica 1,25D.

La 1,25D se une en elevada proporción a la Proteína Transportadora de Vitamina D y a la albúmina en la circulación. La 1,25D es uno de los principales reguladores del metabolismo del calcio (y del fosfato), estimulando la absorción intestinal del calcio y aumentando la resorción ósea. Inhibe también la producción de hormona paratiroidea (PTH) tanto por la acción directa sobre las glándulas paratiroides como indirectamente, elevando los niveles de calcio séricos. La producción de 1,25D también se autoestimula por la acción de la hormona paratiroidea (PTH), proporcionando así un eficaz mecanismo de control por retroalimentación.

La hipovitaminosis D se asocia a menudo a un aporte insuficiente en la dieta, generalmente con el vegetarianismo, relacionándose también con una baja exposición a la luz solar (p. ej., ancianos y personas ingresadas en centros) y con la pigmentación de la piel.

La producción de 1,25D parece estar alterada en la insuficiencia renal precoz, aunque esto podría no ser un efecto renal. En la insuficiencia renal en estadio terminal, podría estar alterada la 1 $\alpha$ -hidroxilación, generándose, como consecuencia, niveles bajos de 1,25D.

## Descripción del Método

El kit de IDS 1,25-Dihidroxi Vitamina D es un ensayo completo dirigido a la purificación de 1,25D por inmunoeextracción a partir de muestras de pacientes y posterior cuantificación por EIA. Se delipidan las muestras de los pacientes y se extrae la 1,25D de posibles reactivos cruzados mediante incubación durante 90 minutos con un anticuerpo monoclonal anti 1,25D altamente específico en fase sólida. El gel de inmunoeextracción se lava y la 1,25D purificada se eluye directamente en un tubo de ensayo de vidrio. Los eluatos reconstituidos y los calibradores se incuban durante una noche con un anticuerpo ovino anti 1,25D altamente específico. Una porción de la solución anterior se incuba con agitación durante 90 minutos en pozos de microplaca revestidos con un anticuerpo específico anti-ovino. Luego se añade 1,25D unida a biotina y se agita la placa durante otros 60 minutos antes de la aspiración y el lavado. Se añade avidina marcada con enzima (peroxidasa de rábano) y se une selectivamente a la al complejo de biotina y, después de un adicional paso de lavado, se revela el color usando un sustrato cromógeno (TMB). La absorbancia de las mezclas de la reacción detenida se lee en un lector de placas de microtitulación, siendo la intensidad del color revelada inversamente proporcional a la concentración de 1,25D.

## Advertencias y Precauciones

El kit OCEIA 1,25-dihidroxi vitamina D está diseñado para uso diagnóstico in vitro únicamente, y no para uso interno en seres humanos ni animales. Este producto debe ser utilizado siguiendo rigurosamente las instrucciones incluidas en el prospecto. IDS Limited no se responsabilizará de ninguna pérdida o daño (excepto los requeridos por la ley), independientemente de su causa, que se derive del incumplimiento de las instrucciones proporcionadas.

**ADVERTENCIA:** Este kit contiene material de origen humano y/o animal. Manipule los reactivos del kit como si fueran capaces de transmitir un agente infeccioso. Deben usarse precauciones adecuadas y buenas prácticas de laboratorio en la el almacenamiento, manipulación y eliminación de los reactivos del kit. La eliminación de los reactivos del kit debe realizarse de acuerdo con la normativa local.

## Suero Humano: Controles CTRL

El material de origen humano utilizado en la elaboración de este producto ha sido estudiado con métodos recomendados por la FDA, en cuanto a la presencia de anticuerpos anti VIH (I y II), antígeno de superficie de la hepatitis B y anticuerpos frente a la hepatitis C, con

resultados negativos en todos los casos. Sin embargo, como no existe ningún método que pueda garantizar la ausencia de agentes infecciosos, los reactivos deben manipularse en laboratorios de contención biológica de nivel 2.

### Azida Sódica

Xn. Nocivo: Los calibradores [CAL] y los controles [CTRL] contienen azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) >0,1% (p/p) (<1%).

R22 Nocivo por ingestión.

R52/53 Nocivo para los organismos acuáticos, puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático.

S46 En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.

S36/37 Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

S60 Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.

Algunos de los reactivos incluidos en este kit contienen azida sódica como conservante, que puede reaccionar con las cañerías de plomo, cobre o bronce para formar azidas metálicas altamente explosivas. Al eliminarlos, aclare con abundante cantidad de agua para evitar la acumulación de azidas.

### Reactivo de elución

El reactivo de elución [REAG 2] contiene etanol.

R11 Muy inflamable (punto de inflamación, 13°C).

S7 Mantenga el envase herméticamente cerrado.

S16 Manténgalo alejado de fuentes de ignición. No fume.

### Ácido clorhídrico 0,5M

La solución de parada [HCL] contiene ácido clorhídrico 0,5M.

R36/38 Irritante para los ojos y la piel.

S26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.

S36/37 Usen indumentaria y guantes de protección adecuados.

### Tetrametilbenzidina

El sustrato [TMB] contiene 3,3',5,5'-tetrametilbezina.

R21/22 Nocivo por contacto con la piel y si se igniere.

