

## 25-Hydroxy Vitamin D EIA

Enzymeimmunoassay for the quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D and other hydroxylated metabolites in serum or plasma

Technique immuno-enzymatique pour le dosage de la 25-hydroxyvitamine D et d'autres métabolites hydroxylés dans le sérum ou le plasma

Enzymimmunassay zur quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin D und anderer hydroxylierter Metaboliten in Serum oder Plasma

Dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della 25-idrossivitamina D e altri metaboliti idrossilati nel siero o plasma

Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de 25-hidroxivitamina D y otros metabolitos hidroxilados en suero o plasma

English..... 3  
Français..... 9  
Deutsch..... 15  
Italiano..... 21  
Español..... 27

## Intended Use

### *For In Vitro Diagnostic Use*

The IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA kit is an enzymeimmunoassay intended for the quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D (25-OH D) and other hydroxylated metabolites in human serum or plasma. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in the assessment of vitamin D sufficiency in adult populations.

## Summary and Explanation

Vitamin D is a commonly used collective term for a family of closely related seco-steroids. Upon exposure to sunlight, 7-dehydro-cholesterol, located deep in the actively growing layers of the epidermis, undergoes photolytic cleavage of the "B" ring to yield pre-vitamin D<sub>3</sub> which is isomerised to vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol). Vitamin D<sub>3</sub> and vitamin D<sub>2</sub> (ergocalciferol) may also be obtained by dietary supplementation or from a limited number of foods. Vitamin D<sub>2</sub> is metabolised in a similar way to vitamin D<sub>3</sub>.

Vitamin D is stored in adipose tissue and enters the circulation bound to vitamin D binding protein (VDBP) and albumin. In the liver, vitamin D is hydroxylated to give 25-hydroxyvitamin D which also circulates as a complex with VDBP. A small proportion of the 25-OH D is further hydroxylated in the kidney, under direct regulation by parathyroid hormone and ionised calcium levels, to form the biologically-active calcitropic hormone 1,25-dihydroxyvitamin D. Further hydroxylation and metabolism of vitamin D produces compounds that are water soluble and readily excreted.

Hepatic vitamin D 25-hydroxylase activity is not tightly regulated, and changes in cutaneous production of vitamin D<sub>3</sub>, or ingestion of vitamin D (D<sub>3</sub> or D<sub>2</sub>), will result in changes in circulating levels of 25-OH D<sup>(1)</sup>.

Serum concentration of 25-OH D is considered to be the most reliable measure of overall vitamin D status and thus can be used to determine whether a patient is vitamin D sufficient<sup>(2)</sup>. Assessment of vitamin D status may be required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients.

## Method Description

The IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA kit is an enzymeimmunoassay for the quantitation of 25-OH D and other hydroxylated metabolites in serum or

plasma. Calibrators, controls and samples are diluted with biotin labelled 25-OH D. The diluted samples are incubated in microtitre wells which are coated with a highly specific sheep 25-OH D antibody for 2 hours at room temperature 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 25-OH D.

## Warnings and Precautions

The IDS 25-Hydroxy 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:** Calibrators [CAL] and 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.

### 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 [SUBS] 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] and Controls [CTRL]:** Calibrators [CAL] and Controls [CTRL] are supplied lyophilised. Reconstitute with 1 mL of distilled or deionised water, replace stopper and stand for 10-15 minutes at room temperature. Invert several times to ensure complete reconstitution. Store at 2-8°C.

**25-D Biotin Solution [25-D BIOTIN] [SOLN]:** 25-D Biotin Concentrate [25-D BIOTIN] [50x] is supplied lyophilised. Add 3 mL of Buffer [BUF] to the bottle of lyophilised 25-D Biotin Concentrate [25-D BIOTIN] [50x] (blue colour). Replace the stopper and stand for 10-15 minutes at room temperature. Invert several times to ensure complete reconstitution. Add the reconstituted 25-D Biotin Concentrate [25-D BIOTIN] [50x] (3 mL) back into the bottle containing the remaining Buffer [BUF]. Mix well by inversion. The 25-D Biotin Solution (50 mL) is green in colour. Mark the bottle "25-D Biotin Solution". Store at 2-8°C.

**Wash Solution [WASHBUF] [SOLN]:** Add the contents of each bottle of Wash Concentrate [WASHBUF] [20x] to 950 mL of distilled or de-ionised water and mix. 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 before 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 25-D Biotin Solution [25-D BIOTIN] [SOLN] can be stored at 2-8°C for up to 8 weeks.

Unused Antibody Coated Plate [MICROPLAT] strips must be returned to the foil pouch with the desiccant sachet. Fold over the end of the foil pouch and seal in one of the plastic selfseal bags provided. Store at 2-8°C for up to 8 weeks.

Wash Solution [WASHBUF] [SOLN] 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 absorbance of the zero calibrator.

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-5701A - AC-5701G):**

Lyophilised buffered human serum containing 25-hydroxyvitamin D and <1% sodium azide (0.09% reconstituted). The exact value of each Calibrator is printed on the bottle label, 1 mL per bottle, 7 bottles per kit.

2. **MICROPLAT - Antibody Coated Plate**

**(REF AC-5702W):**

Microplate with 25-hydroxyvitamin D sheep polyclonal antibody linked to the inner surface of the polystyrene wells, 12 x 8 well strips in a foil pouch with desiccant.

3. **25-D BIOTIN 50x - 25-D Biotin Concentrate**  
**(REF AC-5703):**

Lyophilised buffer containing 25-hydroxyvitamin D labelled with biotin, and proprietary stabilisers, 1 mL per bottle. 1 (F1) or 2 (F2) bottles per kit.

4. **BUF - Buffer**

**(REF AC-5703B):**

Proprietary reagent for dissociating 25-hydroxyvitamin D from binding proteins, 50 mL per bottle. 1 (F1) or 2 (F2) bottles per kit.

5. **ENZYMCONJ - Enzyme Conjugate**

**(REF AC-5704):**

Phosphate buffered saline containing avidin linked to horseradish peroxidase, protein, enzyme stabilisers and preservative. 22 mL per bottle. 1 (F1) or 2 (F2) bottles per kit.

6. **CTRL 1 - 2 – Controls**

**(REF AC-5705A - AC-5705B):**

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

7. **SUBS - TMB Substrate**

**(REF AC-SUBS):**

A proprietary aqueous formulation of tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide, 28 mL per bottle. 1 (F1) or 2 (F2) bottles per kit.

8. **HCL - Stop Solution**

**(REF AC-STOP):**

0.5M Hydrochloric Acid, 13 mL per bottle. 1 (F1) or 2 (F2) bottles per kit.

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

**(REF AC-WASHL):**

Phosphate buffered saline containing Tween, 50 mL per bottle.

10. **Adhesive Plate Sealer**

8 per kit.

11. **Documentation**

Package Insert and QC report.

### Materials Required but not Provided

- Disposable 12 x 75 mm borosilicate glass or polypropylene tubes.  
*Note: polystyrene tubes are not suitable. Do not reuse tubes.*
- Precision pipetting devices to deliver 25 µL and 200 µL.
- Repeating pipettes to deliver 1 mL, e.g. Eppendorf Multipipette 4780, or similar.
- Precision multi-channel pipettes to deliver 100 µL and 200 µL.
- Vortex mixer.
- Automatic microplate washer (optional).
- Photometric microplate reader and data analysis equipment.

## Assay Procedure

Reconstitute or prepare reagents as described in "Preparation of Reagents".

1. Prepare labelled borosilicate glass or polypropylene tubes, one for each Calibrator [CAL], Control [CTRL] and sample [SPE].
2. Add **25 µL** of each Calibrator [CAL], Control [CTRL] or sample to the appropriately labelled tubes.
3. Add **1 mL** of 25-D Biotin Solution [25-D BIOTIN] [SOLN] to all tubes. Vortex thoroughly for 10 seconds.
4. Add **200 µL** of each diluted Calibrator, Control or sample to the appropriate wells of the Antibody Coated Plate [MICROPLAT] in duplicate. Cover the plate with an adhesive plate sealer. Incubate at 18-25°C for 2 hours.
5. Wash all wells three times with Wash Solution [WASHBUF] [SOLN].
  - a) Automatic plate wash: Set plate washer to dispense at least 300 µL of Wash Solution [WASHBUF] [SOLN] 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 [WASHBUF] [SOLN] to all wells. Decant and repeat twice.Tap the inverted plate firmly on absorbent tissue to remove excess Wash Solution [WASHBUF] [SOLN] before proceeding to the next step.
6. Add **200 µL** of Enzyme Conjugate [ENZYMCONJ] to all wells using a multichannel pipette. Cover the plate with an adhesive plate sealer. Incubate at 18-25°C for 30 minutes.
7. Repeat wash step 5.
8. Add **200 µL** of TMB Substrate [SUBS] to all wells using a multichannel pipette. Cover the plate with an adhesive plate sealer. Incubate 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.*
9. Add **100 µL** of Stop Solution [HCL] to all wells using a multichannel pipette.
10. Measure the absorbance of each well at 450 nm (reference 650 nm) using a microplate reader within 30 minutes of adding the Stop Solution.