S36/37 Usen indumentaria y guantes de protección adecuados.

### Preparación de los Reactivos

**Calibradores [CAL]** : Los calibradores [CAL] se suministran en forma liofilizada. Reconstituir inmediatamente antes de usar. Añadir 1 ml de agua destilada o desionizada a cada vial. Tapar el vial y dejar reposar durante 5-10 minutos, invirtiendo varias veces el vial para asegurar una reconstitución completa. NO RECONSTITUIR SOBRE UN AGITADOR GIRATORIO; ya que podría producirse una pérdida de potencia.

**Controles [CTRL]** : Los controles [CTRL] se suministran en forma liofilizada. Reconstituir inmediatamente antes de usar. Añadir 1,2 ml de agua destilada o desionizada a cada vial. Tapar el vial y dejar reposar durante 15-20 minutos, invirtiendo varias veces el vial para asegurar una reconstitución completa.

Si los calibradores [CAL] o los controles [CTRL] van a utilizarse más de una vez, deben congelarse (a -20°C) durante los 15 minutos después de la reconstitución. Cuando se vuelvan a utilizar calibradores [CAL] o controles [CTRL], previamente congelados, descongelar a temperatura ambiente, mezclar bien y utilizar en 15 minutos.

**Solución de anticuerpos primarios [Ab SOLN]** : El concentrado de anticuerpos primarios [Ab 6x] se suministra como concentrado. Añadir todo el contenido del frasco de Tampón de anticuerpos primarios [Ab BUF], coloque nuevamente el tapón e invertir varias veces para asegurar el mezclado completo.

**Solución de 1,25D biotina [1,25D BIOTIN SOLN]** : El concentrado de 1,25D biotina [1,25D BIOTIN 6x] se suministra liofilizado. Añadir todo el contenido del frasco del tampón 1,25D biotina [1,25D BIOTIN BUF]. Volver a colocar el tapón y dejar reposar durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Invertir varias veces para asegurar la reconstitución completa. Si se va a usar la solución de 1,25D biotina [1,25D BIOTIN SOLN] más de una vez, debe congelarse (-20°C) en las 2 horas siguientes a la reconstitución. Cuando vaya a utilizar la solución congelada de 1,25D biotina [1,25D BIOTIN SOLN] descongelar a temperatura ambiente, mezclar bien y usar en 2 horas.

**Solución de lavado:** Preparar añadiendo el contenido de cada frasco de Concentrado de lavado [WASHBUF 20x] a 950 ml de agua destilada o desionizada. Almacenar de temperatura ambiente.

El resto de los reactivos se suministran listos para usar.

Permitir que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su utilización.

Los reactivos deben mezclarse varias veces por inversión antes de su utilización en el ensayo.

## Vida Media y Almacenamiento de los Reactivos

El kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta, si se almacena de acuerdo con las indicaciones. Almacenar todos los reactivos entre 2-8°C a su recepción.

Los calibradores reconstituidos [CAL], los controles [CTRL] y la solución 1,25D biotina [1,25D BIOTIN] [SOLN] son estables a -20°C durante 8 semanas.

La solución de anticuerpos [Ab] [SOLN] es estable a 2-8°C durante 8 semanas.

Las tiras de placas revestidas de anticuerpos [MICROPLAT] sin usar deben devolverse a la bolsa de aluminio con la bolsa desecante y autosellada. Almacenar entre 2-8°C hasta 8 semanas.

La solución de lavado puede conservarse a temperatura ambiente hasta 8 semanas.

## Indicadores de un posible deterioro de los reactivos del kit

La presencia de partículas anormales en cualquiera de los reactivos del kit.

Una disminución en la unión máxima.

Una unión no específica elevada.

Un desplazamiento en la pendiente de la curva desde su posición normal.

## Recogida y Almacenamiento de las Muestras

El ensayo debería realizarse utilizando muestras de suero o plasma (con EDTA o heparina). Las muestras deberían separarse lo antes posible tras su extracción. Para periodos prolongados de almacenamiento, congelar a -20°C. Evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación.

## Procedimiento

### Materiales que se suministran

#### 1. [CAL] [0] - [6] - Calibradores

([REF] AC-6201A - AC-6201G):

Tampón de BSA liofilizado que contiene 1,25-dihidroxitamina D y azida sódica al <0,4% (0,01% reconstituido). El valor exacto para cada calibrador se indica en la etiqueta de cada vial. 1 ml por vial, 7 viales por kit.

#### 2. [Ab] [6x] - Concentrado de Anticuerpo primario

([REF] AC-6202):

Anticuerpo ovino anti-1,25-dihidroxitamina D en solución tampón de BSA-fosfato con azida sódica al 0,09%, 2 ml por vial.

#### 3. [Ab] [BUF] - Tampón de anticuerpo primario

([REF] AC-6202B):

Reactivo patentado que contiene solución tampón

de fosfato con azida sódica al 0,09%. 10 ml por vial.

#### 4. Sac-Wel™ [SHEEP] - Placa revestida con anticuerpos antiovinos

([REF] AC-SH02W):

Microplaca con IgG antiovinos unidos a la superficie interna de los pozos de poliestireno, tiras de 12 x 8 pozos en una bolsa de aluminio con desecante.

#### 5. [1,25D BIOTIN] [6x] - Concentrado de 1,25D Biotina

([REF] AC-6203):

Tampón liofilizado con 1,25-dihidroxitamina D marcada con biotina y estabilizadores patentados, 2 ml por vial.

#### 6. [1,25D BIOTIN] [BUF] - Solución Tampón de 1,25D biotina

([REF] AC-6203B):

Solución salina tamponada con fosfato con azida sódica al 0,09%, 12 ml por vial.

#### 7. [ENZYMCONJ] - Conjugado de enzima

([REF] AC-6204):

Solución salina tamponada con fosfato que contiene avidina unida a peroxidasa de rábano, proteínas, estabilizadores de enzimas y conservante, 24 ml por frasco.

#### 8. [CTRL] [1] - [CTRL] [2] - Controles

([REF] AC-6205A - AC-6205B):

Suero humano liofilizado que contiene 1,25-dihidroxitamina D y azida sódica al <1% (0,09% reconstituido), 1,2 ml por vial, 2 viales por kit.

#### 9. [SORB] - Inmunocápsulas

([REF] AC-6206):

Cápsulas con anticuerpo monoclonal frente a 1,25-dihidroxitamina D unidas a partículas de la fase sólida en suspensión con inhibidor de la proteína transportadora de vitamina D, 80 inmunocápsulas por kit.

#### 10. [REAG] [1] - Reactivo de delipidación

([REF] AC-6207):

Solución de sulfato de dextrano y cloruro magnésico, 2,5 ml por vial.

#### 11. [REAG] [2] - Reactivo de elución

([REF] AC-6208):

Etanol, 44 ml por vial.

#### 12. [BUF] - Tampón de ensayo

([REF] AC-6209):

Solución tampón de BSA con azida sódica al 0,09%, 12 ml por vial.



**13. [TMB] - TMB Sustrato**

([REF] AC-TMB):

Formulación acuosa patentada de tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno, 24 ml por frasco.

**14. [HCL] - Solución de parada**

([REF] AC-STOP):

Ácido clorhídrico 0,5M, 14 ml por vial.

**15. [WASHBUF 20x] - Concentrado de lavado**

([REF] AC-WASHL):

Solución salina tamponada con fosfato y que contiene Tween, 50 ml por vial.

**16. Sellador de la placa adhesiva**

8 por kit.

**17. Documentación**

Prospecto e informe de CC.

**Materiales necesarios que no se suministran**

1. Tubos de vidrio de borosilicato de 12 x 75 mm, desechables.
2. Tubos de poliestireno desechables, de 12 x 75 mm (opcionales).
3. Dispositivos de pipeteado de precisión para administrar 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 500 µl y 1 ml.
4. Dispositivos de pipeteado de repetición para administrar 150µl y 500 µl, p. ej., Multipipeta Eppendorf 4780 o similar.
5. Pipetas multicanal de precisión para administrar 100 µl y 200 µl.
6. Agitador vortex.
7. Mezclador de extremo sobre extremo o de rodillo.
8. Bloque de calentamiento o baño maría a 40°C.
9. Suministro de nitrógeno y colector.
10. Centrífuga capaz de conseguir 2000g.
11. Agitador orbital.
12. Lavador automático de microplacas (opcional).
13. Lector de microplacas fotométrico y equipo de análisis de datos.
14. Agua destilada o desionizada.

**Preparación de las Muestras**

1. Preparar los tubos de ensayo de vidrio o de plástico, uno por cada Control [CTRL] y muestra desconocida. NO REALIZAR LA DELIPIDACION DE LOS CALIBRADORES [CAL].
2. Añadir **500 µl** de cada control [CTRL] o muestra a los tubos debidamente marcados.
3. Añadir **50 µl** de Reactivo de Delipidación [REAG 1] a cada tubo. Agitar todos los tubos con vórtex.

4. Centrifugar a 2000 g durante 15 minutos.

**Advertencia:** Cuando se manipulen muestras delipidadas, evitar que se produzcan turbulencias en el precipitado. Si llegase a resuspenderse el precipitado o si la muestra no estuviese clara, debe repetirse la centrifugación.

**Método Alternativo para la Preparación de las Muestras:**

Recomendado para muestras donde se dispone de un volumen inferior a 500 µl.

1. Rotular tubos de plástico de fondo cónico o tubos de microcentrífuga, uno para cada muestra.
2. Añadir la muestra (p. ej., 250 µl) a los tubos correspondientes.
3. Añadir un volumen de Reactivo de Delipidación [REAG 1] de 0,1x en relación con el volumen de la muestra (p. ej., 25 µl) a los tubos correspondientes. Agitar todos los tubos con vórtex.
4. Centrifugar todos los tubos a 2000g durante 15 minutos, o a 10000g durante 10 minutos (microcentrífuga).