## Calibration

25-OH D Calibrators are standardised using U.V. quantification.

## 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:

$$B/Bo\% = \frac{\text{(mean absorbance)}}{\text{(mean absorbance for '0' calibrator)}} \times 100$$

Prepare a calibration curve on semi-log graph paper by plotting B/Bo% on the ordinate against concentration of 25-hydroxyvitamin D on the abscissa. Calculate B/Bo% for each unknown sample and read values off the curve in nmol/L (nM).

Alternative data reduction techniques may be employed but users should confirm that the selected curve fit is appropriate and gives acceptable results. Smoothed spline or 4PL curve fits are recommended.

Conversion of Units:

$$\begin{array}{ccc} & \times 0.40 \Rightarrow & \\ X \text{ nmol/L} & & Y \text{ ng/mL} \\ & \Leftarrow \times 2.5 & \end{array}$$

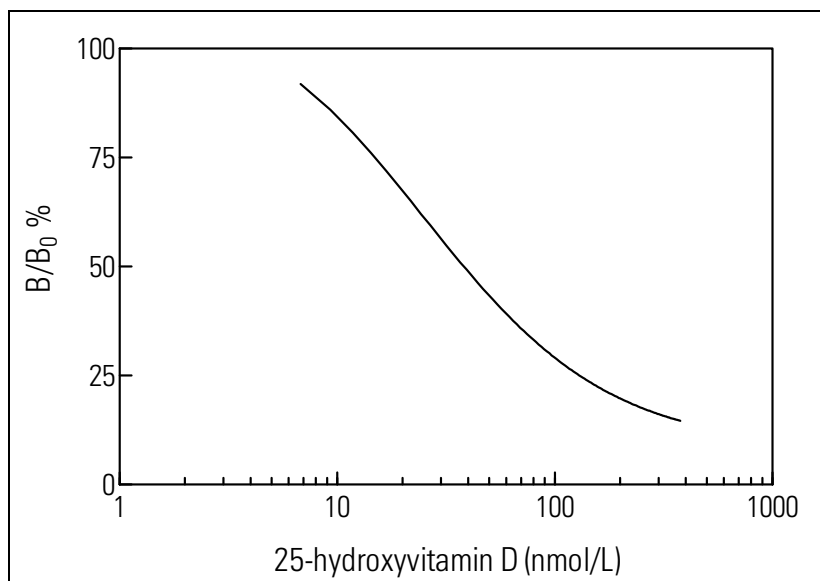
### Sample Assay Data

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 (nmol/L)
A1, A2	Calibrator 0 0 nmol/L	2.476 2.530	2.503		
B1, B2	Calibrator 1 6.8 nmol/L	2.313 2.288	2.301	91.9	
C1, C2	Calibrator 2 14 nmol/L	1.912 1.908	1.910	76.3	
D1, D2	Calibrator 3 27 nmol/L	1.495 1.499	1.497	59.8	
E1, E2	Calibrator 4 67 nmol/L	0.919 0.905	0.912	36.4	
F1, F2	Calibrator 5 179 nmol/L	0.521 0.522	0.522	20.8	
G1, G2	Calibrator 6 380 nmol/L	0.372 0.368	0.370	14.8	
H1, H2	Sample 1	1.237 1.257	1.247	49.8	39
A3, A4	Sample 2	0.951 0.969	0.960	38.4	62
B3, B4	Sample 3	0.591 0.612	0.602	24.0	138

### Typical Calibration Curve

This sample calibration curve is for illustration only.



## Limitations of Use

1. Samples suspected of containing analyte concentrations in excess of the highest calibrator should be assayed in dilution.
2. 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.
3. The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
4. In rare cases, interference due to extremely high titres of antibodies to avidin can occur.
5. The following substances have been tested and found not to interfere in the IDS 25-Hydroxy Vitamin D assay:

Haemoglobin	tested up to 1470 mg/dL
Bilirubin	tested up to 513 µmol/L
Lipid	tested up to 5.6 mmol/L triglyceride

## Expected Values

The following range has been determined using the IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA kit and is provided for guidance only. Each laboratory should determine ranges for their local population.

Normal adults 47.7 - 144 nmol/L (n = 36)

## Performance Data

### Accuracy

The IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA kit was compared against a recognised radioimmunoassay for the quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D and other hydroxylated metabolites. A population of 180 samples, selected to represent a wide range of 25-hydroxyvitamin D [9.3 - 151.2 nmol/L], were assayed by each method. Least squares regression analysis was performed on the comparative data:  $IDS = 1.01(x) + 0.7$ ; correlation coefficient ( $r$ ) = 0.91

### Sensitivity

The sensitivity, defined as the concentration corresponding to the mean minus 2 standard deviations of 10 replicates of the zero calibrator, is 5 nmol/L.

## Precision

Intra assay mean (nmol/L)	n=10 % CV	Inter assay mean (nmol/L)	n=11 % CV
39.0	5.3	40.3	4.6
67.1	5.6	72.0	6.4
165	6.7	132	8.7

## Recovery

Recovery was assessed by adding 25-OH D to samples prior to assay.

Sample	Measured (nmol/L)	Expected (nmol/L)	Recovery %
A	122	126	97
A	95.6	98.4	97
B	147	141	104
B	123	118	105
		<b>Mean</b>	<b>101</b>

## Linearity

Linearity was assessed by diluting samples with buffer (PBS containing 9%BSA) prior to assay.

Sample	Measured (nmol/L)	Expected (nmol/L)	% M/Exp
A	83.9		
A/2	41.0	42.0	98
A/4	20.8	21.0	99
A/8	13.1	10.5	125
B	83.9		
B/2	43.5	42.0	104
B/4	23.1	21.0	110
B/8	10.7	10.5	102
C	104		
C/2	45.9	52.0	88
C/4	22.5	26.0	87
C/8	14.1	13.0	108
		<b>Mean</b>	<b>102</b>

## Specificity

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

Analyte	Cross-Reactivity
25-Hydroxyvitamin D <sub>3</sub>	100%
25-Hydroxyvitamin D <sub>2</sub>	75%
24,25-Dihydroxyvitamin D <sub>3</sub>	≥100%
Cholecalciferol (D <sub>3</sub> )	<0.01%
Ergocalciferol (D <sub>2</sub> )	<0.30%



## Utilisation

### *Pour usage diagnostique in vitro*

La trousse 25-Hydroxy Vitamin D EIA d'IDS est une technique immuno-enzymatique destinée au dosage de la 25-hydroxyvitamine D (25-OH D) et d'autres métabolites hydroxylés présents dans le sérum ou le plasma humain. Les résultats des dosages doivent être utilisés en conjonction avec d'autres données cliniques et de laboratoire pour aider le médecin à l'évaluation de la suffisance en vitamine D chez l'adulte.

## Résumé et explication

La vitamine D est un terme utilisé communément pour désigner une famille de séco-stéroïdes apparentés. A la suite de l'exposition au soleil, le 7-dihydrocholestérol, localisé au fond des couches de l'épiderme à croissance active, subit un clivage protéolytique de l'anneau « B » résultant dans la libération de pré-vitamine D<sub>3</sub> qui est ensuite transformée par isomérisation en vitamine D<sub>3</sub> (cholécalférol). La vitamine D<sub>3</sub> et la vitamine D<sub>2</sub> (ergocalciférol) peuvent aussi être obtenues par apport diététique ou par un nombre limité de produits alimentaires. La vitamine D<sub>2</sub> est métabolisée de la même façon que la vitamine D<sub>3</sub>.

La vitamine D est stockée dans le tissu adipeux et libérée dans la circulation liée à une protéine porteuse, la VDBP ou *Vitamin D Binding Protein*, et à l'albumine. Dans le foie, la vitamine D est hydroxylée pour donner la 25-hydroxyvitamine D, qui circule aussi sous forme de complexe avec la VDBP. Une petite partie de la 25-OH D est hydroxylée ultérieurement dans les reins, un processus directement régulé par l'hormone parathyroïde et le niveau de calcium ionisé, pour former l'hormone calcitrope biologiquement active 1,25-dihydroxyvitamine D. Les phases suivantes d'hydroxylation et de métabolisation de la vitamine D produisent des composés hydrosolubles et aisément excrétés.

L'activité hépatique de la 25-hydroxylase de la vitamine D n'est pas précisément régulée et des variations dans la production cutanée de vitamine D<sub>3</sub> ou l'ingestion de vitamine D (D<sub>3</sub> ou D<sub>2</sub>) entraînent des variations du taux de 25-OH D dans la circulation<sup>(1)</sup>.

On considère que la mesure de la concentration sérique en 25-OH D est la méthode la plus fiable afin de mesurer le taux de vitamine D et peut donc être utilisée pour déterminer si un patient souffre ou non d'une insuffisance en vitamine D<sup>(2)</sup>. L'évaluation du taux de vitamine D peut être requise pour

déterminer la cause d'une concentration en calcium sérique anormale chez les patients.

## Description de la méthode

La trousse 25-Hydroxy Vitamin D EIA d'IDS est une technique immuno-enzymatique pour le dosage de la 25-OH D et d'autres métabolites hydroxylés présents dans le sérum ou le plasma. Les standards, contrôles et échantillons sont dilués avec de la 25-OH D marquée avec de la biotine. Les échantillons dilués sont incubés dans des puits de microtitrage recouverts d'un anticorps de mouton anti-25-OH D hautement spécifique, pendant 2 heures à température ambiante, avant aspiration et lavage. De l'avidine marquée par une enzyme (peroxydase de raifort) est ajoutée et se fixe de façon sélective au complexe de biotine et, après une étape supplémentaire de lavage, une réaction de coloration est obtenue en ajoutant un substrat chromogène (TMB). Après arrêt de la réaction, la densité optique des mélanges est mesurée par un lecteur de plaques de microtitrage. L'intensité de la coloration est inversement proportionnelle à la concentration de la 25-OH D.

## Mises en garde et précautions

La trousse 25-Hydroxy Vitamin D EIA d'IDS est prévu uniquement pour l'usage diagnostique *in vitro* et n'est pas pour l'usage interne chez les humains ou les animaux. Ce produit doit être employé strictement selon les instructions présentées dans la notice. IDS Limited ne pourra être tenue responsable d'aucune perte ou dommage (excepté selon les exigences du statut) quelle qu'en soit la cause, provenant du manque de conformité aux instructions fournies.

**PRECAUTION : Cette trousse contient des matériaux d'origine humaine et/ou animale. Manipuler les réactifs comme si ils pouvaient de transmettre un agent infectieux.**

Des précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées dans le stockage, la manipulation et la disposition des réactifs de trousse. Il faut se débarrasser des réactifs inutilisés en suivant les recommandations des autorités compétentes locales et la réglementation en vigueur.

**Sérum humain :** Standards [CAL] et contrôles [CTRL]

Le sérum humain utilisé pour la fabrication des composantes de cette trousse a été analysé selon les recommandations du FDA et s'est avéré négatif en anticorps anti-VIH 1/2, en Ag HBs, et en anticorps anti-VHC. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme

étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler en accord avec les règles de Biosécurité de groupe de risque 2.

### Azide de sodium

Xn. Nocif: Les Standards [CAL] et les Contrôles [CTRL] contiennent l'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) >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 contenus dans cette trousse renferment de l'azide de sodium. Ce sel peut réagir avec les installations sanitaires en plomb ou cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide.

### Acide chlorhydrique 0,5 M

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

R36/38 Irritant pour les yeux et la peau.

S26 En cas de contact avec les yeux, immédiatement rincer à grande eau et contacter un médecin.

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

### Tétraméthylbenzidine

Le substrat TMB [SUBS] contient de la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine.

R21/22 Nocif par contact avec la peau et par ingestion.

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

### Préparation des réactifs

**Standards [CAL] et contrôles [CTRL]:** Les standards [CAL] et les contrôles [CTRL] sont fournis lyophilisés. Reconstituer avec 1 ml d'eau distillée ou désionisée, reboucher les flacons et laisser reposer pendant 10 à 15 minutes à température ambiante. Retourner plusieurs fois les flacons pour que leur contenu soit complètement reconstitué. Conserver entre 2 et 8 °C.

**Solution de 25-D biotine [25-D BIOTIN] [SOLN]:** Le concentré de 25-D biotine [25-D BIOTIN] [50x] est fourni lyophilisé. Ajouter 3 ml de tampon [BUF] dans le flacon de concentré lyophilisé de 25-D biotine [25-D BIOTIN] [50x] (bleu). Reboucher le flacon et le laisser reposer pendant 10 à 15 minutes à température ambiante. Retourner plusieurs fois le flacon pour que le contenu soit complètement reconstitué. Ajouter le concentré reconstitué de 25-D biotine [25-D BIOTIN] [50x] (3 ml) dans le flacon contenant le reste du tampon [BUF]. Bien mélanger en retournant le flacon. La solution de 25-D biotine (50 ml) est verte. Marquer « Solution de 25-D biotine » sur le flacon. Conserver entre 2 et 8 °C.

**Solution de lavage [WASHBUF] [SOLN]:** Ajouter le contenu de chaque flacon de solution concentrée de lavage [WASHBUF] [20x] à 950 ml d'eau distillée ou désionisée et homogénéiser. Conserver à 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 en retournant plusieurs fois le flacon avant usage.

### Conservation des réactifs

Cette trousse est stable jusqu'à la date de péremption indiquée si conservée comme indiqué. Conserver la trousse entre 2 et 8 °C après réception.

Les standards [CAL], les contrôles [CTRL] et la solution de 25-D biotine [25-D BIOTIN] [SOLN] reconstitués peuvent être conservés entre 2 et 8 °C pendant 8 semaines maximum.

Les barrettes des plaques recouvertes d'anticorps [MICROPLAT] non utilisées doivent être remises dans leur pochette en papier d'aluminium avec le sachet dessiccateur. Replier le bord de la pochette et la ranger dans un des sacs en plastique auto-scellants fournis. Conserver entre 2 et 8 °C pendant 8 semaines maximum.

La solution de lavage [WASHBUF] [SOLN] peut être conservée à température ambiante pendant 8 semaines maximum.

### Indices d'une détérioration des réactifs

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

Diminution de la densité optique du standard zéro. Pente ou courbe d'étalonnage différente de celles obtenue régulièrement.

### Prélèvement et conservation des échantillons

On doit doser la 25-hydroxyvitamine D sur des échantillons de sérum ou de plasma (EDTA ou

héparine). On doit effectuer la séparation aussitôt après le prélèvement. Pour un stockage prolongé, les échantillons devront être conservés à -20°C minimum. Éviter les congélations et décongélations répétées.

## Procédure

### Matériel fourni

#### 1. **CAL 0 - 6 - Standards**

**(REF AC-5701A - AC-5701G):**

Sérum humain lyophilisé tamponné contenant de la 25-hydroxyvitamine D et de l'azide de sodium à <1% (0,09 % reconstitué). La valeur exacte de chaque standard est imprimée sur l'étiquette de flacon, 1 ml par flacon, 7 flacons par trousse.

#### 2. **MICROPLAT - Plaque recouverte d'anticorps** **(REF AC-5702W):**

Microplaque contenant un anticorps polyclonal de mouton anti-25-hydroxyvitamine D fixé sur la surface intérieure des puits en polystyrène, 12 x 8 barrettes de puits dans une pochette en papier d'aluminium avec un sachet dessiccant.

#### 3. **25-D BIOTIN 50x - Concentré de 25-D biotine** **(REF AC-5703):**

Tampon lyophilisé contenant de la 25-hydroxyvitamine D marquée par de la biotine et des stabilisants spéciaux, 1 ml par flacon. 1 (F1) ou 2 (F2) flacons par trousse.

#### 4. **BUF - Tampon** **(REF AC-5703B) :**

Réactif spécialisé pour la dissociation de la 25-hydroxyvitamine D des protéines liantes, 50 ml par flacon. 1 (F1) ou 2 (F2) flacons par trousse.

#### 5. **ENZYMCONJ - Conjugué enzymatique** **(REF AC-5704) :**

Solution saline dans un tampon phosphate contenant de l'avidine fixée sur de la peroxydase de raifort, une protéine, des stabilisants enzymatiques et un agent de conservation. 22 ml par flacon. 1 (F1) ou 2 (F2) flacons par trousse.

#### 6. **CTRL 1 - 2 - Contrôles** **(REF AC-5705A - AC-5705B):**

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

#### 7. **SUBS - Substrat TMB**

**(REF AC-SUBS) :**

Solution aqueuse spéciale contenant de la tétraméthylbenzidine (TMB) et de la peroxyde d'hydrogène, 28 ml par flacon. 1 (F1) ou 2 (F2) flacons par trousse.

#### 8. **HCL - Solution d'arrêt**

**(REF AC-STOP) :**

Acide chlorhydrique 0,5 M, 13 ml par flacon. 1 (F1) ou 2 (F2) flacons par trousse.

#### 9. **WASHBUF 20x Solution concentrée de lavage** **(REF AC-WASHL):**

Solution saline dans un tampon phosphate contenant du Tween, 50 ml par flacon.

#### 10. **Adhésif pour plaques**

8 par trousse.

#### 11. **Documentation technique**

Notice et contrôle qualité.

### Matériel nécessaire mais non fourni

1. Tubes en verre borosilicaté ou polypropylène, à usage unique, 12 x 75 mm.  
*Remarque : Ne pas utiliser de tubes en polystyrène. Ne pas réutiliser les tubes.*
2. Pipettes de précision : 25 µl et 200 µl.
3. Distributeur automatique : 1 ml, par ex. Eppendorf Multipipette 4780 ou similaire.
4. Pipettes de précision à canaux multiples : 100 µl and 200 µl.
5. Agitateur type Vortex.
6. Laveur automatique de microplaques (facultatif).
7. Lecteur photométrique de microplaques et matériel d'analyse des données.