**Protocolo para la Inmunoextracción**

1. Preparar Inmuncápsulas [SORB] marcadas, dos para cada Control [CTRL] y muestra. NO INMUNOEXTRAER LOS CALIBRADORES [CAL]. Advertencia: Si una inmuncápsula [SORB] presenta signos de haberse derramado o de presentar un volumen incorrecto- no debe utilizarse.
2. Agitar con vórtex las inmuncápsulas [SORB] y permitir que se deposite la fase sólida. Colocar las inmuncápsulas [SORB] hacia arriba en una gradilla de espuma y dejar reposar durante 3-5 minutos.
3. Quitar el tapón de rosca de las inmuncápsulas [SORB]. Añadir **100 µl** de la muestra delipidada o del control a las inmuncápsulas [SORB] por duplicado. Colocar nuevamente el tapón y asegurarse de que está bien cerrado.
4. Colocar las inmuncápsulas [SORB] en una gradilla de espuma y hacer rotar extremo sobre extremo a 5-20 revoluciones por minuto durante 90 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Las gradillas de espuma pueden engancharse fácilmente a los agitadores para tubos de muestras de sangre, encajándose a través de las ranuras. Otra alternativa es incluir la gradilla de espuma en una cubeta de plástico del laboratorio y situar en un agitador para frascos.
5. Situar las inmuncápsulas [SORB] hacia arriba en una gradilla de espuma y dejar reposar durante 3-5 minutos para permitir que el gel

se deposite. Golpear suavemente las cápsulas para desprender el gel que haya podido quedar adherido al tapón de rosca. Dejar que el gel se deposite durante 1-2 minutos más. Quitar el tapón de rosca y romper (no desenroscar) la parte inferior de las inmunocápsulas [SORB] y traspasar cada inmunocápsula [SORB] a un tubo de plástico (o de vidrio). Para que tenga lugar la extracción de la muestra, centrifugar a baja velocidad (500 - 1.000 g) durante aproximadamente 1 minuto.

6. Añadir **500 µl** de agua desionizada a cada Inmuno-cápsula [SORB]. Añadir cuidadosamente para evitar que la fase sólida salpique fuera de la inmunocápsula [SORB]. Centrifugar a baja velocidad (500-1000 g) durante 1 minuto aproximadamente para lavar el gel de inmunoextracción.
7. Repetir el paso anterior de lavado otras dos veces.
8. Rotular un tubo de vidrio de borosilicato por cada inmunocápsula [SORB] y transferir las inmunocápsulas [SORB] a los tubos de vidrio.
9. Añadir **150 µl** del Reactivo de Elución [REAG 2] a todas las inmunocápsulas [SORB]. Permitir que el reactivo empape la fase sólida durante 1-2 minutos. Centrifugar a baja velocidad (500 - 1.000 g) durante 1 minuto aproximadamente para recoger el eluato.
10. Repetir el paso anterior otras dos veces. El volumen total de elución recogido debe estar alrededor de **450 µl** para cada muestra.
11. Desechar las inmunocápsulas [SORB] y colocar los tubos en un termobloque o baño maría a 40°C. Evaporar los eluatos utilizando un flujo suave de nitrógeno. La evaporación puede tomar de 20 - 30 minutos. Comprobar que no queda líquido en los tubos.
12. Añadir **100 µl** del Tampón de Ensayo [BUF] a cada tubo y agitar con vórtex para disolver los residuos.

**Las muestras inmunopurificadas ya están listas para usar.**

### Procedimiento del Ensayo

Reconstituir los calibradores [CAL] inmediatamente antes del ensayo como se describe en el apartado Preparación de los reactivos, o descongelar los reactivos reconstituidos previamente. Permitir que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de su utilización. Mezclar todos los reactivos suavemente antes de su utilización en el ensayo. Preparar tubos de vidrio de borosilicato marcados, dos para cada Calibrador [CAL].

1. Añadir **100 µl** de cada calibrador [CAL] a los tubos

correspondientes previamente rotulados. Hacer el transvase de los calibradores con la pipeta directamente a la base del tubo de ensayo.

2. Colocar los tubos con el extracto de las muestras obtenidas en el paso 12 de la sección anterior.
3. Añadir **100 µl** de Solución de anticuerpos primarios [Ab SOLN] a todos los tubos.
4. Agitar con vórtex todos los tubos suavemente sin formar espuma. Incubar a 2-8°C durante una noche (16-20 h).
5. Añadir **150 µl** de solución del paso 4, a los pozos adecuados de la placa recubierta de anticuerpos [MICROPLAT]. Dejar los primeros dos pozos vacíos como blancos de sustrato. Cubrir la placa con un sellador de placas adhesivo e incubar la placa en un agitador orbitario (500-750 rpm) a 18-25°C durante 90 minutos.
6. Añadir **100 µl** de solución de 1,25D biotina [1,25D BIOTIN SOLN] a todos los pozos excepto los blancos de sustrato. Cubrir la placa con un sellador de placa adhesivo e incubar la placa en un agitador orbitario (500-750 rpm) a 18-25°C durante 60 minutos.
7. Lavar todos los pozos tres veces con solución de lavado:
  - a. Lavador de placas automático: Ajustar el lavador de placas para que dispense al menos 300 µl de solución de lavado por pozo. Llenar y aspirar durante 3 ciclos.
  - b. Lavado manual: decantar el contenido de los pozos invirtiendo bruscamente. Dispensar 250 µl de la solución de lavado a todos los pozos. Decantar y repetir dos veces.Colocar la placa invertida firmemente contra tejido absorbente para eliminar el exceso de solución de lavado antes de proceder al siguiente paso.
8. Añadir **200 µl** de conjugado enzimático [ENZYMCONJ] a todos los pozos excepto para los blancos de sustrato usando una pipeta multicanal. Cubrir la placa con un sellador de placa adhesivo e incubar la placa a 18-25°C durante 30 minutos.
9. Repetir el paso de lavado 7.
10. Añadir **200 µl** de sustrato TMB [TMB] a todos los pocillos, incluidos los blancos de sustrato usando una pipeta multicanal. Cubrir la placa con un sellador de placa adhesivo e incubar la placa a 18-25°C durante 30 minutos.