## Procédure de dosage

Reconstituer ou préparer les réactifs comme décrit dans la section « Préparation des réactifs ».

1. Préparer et marquer des tubes en verre borosilicaté ou polypropylène, un pour chaque standard [CAL], contrôle [CTRL] et échantillon [SPE].
2. Ajouter **25 µl** de chaque standard [CAL], contrôle [CTRL] ou échantillon dans le tube correspondant.
3. Ajouter **1 ml** de solution de 25-D biotine [25-D BIOTIN] [SOLN] dans chaque tube. Bien homogénéiser (vortexer) pendant 10 secondes.
4. Ajouter **200 µl** de chaque standard, contrôle ou échantillon dilué dans les puits appropriés de la plaque enduite d'anticorps [MICROPLAT] en doublet. Couvrir la plaque avec la fermeture adhésive. Incuber entre 18 et 25 °C pendant 2 heures.
5. Laver chaque puit trois fois avec de la solution de lavage [WASHBUF] [SOLN]:
  - a) Lavage automatique de la plaque : Régler le laveur de plaques pour qu'il distribue un minimum de 300 µl de solution de lavage [WASHBUF] [SOLN] par puit. Effectuer trois cycles de remplissage-aspiration.
  - b) Lavage manuel : Décanter le contenu des puits en retournant d'un seul coup la plaque. Distribuer 250 µl de solution de lavage [WASHBUF] [SOLN] dans chaque puit. Décanter et répéter deux fois ces opérations.Tapoter fermement la plaque retournée sur du papier absorbant afin de retirer l'excès de solution de lavage [WASHBUF] [SOLN] avant de passer à l'étape suivante.
6. Ajouter **200 µl** de conjugué enzymatique [ENZYMCONJ] dans chaque puit à l'aide d'une pipette à canaux multiples. Couvrir la plaque avec la fermeture adhésive. Incuber entre 18 et 25 °C pendant 30 minutes.
7. Répéter l'étape 5 de lavage.
8. Ajouter **200 µl** de substrat TMB [SUBS] dans chaque puit à l'aide d'une pipette à canaux multiples.  
Couvrir la plaque avec la fermeture adhésive. Incuber entre 18 et 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.*

9. Ajouter **100 µl** de solution d'arrêt [HCL] dans chaque puit à l'aide d'une pipette à canaux multiples.
10. Mesurer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (référence de 650 nm) à l'aide du lecteur de microplaques, dans les 30 minutes suivant l'ajout de la solution d'arrêt.

## Calibration

Les standards de 25-OH D sont standardisés par quantification UV.

## Contrôle de qualité

L'utilisation régulière des échantillons de contrôle à plusieurs niveaux d'analyte est conseillée pour assurer la validité des résultats. Deux contrôles de trousse sont fournis. Les contrôles doivent être testés comme inconnus. Des tableaux de contrôle de qualité doivent être maintenus pour suivre la performance de dosage.

## Calcul des résultats

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

$$B/Bo\% = \frac{\text{(moyenne de la densité optique)}}{\text{(moyenne de la densité optique Std '0')}} \times 100$$

Tracer la courbe étalon sur du papier semi-logarithmique en reportant les B/Bo% correspondant à chaque standard sur l'axe des ordonnées et leur concentration en 25-hydroxyvitamine D sur l'axe des abscisses.

Calculer le B/Bo% correspondant à chaque échantillon inconnu et lire la concentration en nmol/l (nM) sur la courbe. D'autres techniques de traitement des données 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 ».

Conversion des unités :

$$\begin{array}{ccc} & \times 0,40 \Rightarrow & \\ X \text{ nmol/l} & & Y \text{ ng/ml} \\ & \Leftarrow \times 2,5 & \end{array}$$

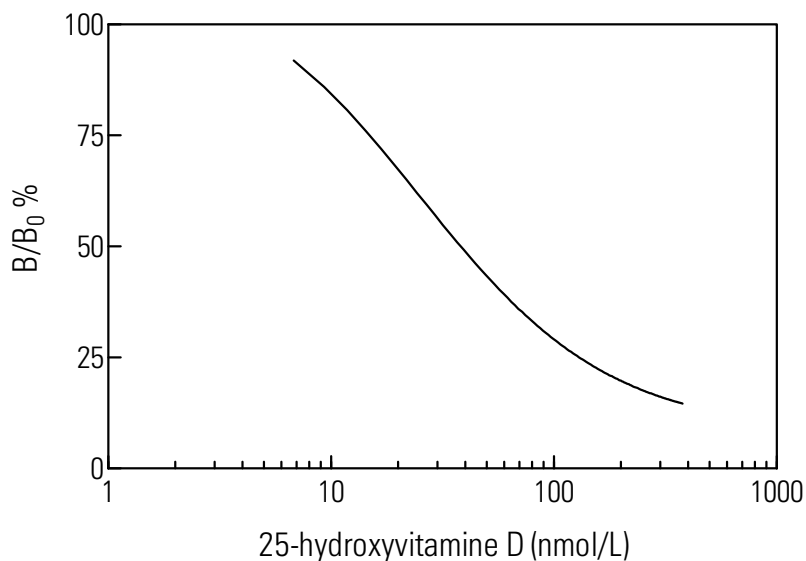
### Données de dosage - Exemple

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

Puits	Description	DO.	Moyenne de la DO	B/Bo%	Résultats nmol/l
A1, A2	Standard 0 0 nmol/l	2,476 2,530	2,503		
B1, B2	Standard 1 6.8 nmol/l	2,313 2,288	2,301	91,9	
C1, C2	Standard 2 14 nmol/l	1,912 1,908	1,910	76,3	
D1, D2	Standard 3 27 nmol/l	1,495 1,499	1,497	59,8	
E1, E2	Standard 4 67 nmol/l	0,919 0,905	0,912	36,4	
F1, F2	Standard 5 179 nmol/l	0,521 0,522	0,522	20,8	
G1, G2	Standard 6 380 nmol/l	0,372 0,368	0,370	14,8	
H1, H2	Echantillon 1	1,237 1,257	1,247	49,8	39
A3, A4	Echantillon 2	0,951 0,969	0,960	38,4	62
B3, B4	Echantillon 3	0,591 0,612	0,602	24,0	138

### Exemple de courbe standard

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



## Limites du dosage

1. Les échantillons de sérum dont les concentrations en analyte sont supérieures à celle du standard le plus concentré seront dilués, extraits et redosés.
2. 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.
3. Les caractéristiques de performances du dosage n'ont pas été établies chez les enfants.
4. Dans de rares cas, des titres très élevés d'anticorps anti-avidine peuvent conduire à des interférences.
5. Les substances suivantes ont été testées. Elles n'interfèrent pas dans ce dosage 25-Hydroxy Vitamin D :  
Hémoglobine testée jusqu'à une concentration de 1470 mg/dl  
Bilirubine testée jusqu'à une concentration de 513 µmol/l  
Lipides testés jusqu'à une concentration de 5,6 mmol/l de triglycérides

## Valeurs attendues

Les valeurs suivantes ont été déterminées avec la trousse 25-Hydroxy Vitamin D EIA d'IDS et ne sont fournies ici qu'à titre indicatif. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres normales.

Adultes normaux 47,7 - 144 nmol/L (n = 36)

## Caractéristiques du dosage

### Exactitude

La trousse 25-Hydroxy Vitamin D EIA d'IDS a été comparé à un dosage radioimmunologique identifié pour la détermination quantitative de la 25-hydroxyvitamine D et d'autres métabolites hydroxylés. On a analysé 180 échantillons, censés représenter un éventail de la 25-hydroxyvitamine D [9,3 - 151,2 nmol/l], par chaque méthode. Les résultats ont été analysés par régression linéaire:

IDS = 1,01(x) + 0,7; coefficient de corrélation (r) = 0,91

### Sensibilité

La sensibilité, définie comme étant la concentration correspondant à la moyenne moins deux déviations standards sur 10 dosages du standard zéro, est de 5 nmol/l.

## Précision

Intra-essai		Inter-essais	
moyenne (nmol/l)	n=10 % CV	moyenne (nmol/l)	n=11 % CV
39,0	5,3	40,3	4,6
67,1	5,6	72,0	6,4
165	6,7	132	8,7

## Test de surcharge

Le pourcentage de récupération a été étudié en ajoutant 25-OH D à des échantillons avant de faire le dosage.

Echantillon	Mesuré nmol/l	Attendu nmol/l	Récupération %
A	122	126	97
A	95,6	98,4	97
B	147	141	104
B	123	118	105
<b>Moyenne</b>			<b>101</b>

## Test de parallélisme

Le parallélisme a été étudié en diluant des échantillons avec le tampon (solution tampon saline contenant de la BSA à 9%) avant de faire le dosage.

Echantillon	Mesuré (nmol/l)	Attendu (nmol/l)	% M/A
A	83,9		
A/2	41,0	42,0	98
A/4	20,8	21,0	99
A/8	13,1	10,5	125
B	83,9		
B/2	43,5	42,0	104
B/4	23,1	21,0	110
B/8	10,7	10,5	102
C	104		
C/2	45,9	52,0	88
C/4	22,5	26,0	87
C/8	14,1	13,0	108
<b>Moyenne</b>			<b>102</b>

## Spécificité

La spécificité de l'antisérum a été étudiée en ajoutant au sérum des quantités connues de la substance à analyser et en mesurant la réaction croisée pour 50 % de B/Bo.

Substance à analyser	Réaction croisée
25-Hydroxyvitamine D <sub>3</sub>	100 %
25-Hydroxyvitamine D <sub>2</sub>	75 %
24,25-Dihydroxyvitamine D <sub>3</sub>	≥ 100 %
Cholécalciférol (D <sub>3</sub> )	< 0,01 %
Ergocalciférol (D <sub>2</sub> )	< 0,3 %

## Verwendungszweck

### Zur In-vitro-Diagnostik

Der IDS 25-Hydroxy-Vitamin-D EIA-Kit ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin D (25-OH D) und anderen hydroxylierten Metaboliten in menschlichem Serum oder Plasma. Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen und labor diagnostischen Daten verwendet werden, um den Arzt in der Einschätzung des Vitamins-D-Status zu unterstützen bei Erwachsenen.

## Zusammenfassung und Erklärung

Vitamin D ist ein allgemein gebräuchlicher Sammelbegriff für eine Familie eng verwandter Secosteroide. Sonnenlicht induziert die photolytische Spaltung des „B“-Ringes des tief in den aktiv wachsenden Schichten der Epidermis gelegenen 7-Dehydrocholesterins zum Provitamin D<sub>3</sub>, welches weiter zum Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) isomerisiert. Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol) können alternativ in Form von Nahrungsmittelzusätzen bzw. einer begrenzten Anzahl bestimmter Nahrungsmittel aufgenommen werden. Vitamin D<sub>2</sub> wird in diesem Fall in ähnlicher Weise wie Vitamin D<sub>3</sub> metabolisiert.

Vitamin D wird im Fettgewebe gespeichert und tritt an VDBP (Vitamin-D bindendes Protein) und an Albumin gebunden in den Blutkreislauf ein. In der Leber wird Vitamin D zu 25-Hydroxy-Vitamin D hydroxyliert, welches ebenfalls als Komplex mit VDBP zirkuliert. Ein kleiner Anteil des 25-OH D wird in der Niere, unter direkter Regelung durch das Parathormon (PTH) und des Spiegels an ionisiertem Kalzium, weiter hydroxyliert, um das biologisch aktive kalziotrophe Hormon 1,25-Dihydroxy-Vitamin D zu bilden. Die unbehinderte Ausscheidung erfolgt nach weiterer Hydroxylierung und Metabolisierung des Vitamin D zu wasserlöslichen Verbindungen.

Die hepatische Vitamin-D-25-Hydroxylase-Aktivität unterliegt keiner strikten Regulierung. Die Produktion von Vitamin D<sub>3</sub> in der Haut oder die Einnahme von Vitamin D (D<sub>3</sub> oder D<sub>2</sub>) mit der Nahrung beeinflussen somit den Spiegel an zirkulierendem 25-OH D<sup>(1)</sup>.

Die Serumkonzentration an 25-OH D wird als das zuverlässigste Maß zur Bestimmung des gesamten Vitamin-D-Status betrachtet und kann folglich zur Abklärung eines möglichen Vitamin-D-Mangels eines Patienten verwendet werden<sup>(2)</sup>. Die Bestimmung des Vitamin-D-Status kann indiziert sein, um die Ursache eines anormalen Serumkalziumspiegels eines Patienten abzuklären.

## Beschreibung der Methode

Der IDS 25-Hydroxy-Vitamin-D EIA-Kit ist ein Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von 25-OH D und anderer hydroxylierter Metaboliten im Serum oder Plasma. Die Kalibratoren, Kontrollen und Proben werden mit biotin-markiertem 25-OH D verdünnt. Die verdünnten Proben werden in Mikrotiter-Vertiefungen, die mit einem hochspezifischen 25-OH-D-Antikörper (Schaf) beschichtet sind, 2 Stunden lang bei Zimmertemperatur inkubiert, bevor sie aspiriert und gewaschen werden. Hinzugegeben wird mit Enzym (Meerrettich-Peroxidase) markiertes Avidin, das sich selektiv mit Biotin-Komplexen verbindet; nach einem weiteren Waschschrift, erfolgt eine Farbentwicklung mit Hilfe eines chromogenen Substrats (TMB). Die Absorption des gestoppten Reaktionsgemisches wird in einem Mikrotiterplatten-Messgerät gemessen, wobei die sich ergebende Farbintensität der Konzentration an 25-OH D umgekehrt proportional ist.

## Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der IDS 25-Hydroxy-Vitamin-D EIA-Kit ist nur zur In-vitro-Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. IDS Limited kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht (sofern nicht gesetzlich anders festgelegt).

**VORSICHT:** Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien so handhaben, als ob sie zum Übertragen eines Infektionserregers fähig seien.

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.

**Menschliches Serum:** Kalibratoren CAL und Kontrollen CTRL

Das menschliche Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch von der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde FDA empfohlene Nachweisverfahren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Human-Immunschwäche-Virus (HIV I und II), gegen Hepatitis-B-Oberflächenantigen und gegen Hepatitis-C-Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß der Vorgaben der Biosicherheitsstufe 2 gehandhabt 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, welches mit Abflussleitungen aus Blei, Kupfer oder Messing hochexplosive Metallazide bilden kann; Zum Beseitigen der Reagenzien mit viel Wasser nachspülen, um die Ansammlung von Aziden zu vermeiden.

## 0,5 M Salzsäure

Die Stopplösung [HCL] enthält 0,5 M Salzsäure.

- R36/38 Reizt die Augen und die Haut.  
S26 Bei Berührung mit den Augen sofort mit reichlich Wasser spülen und Arzt konsultieren.  
S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

## Tetramethylbenzidin

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

- R21/22 Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.  
S36/37 Geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.

## Präparation der Reagenzien

**Kalibratoren [CAL] und Kontrollen [CTRL]:** Kalibratoren [CAL] und Kontrollen [CTRL] werden lyophilisiert geliefert. Mit 1 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser rekonstituieren, mit dem Stopfen verschließen und 10-15 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen lassen. Mehrmals überkopfdrehen, um eine vollständige Auflösung zu gewährleisten. Bei 2-8 °C lagern.

**25-D-Biotinlösung [25-D BIOTIN] [SOLN]:** 25-D-Biotinkonzentrat [25-D BIOTIN] [50x] wird lyophilisiert geliefert. 3 mL Puffer [BUF] in die Flasche mit dem lyophilisierten 25-D-Biotinkonzentrat [25-D BIOTIN] [50x] (blaue Farbe) hinzugeben. Wieder mit dem Stopfen

verschließen und 10 - 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen lassen. Mehrmals überkopfdrehen, um eine vollständige Auflösung zu gewährleisten. Das rekonstituierte 25-D-Biotinkonzentrat [25-D BIOTIN] [50x] (3 mL) zurück in die Flasche mit dem restlichen Puffer [BUF] geben. Durch Überkopfdrehen gründlich mischen. Die 25-D-Biotinlösung (50 mL) ist grünfarben. Die Flasche mit „25-D-Biotinlösung“ kennzeichnen. Bei 2-8 °C lagern.

**Waschlösung [WASHBUF] [SOLN]:** Den Inhalt jeder Flasche Waschkonzentrat [WASHBUF] [20x] zu 950 mL destilliertem oder deionisiertem Wasser hinzufügen und mischen. Bei Zimmertemperatur lagern.

Alle anderen Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Zimmertemperatur bringen. Vor jedem Gebrauch für ein Assay die Reagenzien durch mehrmaliges Überkopfdrehen mischen.

## Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Der Kit ist bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zum Ablauf des Verfallsdatums stabil. Nach Erhalt sind alle Reagenzien bei 2-8 °C zu lagern.

Rekonstituierte Kalibratoren [CAL], Kontrollen [CTRL] und die 25-D-Biotinlösung [25-D BIOTIN] [SOLN] können bei 2-8 °C bis zu 8 Wochen lang aufbewahrt werden.

Nicht verwendete Plattenstreifen mit Antikörperbeschichtung [MICROPLAT] sind zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in den Folienbeutel zurückzugeben. Den Abschluss des Folienbeutels umfalten und in einem der gelieferten selbstklebenden Kunststoffbeutel einschließen. Bei 2-8 °C bis zu 8 Wochen lang haltbar.

Die Waschlösung [WASHBUF] [SOLN] ist bei Zimmertemperatur bis zu 8 Wochen lang haltbar.

## Anzeichen für mögliche Unbrauchbarkeit der Kitreagenzien

Das Vorhandensein von anormalen Feststoffteilchen in einem Reagens.

Eine Verringerung der Absorption des Nullkalibrators.

Eine Verschiebung in der Steigung der Kurve aus ihrer Normalposition.