*Nota: El sustrato TMB se contamina con facilidad. Sacar de la botella únicamente la cantidad requerida para el ensayo. Desechar el sustrato inutilizado TMB. No devolverlo al frasco.*
11. Añadir **100 µl** de solución de parada [HCL] a todos los pocillos usando una pipeta multicanal.

12. Medir la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (referencia, 650 nm) usando un lector de microplacas dentro de los 30 minutos siguientes a la adición de la solución de parada.

### Control de Calidad

Se recomienda la utilización rutinaria de muestras control a diferentes concentraciones del parámetro a analizar para asegurar la validez de los resultados entre un día y otro. Se facilitan dos controles del kit. Los controles deben evaluarse como desconocidos. Debe tenerse en cuenta durante todo el ensayo la carta de valores para los controles de calidad.

### Cálculo de los Resultados

Calcular el porcentaje de unión (% B/B0) de cada uno de los calibradores, controles y muestra desconocida, como se indica a continuación:

$$B/B_0\% = \frac{(\text{abs. promedio} - \text{abs. promedio blanco sustrato}) \times 100}{(\text{abs promedio para cal. '0' - abs. promedio del blanco sustrato})}$$

Dibujar una curva de calibración en papel semilogarítmico, situando en ordenadas el % B/B0 frente a sus concentraciones respectivas de 1,25-dihidroxitamina D en abcisas. Calcular el B/B0% (% B/B0) para cada una de las muestras desconocidas y extrapolar sus concentraciones respectivas en pmol/l a partir de la curva. Pueden utilizarse técnicas alternativas de reducción de datos, como los programas de reducción automatizada de los datos, pero los usuarios deberían confirmar que la curva seleccionada es la adecuada y que proporciona resultados aceptables. Se recomienda la utilización de una curva de pendiente suave o un ajuste de curva de 4PL. IDS calcula los resultados usando el software de reducción de datos MultiCalc (PerkinElmer) con un ajuste de la curva 4PL que representa la absorbancia neta frente a la concentración logarítmica.

El intervalo comunicable del ensayo es 6 – 500 pmol/L. Cualquier valor que se lea por debajo del calibrador más bajo, 6 pmol/l, es un valor extrapolado y puede comunicarse como “menos de 6 pmol/l”.

Conversión de las Unidades:

$$\begin{array}{l} \text{X pmol/L} \quad \text{Y pg/mL} \\ \text{x 0,42} \Rightarrow \\ \Leftarrow \text{x 2,4} \end{array}$$

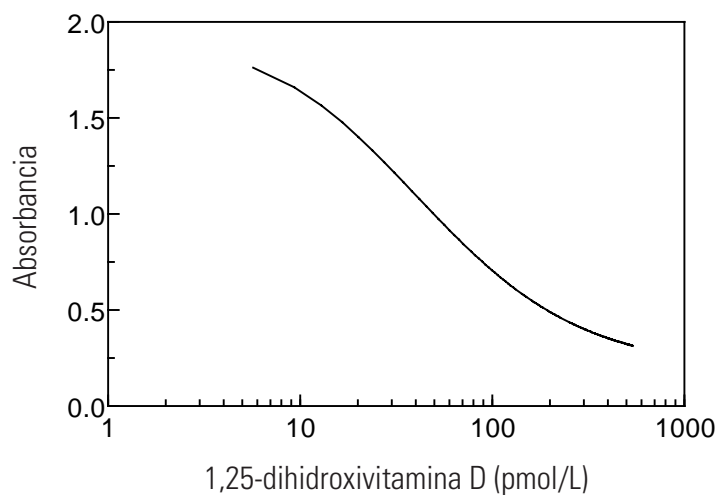
### Ejemplo de Análisis de Datos

Los datos siguientes son únicamente ilustrativos y no deberían utilizarse para el cálculo de los resultados de ninguna muestra.

Pozo	Descripción	Abs.	Abs. promedio.	B/Bo%	Resultados pmol/L
A1, A2	Blanco sustrato	-0,006 0,006	0,000		
B1, B2	Calibrador 0 0 pmol/L	1,956 1,992	1,974	100,0	
C1, C2	Calibrador 1 5,7 pmol/L	1,746 1,776	1,761	89,2	
D1, D2	Calibrador 2 13,4 pmol/L	1,572 1,553	1,563	79,2	
E1, E2	Calibrador 3 34,0 pmol/L	1,132 1,179	1,156	58,5	
F1, F2	Calibrador 4 112 pmol/L	0,682 0,686	0,684	34,7	
G1, G2	Calibrador 5 246 pmol/L	0,419 0,457	0,438	22,2	
H1, H2	Calibrador 6 544 pmol/L	0,315 0,304	0,310	15,7	
A3, A4	Muestra 1	1,109 1,158	1,134	57,4	37,2
B3, B4	Muestra 2	0,532 0,547	0,540	27,4	169

### Curva de calibración típica

La siguiente curva de calibración, debe considerarse únicamente como un ejemplo ilustrativo.



## Limitaciones de Uso

1. El ensayo podría subestimar la cantidad de 1,25-dihidroxitamina D circulante en aquellos pacientes que estén recibiendo tratamiento con vitamina D<sub>2</sub>.
2. Las muestras sospechosas de contener unas concentraciones del parámetro a analizar que excedan a las del calibrador más elevado, deberían ensayarse diluidas.
3. No se han establecido las características de rendimiento de este ensayo en una población pediátrica.
4. Como para cualquier método de diagnóstico, los resultados deberían interpretarse en combinación con el cuadro clínico del paciente y con el resto de información de la que disponga el facultativo.
5. Se han estudiado las siguientes sustancias, de acuerdo con el NCCLS EP7-A, "Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline" (Pruebas de interferencia en Bioquímica clínica; Directriz aprobada), y se ha observado que no interfieren en el ensayo de IDS 1,25-Dihidroxi Vitamina D:
 

Hemoglobina	estudiada hasta 500 mg/dl
Bilirrubina	estudiada hasta 20 mg/dl
Lípidos	estudiada hasta 2803 mg/dl
Urea	estudiada hasta 500 mg/dl

## Valores Esperados

Los siguientes rangos se han determinado utilizando el kit IDS 1,25-Dihidroxi Vitamina D y se proporcionan como una guía únicamente. Cada laboratorio debería establecer los rangos para su población local. El intervalo de referencia del 95% para adultos normales, recogido de 120 adultos aparentemente sanos, se calculó mediante un método no paramétrico siguiendo la directriz C28-A2 del NCCLS, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory" (Cómo definir y determinar intervalos de referencia en el laboratorio clínico).

Adultos normales 39-193 pmol/l (n=120)

Enfermedad renal en estadio terminal \* <6-22 pmol/l (n=24)

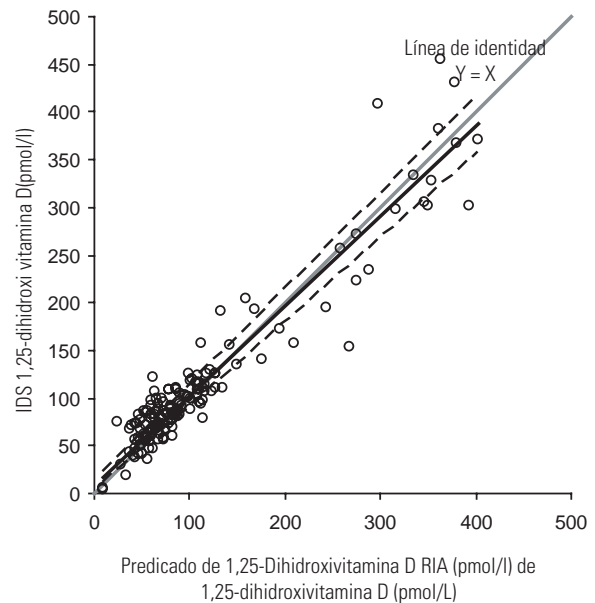
\*Rango observado de valores.

## Características del Ensayo

### Exactitud

Se comparó el kit IDS 1,25-Dihidroxi Vitamina D con un radioinmunoensayo reconocido para la determinación cuantitativa de la 1,25-dihidroxitamina D, siguiendo el documento EP-9A2 del NCCLS, "Comparison and

Bias Estimation Using Patient Samples" (Comparación de métodos y estimación de BIAS usando muestras de pacientes). Se estudió con cada método una población de 152 muestras, seleccionadas para que representen un amplio rango de 1,25-dihidroxitamina D [10 - 402 pmol/l]. Para la comparación de los datos se utilizaron los análisis de regresión Passing & Bablok:  $IDS = 0,94(x) + 7,2$  (el IC del 95% de la pendiente y la coordenada en el origen fueron 0,89 a 1,01 y 2,1 a 12,7, respectivamente); coeficiente de correlación ( $r$ ) = 0,95



## Sensibilidad

La sensibilidad, definida como la concentración correspondiente a la media menos 2 desviaciones estándar de 20 replicas del calibrador cero, es 6 pmol/L (2,5 pg/ml).

## Precisión

La precisión se evaluó de acuerdo con el documento EP-5A2 del NCCLS, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods" (Evaluación del desempeño de la Precisión de los Métodos de Medición Cuantitativos). Se estudiaron tres controles de suero humano durante 17 días de ensayo que abarcaban más de 49 días operativos. Los ensayos fueron realizados por múltiples operadores usando múltiples lotes de reactivos.