## Probennahme und -lagerung

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



## Testdurchführung

### Im Kit enthaltenes Material

1. **CAL 0 - 6 – Kalibratoren**  
(REF AC-5701A - AC-5701G):

Lyophilisiertes gepuffertes menschliches Serum, das 25-Hydroxy-Vitamin-D und <1% (0,09 % rekonstituiert) Natriumazid enthält. Der genaue Wert für jeden Kalibrator ist auf dem Fläschchen aufgedruckt, 1 mL pro Flasche. 7 Flaschen pro Kit.

2. **MICROPLAT – Mit Antikörper beschichtete Platte**  
(REF AC-5702W):

Mikroplatte, beschichtet mit polyklonalen 25-Hydroxy-Vitamin-D-Antikörpern (Schaf) zur inneren Oberfläche der Vertiefungen, Mikrotiterstreifen (12 x 8) in einem Folienbeutel mit Trockenmittel.

3. **25-D BIOTIN 50x – 25-D-Biotinkonzentrat**  
(REF AC-5703):

Lyophilisierter Puffer mit 25-Hydroxy-Vitamin-D (markiert mit Biotin) sowie firmeneigene Stabilisatoren. 1 mL pro Flasche. 1 (F1) oder 2 (F2) Flaschen pro Kit.

4. **BUF – Puffer**  
(REF AC-5703B):

Ein firmeneigenes Reagenz für das Dissoziieren von 25-Hydroxy-Vitamin-D von den Bindungsproteinen, 50 mL pro Flasche. 1 (F1) oder 2 (F2) Flaschen pro Kit.

5. **ENZYMCONJ – Enzymkonjugat**  
(REF AC-5704):

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, enthält an Meerrettichperoxidase gebundenes Avidin, Enzymstabilisatoren und Konservierungsmittel. 22 mL pro Flasche. 1 (F1) oder 2 (F2) Flaschen pro Kit.

6. **CTRL 1 - 2 – Kontrollen**  
(REF AC-5705A - AC-5705B):

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

7. **SUBS – TMB-Substrat**  
(REF AC-SUBS):

Eine firmeneigene wässrige Formulierung aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxyd, 28 mL pro Flasche. 1 (F1) oder 2 (F2) Flaschen pro Kit.

8. **HCL – Stopplösung**  
(REF AC-STOP):

0,5 M Salzsäure, 13 mL pro Flasche. 1 (F1) oder 2 (F2) Flaschen pro Kit.

9. **WASHBUF 20x – Waschkonzentrat**  
(REF AC-WASHL):

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween, 50 mL pro Flasche.

10. **Klebefolie zur Abdeckung der Platten**  
8 pro Kit.

11. **Dokumentaion**

Packungsbeilage und Qualitätskontrollbericht.

### Benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Materialien

1. Einweg-Borosilicatglas- oder Polypropylenröhrchen (12 x 75 mm).  
*Hinweis: Polystyrolröhrchen sind nicht geeignet. Röhrchen nicht wiederverwenden.*
2. Präzisionspipetten für Volumina von 25 µL und 200 µL.
3. Mehrfachpipetten für Volumina von 1 mL, z.B. Eppendorf Multipipette 4780 oder ähnliche Vorrichtung.
4. Präzisionsmehrkanalpipetten für Volumina von 100 µL und 200 µL.
5. Vortexmischer.
6. Automatisches Mikroplattenwaschgerät (optional).
7. Photometrisches Mikroplattenmessgerät und Datenanalyse-gerätschaften.

## Assay-Verfahren

Reagenzien rekonstituieren oder vorbereiten, wie in "Präparation der Reagenzien" beschrieben.

1. Beschriftete Borosilicatglas- oder Polypropylenröhrchen vorbereiten; je eines pro Kalibrator [CAL], Kontrolle [CTRL] und Probe [SPE].
  2. **25 µL** jedes Kalibrator [CAL], Kontrolle [CTRL] oder Probe in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen pipettieren.
  3. **1 ml** 25-D-Biotinlösung [25-D BIOTIN] [SOLN] in alle Röhrchen hinzugeben. Alle Röhrchen mit dem Vortex-mischer 10 Sekunden lang gründlich mischen.
  4. **200 µL** jedes verdünnten Kalibrator, Kontrolle oder Probe in die entsprechenden Vertiefungen der mit Antikörper beschichteten Platte [MICROPLAT] geben (im Duplikat). Die Platte mit einer Klebefolie verschließen. 2 Stunden lang bei 18-25 °C inkubieren.
  5. Alle Vertiefungen dreimal mit Waschlösung [WASHBUF] [SOLN] waschen.
    - a) Automatische Plattenwäsche: Am Plattenwaschgerät eine Abgabe von mindestens 300 µL Waschlösung [WASHBUF] [SOLN] pro Vertiefung einstellen. Drei Zyklen lang füllen und aspirieren.
    - b) Manuelle Wäsche: Den Inhalt der Vertiefungen durch ruckartiges Umdrehen abgießen. In alle Vertiefungen 250 µL Waschlösung [WASHBUF] [SOLN] geben. Abgießen und noch zweimal wiederholen.
- Die umgedrehte Platte kräftig auf Saugtücher klopfen, um überschüssige Waschlösung [WASHBUF] [SOLN] zu entfernen, bevor der nächste Schritt angegangen wird.
6. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette **200 µL** Enzymkonjugat [ENZYMCONJ] in alle Vertiefungen hinzugeben. Die Platte mit einer Klebefolie verschließen. 30 Minuten lang bei 18-25 °C inkubieren.
  7. Waschschrift 5 wiederholen.
  8. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette **200 µL** TMB-Substrat [SUBS] in alle Vertiefungen hinzugeben. Die Platte mit einer Klebefolie verschließen. 30 Minuten lang bei 18-25 °C 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.*

9. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette **100 µL** Stopplösung [HCL] in alle Vertiefungen hinzugeben.
10. Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung die Absorption jeder Vertiefung mit Hilfe eines Mikrotiterplattenmessgeräts bei 450 nm messen (Referenz: 650 nm).

## Kalibrierung

25-OH-D-Kalibratoren werden durch UV-Quantifizierung standardisiert.

## Qualitätskontrolle

Es ist ratsam, regelmäßig Kontrollproben unterschiedlicher Analyt-Konzentrationen einzusetzen, um sicherzustellen, dass man von Tag zu Tag reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Zwei Kit-Kontrollen werden zur Verfügung gestellt. Die Kontrollen sollten wie unbekannte Proben getestet werden. Um die Leistung des Assays zu überwachen, sollten Qualitätskontrolltabellen geführt werden.

## Ergebnisberechnung

Berechnung der prozentualen Bindungen (B/Bo%) für jeden Kalibrator, Kontrolle und unbekannte Probe:

$$B/Bo\% = \frac{\text{(durchschnittliche Absorption)}}{\text{(durchschnittliche Absorption für "0"-Kalibrator)}} \times 100$$

Eine Eichkurve auf semi-logarithmischem Papier anlegen, indem B/Bo % auf der Ordinate gegen die 25-OH-D-Konzentration auf der Abszisse aufgetragen wird. B/Bo % für jede unbekannte Probe berechnen und die Konzentration in nmol/L an der Kurve ablesen.

Alternative Umrechnungsmethoden können verwendet werden, allerdings sollte bestätigt werden, dass der gewählte Kurvenverlauf geeignet ist und akzeptable Ergebnisse liefert. "Smoothed Spline" oder eine 4-Parameter-Auswertung werden empfohlen.

Einheiten-Umrechnung

$$\begin{array}{ccc} & \times 0,40 \Rightarrow & \\ X \text{ nmol/L} & & Y \text{ ng/mL} \\ & \Leftarrow \times 2,5 & \end{array}$$