Control	n	Promedio (pmol/l)	Intra ensayo		Total	
			SD	CV%	SD	CV%
1	28	19,0	2,0	10,7	3,8	19,7
2	28	53,2	5,6	10,5	9,1	17,1
3	28	152	14,1	9,3	26,7	17,6

## Recuperación

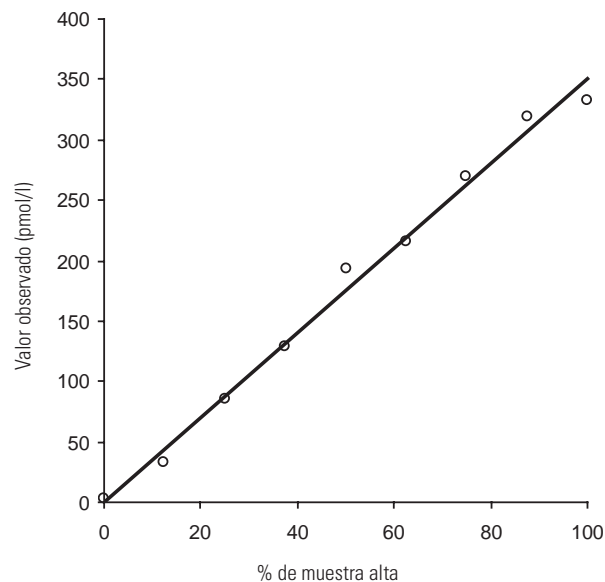
La recuperación se calculó añadiendo 1,25-D<sub>3</sub> a las muestras antes de la extracción y del ensayo.

Conc de la muestra pmol/l	125D <sub>3</sub> añadido pmol/L	Medida pmol/L	Recuperación pmol/L	Recuperación %
62,7	46,5	106,4	43,6	94%
62,7	93,0	140,7	78,0	84%
46,2	54,4	100,6	54,4	100%
46,2	108,8	161,3	115,1	106%
<b>Promedio</b>			<b>96%</b>	

## Linealidad

La linealidad se evaluó de acuerdo con el documento EP-6A del NCCLS, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach" (Evaluación de la Linealidad de los procedimientos de medición cuantitativos: Planteamiento Estadístico). Se estudiaron por duplicado muestras con concentraciones variables de 1,25-dihidroxitamina D. Los promedios de las concentraciones resultantes fueron comparados con las concentraciones predichas. Se prepararon muestras diluyendo una muestra de paciente alta con una muestra de paciente baja antes de la extracción y el ensayo. Se determinó que el intervalo comunicable era de <6-333 pmol/l.

Concentración predicha pmol/l	Concentración medida pmol/l	Variación pmol/L	%
-0,1	2,5	2,6	-
43,8	32,7	-11,1	-25%
87,7	86,0	-1,7	-2%
132	129	-3,0	-2%
175	193	18,0	10%
219	215	-4,0	-2%
263	269	6,0	2%
307	319	12,0	4%
351	333	-18,0	-5%



## Especificidad









La especificidad del kit se ha evaluado con los siguientes parámetros al 50% de unión del calibrador cero.

Analito	Reacción Cruzada
1,25-Dihidroxitamina D <sub>3</sub>	100 %
1,25-Dihidroxitamina D <sub>2</sub>	39 %
24.25-Dihidroxitamina D <sub>3</sub>	0,056 %
25-Hidroxitamina D <sub>3</sub>	0,009 %