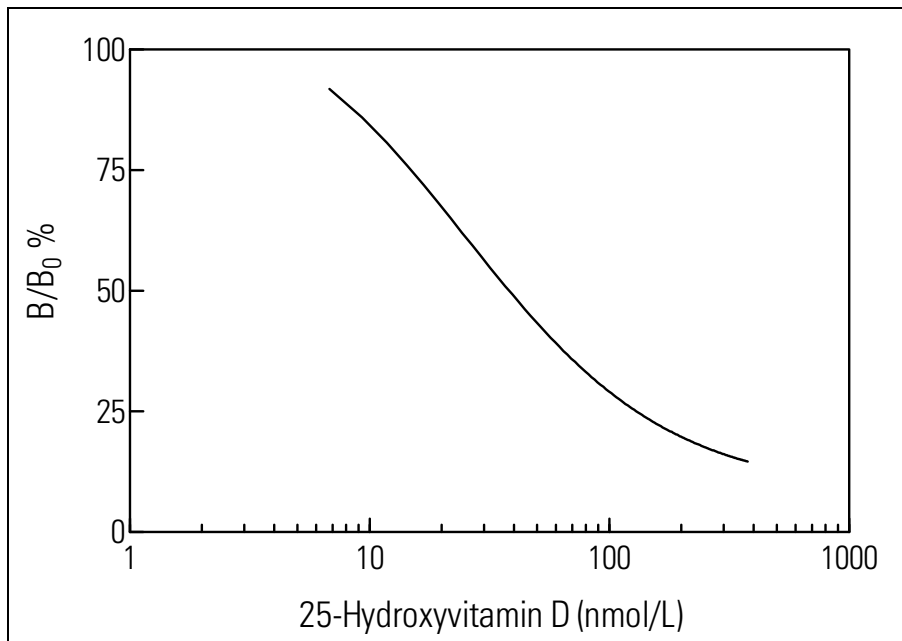
### Assay-Beispieldaten

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

Vertiefung	Beschreibung	Abs.	Abs.-Mittel-wert	B/Bo%	Ergebnis (nmol/L)
A1, A2	Kalibrator 0 0 nmol/L	2,476	2,503		
		2,530			
B1, B2	Kalibrator 1 6.8 nmol/L	2,313	2,301	91,9	
		2,288			
C1, C2	Kalibrator 2 14 nmol/L	1,912	1,910	76,3	
		1,908			
D1, D2	Kalibrator 3 27 nmol/L	1,495	1,497	59,8	
		1,499			
E1, E2	Kalibrator 4 67 nmol/L	0,919	0,912	36,4	
		0,905			
F1, F2	Kalibrator 5 179 nmol/L	0,521	0,522	20,8	
		0,522			
G1, G2	Kalibrator 6 380 nmol/L	0,372	0,370	14,8	
		0,368			
H1, H2	Probe 1	1,237	1,247	49,8	39
		1,257			
A3, A4	Probe 2	0,951	0,960	38,4	62
		0,969			
B3, B4	Probe 3	0,591	0,602	24,0	138
		0,612			

### Typische Eichkurve

Diese Eichkurve dient nur als Beispiel zur Illustration.



## Gebrauchseinschränkungen

1. Proben, von denen anzunehmen ist, dass sie eine höhere Konzentration als der höchste Kalibrator aufweisen, sollten verdünnt untersucht werden.
2. Wie bei jedem Diagnostikverfahren sollten die Ergebnisse stets gemeinsam mit dem klinischem Erscheinungsbild des Patienten sowie anderen, dem Arzt zur Verfügung stehenden Informationen interpretiert werden.
3. Die Leistungskennzeichen dieses Tests wurden bei pädiatrischen Populationen nicht bestimmt.
4. In seltenen Einzelfällen können Störungen durch extrem hohe Titer von Antikörpern gegen Avidin auftreten.
5. Bei folgenden Substanzen wurde die Abwesenheit störender Interferenzen in der 25-Hydroxy-Vitamin-D-Bestimmung bestätigt:

Hämoglobin geprüft bis 1470 mg/dL  
 Bilirubin geprüft bis 513 µmol/L  
 Lipid geprüft bis 5,6 mmol/L Triglyzerid

## Normalwerte

Der folgende Bereich wurde mit dem IDS 25-Hydroxy-Vitamin-D EIA-Kit bestimmt und ist nur als Richtlinie angeführt. Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich für die lokale Bevölkerung festlegen.

Gesunde Erwachsene 47,7 - 144 nmol/L (n = 36)

## Leistungsdaten

### Genauigkeit

Der IDS 25-Hydroxy-Vitamin-D EIA-Kit wurde mit einem anerkannten Radioimmunoassay für die quantitative Bestimmung von 25-Hydroxy-Vitamin D und anderer hydroxylierter Metaboliten verglichen. Eine Auswahl von 180 Proben wurde herangezogen, um einen großen Wertebereich für 25-Hydroxy-Vitamin D [9,3 - 151,2 nmol/L] zu überprüfen. Die Proben wurden mit beiden Methoden geprüft. Eine lineare Regression nach der Methode der Mindestquadrate wurde an den Vergleichsdaten durchgeführt:

IDS = 1,01(x) + 0,7; Korrelationskoeffizient (R) = 0,91.

### Empfindlichkeit

Die Empfindlichkeit ist definiert als jene Konzentration, die dem Mittelwert minus 2 Standardabweichungen von 10 Doppelbestimmungen des Nullkalibrators entspricht. Sie wurde als 5 nmol/L bestimmt.

## Präzision

Intra-Assay	n=10	Inter-Assay	n=11
Mittelwert (nmol/L)	% VK	Mittelwert (nmol/L)	% VK
39,0	5,3	40,3	4,6
67,1	5,6	72,0	6,4
165	6,7	132	8,7

## Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde durch Zugabe von 25-OH D zu den Proben vor Messung bestimmt.

Probe	Gemessen (nmol/L)	Erwartet (nmol/L)	Wiederfindung %
A	122	126	97
A	95,6	98,4	97
B	147	141	104
B	123	118	105
<b>Mittelwert</b>			<b>101</b>

## Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnung der Proben mit Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit 9% BSA) vor Messung bestimmt.

Probe	Gemessen (nmol/L)	Erwartet (nmol/L)	Gemessen/Erwartet %
A	83,9		
A/2	41,0	42,0	98
A/4	20,8	21,0	99
A/8	13,1	10,5	125
B	83,9		
B/2	43,5	42,0	104
B/4	23,1	21,0	110
B/8	10,7	10,5	102
C	104		
C/2	45,9	52,0	88
C/4	22,5	26,0	87
C/8	14,1	13,0	108
<b>Mittelwert</b>			<b>102</b>

## Spezifität

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

Analyt	Kreuzreaktivität
25-Hydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>	100 %
25-Hydroxy-Vitamin D <sub>2</sub>	75 %
24,25-Dihydroxy-Vitamin D <sub>3</sub>	≥100 %
Cholecalciferol (D <sub>3</sub> )	<0,01 %
Ergocalciferol (D <sub>2</sub> )	<0,30 %

## Uso Previsto

### *Per uso diagnostico in vitro*

Il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA è un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della 25-idrossivitamina D (25-OH D) e di altri metaboliti idrossilati nel siero o plasma umano. I risultati ottenuti devono essere valutati dal clinico unitamente ad altri dati di laboratorio e clinici nella popolazione adulta.

### Sommario

Il nome vitamina D è un termine generale comunemente usato per identificare i componenti di una famiglia di secosteroidi. A seguito dell'esposizione alla luce solare, il 7-deidrocolesterolo, situato in profondità negli strati epidermici in fase di proliferazione attiva, subisce la segmentazione fotolitica dell'anello "B" dando luogo alla formazione di previtamina D<sub>3</sub>, che si trasforma quindi spontaneamente nel suo isomero vitamina D<sub>3</sub> (coleciferolo). La vitamina D<sub>3</sub> e la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferolo) possono anche venire assunte tramite integratori del regime alimentare o il consumo di determinati cibi. La vitamina D<sub>2</sub> viene metabolizzata in maniera simile alla D<sub>3</sub>.

La vitamina D viene immagazzinata nel tessuto adiposo ed entra nel circolo ematico associata alla proteina di legame della vitamina D (VDBP) e all'albumina. Nel fegato avviene una prima idrossilazione della vitamina D a 25-idrossivitamina D (25-OH D), che viene anch'essa messa in circolo associata alla proteina di legame. Si assiste quindi all'ulteriore idrossilazione di una piccola parte di 25-OH D ad opera dei reni (processo regolato in modo diretto dall'ormone paratiroideo e dai livelli di calcio ionizzato), che genera l'ormone calcitropico biologicamente attivo 1,25-diidrossivitamina D. L'ulteriore idrossilazione e il metabolismo della vitamina D produce composti idrosolubili e prontamente escreti.

Poiché l'attività dell'enzima epatico vitamina D 25-idrossilasi non è rigorosamente regolata, gli aumenti e le riduzioni nella produzione cutanea di vitamina D<sub>3</sub> o l'assunzione di vitamina D (D<sub>2</sub> o D<sub>3</sub>) attraverso la dieta provocano fluttuazioni nei livelli di 25-OH D nel circolo ematico<sup>(1)</sup>.

La misurazione dei livelli sierici di 25-OH D è considerato il metodo più attendibile per la determinazione dello stato vitaminico D del paziente e può essere quindi utilizzata per valutare se sia sufficiente l'apporto di vitamina D del paziente<sup>(2)</sup>. La valutazione dello stato della vitamina D può inoltre

essere necessaria per la determinazione delle possibili cause di concentrazioni anormali di calcio nel siero.

### Descrizione del metodo

Il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA è un dosaggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della 25-OH D e altri metaboliti idrossilati nel siero o plasma umano. Gli standard, controlli e campioni vengono diluiti con 25-OH D marcata con biotina. I campioni diluiti vengono incubati nei pozzetti della micropiastra (rivestiti con un anticorpo ovino anti-25-OH D altamente specifico) per 2 ore a temperatura ambiente prima dell'aspirazione e del lavaggio. Viene quindi aggiunta avidina marcata con enzima (perossidasi di rafano): questa forma legami selettivi con la biotina del complesso; quindi, dopo un ulteriore lavaggio, si aggiunge il substrato cromogenico (TMB) per provocare lo sviluppo del colore. L'assorbanza, dopo aver stoppato la reazione viene letta mediante un lettore di micropiastre, tenendo presente che l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di 25-OH D.