## **References / Références / Literatur / Riferimenti bibliografici**

1. Iqbal, SJ, Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites, Ann Clin Biochem, 1994, 31, 109 - 124

Doc: AC-62PL-A  
Issue: 5  
1 October 2008

 <b>EXP</b>	GB <i>Use By</i> DE <i>Verwendbar bis</i> ES <i>Fecha de caducidad</i> IT <i>Utilizzare entro</i> FR <i>Utiliser jusque</i> NL <i>Houdbaar tot</i> DK <i>Holdbar til</i> CZ <i>Použitelné do</i> SK <i>Použitelné do</i> GR <i>Ημερομηνία λήξης</i> PT <i>Prazo de validade</i> HU <i>Felhasználható</i> SE <i>Använd före</i> PL <i>Użyć przed</i>	 <b>LOT</b>	GB <i>Batch code</i> DE <i>Chargenbezeichnung</i> ES <i>Código de lote</i> IT <i>Codice del lotto</i> FR <i>Code du lot</i> NL <i>Lot nummer</i> DK <i>Lotnummer</i> CZ <i>Číslo šarže</i> SK <i>Číslo šarže</i> GR <i>Αριθμός Παρτίδας</i> PT <i>Código do lote</i> HU <i>Sarzzszám</i> SE <i>Lot nummer</i> PL <i>Kod partii</i>
 <b>REF</b>	GB <i>Catalogue number</i> DE <i>Bestellnummer</i> ES <i>Número de catálogo</i> IT <i>Numero di catalogo</i> FR <i>Référence du catalogue</i> NL <i>Catalogus nummer</i> DK <i>Katalognummer</i> CZ <i>Katalogové číslo</i> SK <i>Katalógové číslo</i> GR <i>Αριθμός καταλόγου</i> PT <i>Referência de catálogo</i> HU <i>Katalógusszám</i> SE <i>Katalognummer</i> PL <i>Numer katalogowy</i>		GB <i>Manufacturer</i> DE <i>Hersteller</i> ES <i>Fabricante</i> IT <i>Fabbricante</i> FR <i>Fabricant</i> NL <i>Fabrikant</i> DK <i>Producent</i> CZ <i>Výrobce</i> SK <i>Výrobca</i> GR <i>Κατασκευαστής</i> PT <i>Fabricante</i> HU <i>Gyártó</i> SE <i>Tillverkare</i> PL <i>Producent</i>
	GB <i>Contains sufficient for &lt;n&gt; tests</i> DE <i>Inhalt ausreichend für &lt;n&gt; Prüfungen</i> ES <i>Contenido suficiente para &lt;n&gt; ensayos</i> IT <i>Contenuto sufficiente per "n" saggi</i> FR <i>Contenu suffisant pour "n" tests</i> NL <i>Inhoud voldoende voor "n" testen</i> DK <i>Indeholder tilstrækkeligt til "n" test</i> CZ <i>Lze použít pro &lt;n&gt; testů</i> SK <i>Obsah postačuje na &lt;n&gt; stanovení</i> GR <i>Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις</i> PT <i>Conteúdo suficiente para "n" ensaios</i> HU <i>A doboz tartalma &lt;n&gt; vizsgálat elvégzéséhez elegendő</i> SE <i>Räcker till "n" antal tester</i> PL <i>Wystarczy na wykonanie &lt;n&gt; testów</i>	 <b>IVD</b>	GB <i>In Vitro Diagnostic Medical Device</i> DE <i>In-Vitro-Diagnostikum</i> ES <i>Producto sanitario para diagnóstico in vitro</i> IT <i>Dispositivo medico-diagnostico in vitro</i> FR <i>Dispositif médical de diagnostic in vitro</i> NL <i>Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek</i> DK <i>Medicinsk udstyr til in vitro-diagnostik</i> CZ <i>In Vitro diagnostický zdravotnický prostředek</i> SK <i>Zdravotnicka pomocka in vitro</i> GR <i>Ιn Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν</i> PT <i>Dispositivo médico para diagnóstico in vitro</i> HU <i>In vitro diagnosztikum</i> SE <i>Medicintekniska produkter för in vitro diagnostik</i> PL <i>Wyrób do diagnostyki In Vitro</i>
	GB <i>Temperature limitation</i> DE <i>Temperaturbegrenzung</i> ES <i>Límite de temperatura</i> IT <i>Limiti di temperatura</i> FR <i>Limites de température</i> NL <i>Temperatuurlimiet</i> DK <i>Temperaturbegrænsning</i> CZ <i>Teplotní rozmezí od do</i> SK <i>Teplotné rozmedzie od do</i> GR <i>Περιορισμοί θερμοκρασίας</i> PT <i>Limites de temperatura</i> HU <i>Hőmérséklettartomány</i> SE <i>Temperaturbegränsning</i> PL <i>Przeznaczenie zakresu temperatury</i>		GB <i>Consult Instructions for Use</i> DE <i>Gebrauchsanweisung beachten</i> ES <i>Consulte las instrucciones de uso</i> IT <i>Consultare le istruzioni per l'uso</i> FR <i>Consulter les instructions d'utilisation</i> NL <i>Raadpleeg de gebruiksaanwijzing</i> DK <i>Se brugsanvisning</i> CZ <i>Viz návod k použití</i> SK <i>Vid' návod na použitie</i> GR <i>Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης</i> PT <i>Consulte as instruções de utilização</i> HU <i>Nézze meg a Használati utasítást</i> SE <i>Se handhavandebeskrivningen</i> PL <i>Sprawdź w instrukcji obsługi</i>



Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd).

**UK** Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd), 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD  
Tel: +44 (0) 191 519 0660 • Fax: +44 (0) 191 519 0760 • e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com

**USA** Immunodiagnostic Systems Inc (IDS Inc.), P.O. Box 17063, Fountain Hills, AZ 85269-7063  
Tel: 480-836-7435 • Fax: 480-836-7437 • e-mail: info.us@idsplc.com • www.idsplc.com

**Germany** Immunodiagnostic Systems GmbH (IDS GmbH), Mainzer Landstrasse 49, 60329 Frankfurt am Main  
Tel: +49 (0) 69 3085-5025 • Fax: +49 (0) 69 3085-5125 • e-mail: info.de@idsplc.com • www.idsplc.com

**France** Immunodiagnostic Systems EURL (IDS EURL), 55 rue Sainte Anne, 75002 PARIS  
Tel: +33 (0)1 42 44 12 63 • Fax: +33 (0)1 42 44 40 76 • e-mail: info.fr@idsplc.com • www.idsplc.com

**Scandinavia** Immunodiagnostic Systems Nordic a/s (IDS Nordic a/s), Marielundvej 30, 2. Sal, 2730 Herlev, Denmark  
Tel: +45 44 84 0091 • Fax: +45 44 84 0092 • email: info.nordic@idsplc.com • www.idsplc.com