### Precauzioni e avvertenze

Il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA 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 materiali di origine umana e/o animale. I reagenti del kit vanno pertanto trattati come potenziali vettori di agenti infettivi.**

Per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei reagenti del kit è necessario adottare le opportune precauzioni e attenersi alle corrette prassi di laboratorio. Lo smaltimento dei reagenti del kit va eseguito nel rispetto delle normative vigenti.

**Siero umano:** standard CAL e 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 1 e HIV 2), 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 dai reagenti, 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.

## Acido cloridrico a 0,5 M

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

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

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

S36/37 Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

## Tetrametilbenzidina

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

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

S36/37 Usare indumenti protettivi e guanti adatti.

## Preparazione dei reagenti

**Standard [CAL] e controlli [CTRL]:** gli standard [CAL] e i controlli [CTRL] sono forniti liofilizzati. Ricostituirli con 1 ml di acqua distillata o deionizzata, tapparli e lasciarli riposare per 10-15 minuti a temperatura ambiente. Capovolgere i flaconi parecchie volte per garantire la completa ricostituzione. Conservarli a 2-8 °C.

**Soluzione di biotina 25-D [25-D BIOTIN] [SOLN]:** Biotina 25-D concentrata [25-D BIOTIN] [50x] è fornita liofilizzata. Aggiungere 3 ml di tampone [BUF] al flacone di biotina 25-D concentrata [25-D BIOTIN] [50x] (colore blu). Tappare il flacone e lasciare riposare per 10-15 minuti a temperatura ambiente. Capovolgere il flacone parecchie volte per garantire la completa

ricostituzione. Aggiungere il concentrato di biotina 25-D ricostituito [25-D BIOTIN] [50x] (3 ml) al flacone contenente il tampone [BUF] rimanente. Mescolare bene capovolgendo il flacone. La soluzione di biotina 25-D (50 ml) è di colore verde. Etichettare il flacone con la dicitura "Soluzione di biotina 25-D". Conservare a 2-8 °C.

**Soluzione di lavaggio [WASHBUF] [SOLN]:** aggiungere il contenuto di ogni flacone della soluzione di lavaggio concentrata [WASHBUF] [20x] a 950 ml di acqua distillata o deionizzata e mescolare. Conservare a temperatura ambiente.

Tutti gli altri reagenti sono forniti pronti per l'uso.

Prima dell'uso, portare a temperatura ambiente tutti i reagenti.

Prima dell'uso, i reagenti vanno miscelati capovolgendo ripetutamente i rispettivi flaconi.

## 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.

Gli standard [CAL], i controlli [CTRL] e la soluzione di biotina 25-D [25-D BIOTIN] [SOLN] ricostituiti possono essere conservati a 2-8 °C per un massimo di 8 settimane.

Le strips [MICROPLAT] non utilizzate vanno conservate all'interno della loro busta in alluminio, unitamente al pacchetto contenente la sostanza essiccante. Ripiegare su sé stessa l'estremità della busta in alluminio e chiuderla ermeticamente in una delle sacche autosigillanti in plastica fornite. Conservare a 2-8 °C per un massimo di 8 settimane.

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

## Possibili segni di deterioramento dei reagenti del kit

Presenza di materiale corpuscolato anomalo in qualsiasi reagente.

Calo di assorbanza dello standard zero.

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. I campioni possono essere conservati a lungo termine, riponendoli a -20 °C. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo.

## Procedura

### Materiali forniti

1. **CAL 0 - 6 – Standard**

(REF AC-5701A - AC-5701G):

Siero umano liofilizzato tamponato contenente 25-idrossivitamina D e sodio azide allo <1% 0,09% (ricostituito). Il valore esatto di ciascuno standard è stampato sull'etichetta del flacone, 1 ml/flacone, 7 flaconi per kit.

2. **MICROPLAT - Piastra rivestita di anticorpi**

(REF AC-5702W):

Micropiastra con micropozzetti in polistirolo con superficie interna rivestita di anticorpo ovino policlonale anti-25-idrossivitamina D, strisce da 12 x 8 pozzetti in busta in alluminio con sostanza essiccante.

3. **25-D BIOTIN 50x - Concentrato di biotina 25-D**

(REF AC-5703):

Tampone liofilizzato contenente 25-idrossivitamina D marcata con biotina, e sostanze stabilizzanti brevettate, 1 ml/flacone. 1 (F1) o 2 (F2) flaconi per kit.

4. **BUF - Tampone**

(REF AC-5703B):

Reagente brevettato per la dissociazione della 25-idrossivitamina D dalle proteine di legame, 50 ml/flacone. 1 (F1) o 2 (F2) flaconi per kit.

5. **ENZYMCONJ - Coniugato enzimatico**

(REF AC-5704):

Soluzione fisiologica tamponata con fosfato contenente avidina legata a perossidasi di rafano, proteine, stabilizzatori enzimatici e conservanti, 22 ml/flacone. 1 (F1) o 2 (F2) flaconi per kit.

6. **CTRL 1 - 2 - Controlli**

(REF AC-5705A - AC-5705B):

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

7. **SUBS - Substrato TMB**

(REF AC-SUBS):

Formula acquosa brevettata di tetrametilbenzidina (TMB) e perossido di idrogeno, 28 ml/flacone. 1 (F1) o 2 (F2) flaconi per kit.

8. **HCL - Soluzione di arresto**

(REF AC-STOP):

0,5 M di acido cloridrico, 13 ml/flacone. 1 (F1) o 2 (F2) flaconi per kit.

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

(REF AC-WASHL):

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

10. **Sigillante adesivo per piastra**

8 per kit.

11. **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 o polipropilene a perdere.

*Nota: le provette di polistirolo non sono idonee. Le provette non vanno riutilizzate.*

2. Pipette automatiche di precisione per dispensare 25 µl e 200 µl.

3. Pipette a ripetizione (tipo Eppendorf Multipipette 4780 o equivalenti) per dispensare 1 ml.

4. Pipette multicanale di precisione per dispensare 100 µl e 200 µl.

5. Agitatore vortex.

6. Lavatore automatico (opzionale).

7. Lettore fotometrico di micropiastre e software per l'analisi dei dati.

## Procedura del dosaggio

Ricostituire o preparare i reagenti in base a quanto descritto nella sezione "Preparazione dei reagenti".

1. Preparare le provette di vetro borosilicato o polipropilene etichettandole rispettivamente per standard [CAL], controllo [CTRL] e campione [SPE].
2. Dispensare **25 µl** di standard [CAL], controllo [CTRL] o campione alle relative provette.
3. Dispensare **1 ml** di soluzione di biotina 25-D [25-D BIOTIN] [SOLN] a tutte le provette. Agitare su vortex per 10 secondi.
4. Dispensare **200 µl** di standard, controllo o campione diluiti agli opportuni pozzetti della piastra rivestita di anticorpi [MICROPLAT] in duplicato.

Coprire la piastra con un sigillante adesivo per piastra. Incubare a 18-25 °C per 2 ore.

5. Lavare tutti i pozzetti tre volte con la soluzione di lavaggio [WASHBUF] [SOLN]:
  - a) Lavaggio automatico: utilizzare 300 µl di soluzione di lavaggio [WASHBUF] [SOLN] per pozzetto. Riempire e aspirare per 3 cicli.
  - b) Lavaggio manuale: lasciare decantare il contenuto dei pozzetti capovolgendoli con decisione. Dosare 250 µl di soluzione di lavaggio [WASHBUF] [SOLN] 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 [WASHBUF] [SOLN] in eccesso.

6. Dispensare **200 µl** di coniugato enzimatico [ENZYMCNJ] a tutti i pozzetti usando una pipetta multicanale.  
Coprire la piastra con un sigillante adesivo per piastra. Incubare a 18-25 °C per 30 minuti.
7. Ripetere la fase di lavaggio indicata al punto 6.
8. Dispensare **200 µl** di substrato TMB [SUBS] a tutti i pozzetti usando una pipetta multicanale.  
Coprire la piastra con un sigillante adesivo per piastra. Incubare 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.*

9. Dispensare **100 µl** di soluzione di stoppante [HCL] a tutti i pozzetti utilizzando una pipetta multicanale.

10. Misurare l'assorbanza di ciascun pozzetto a 450 nm (riferimento: 650 nm) mediante un lettore di micropiastre entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione stoppante.

## Calibrazione

Gli standard per 25-OH D sono calibrati mediante quantificazione ai raggi ultravioletti.

## Controllo di qualità

Per garantire la qualità dei risultati usare regolarmente campioni di controllo a diversa concentrazione di analita. Il kit fornisce due controlli che vanno analizzati come campioni sconosciuti. I valori ottenuti devono essere utilizzati per valutare nel tempo il rendimento del metodo.

## Calcolo dei risultati

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

$$B/Bo\% = \frac{\text{(assorbanza media)}}{\text{(assorbanza media per lo standard '0')}} \times 100$$

Tracciare una curva di calibrazione su carta semilogaritmica, ponendo B/Bo% in ordinata e le concentrazioni di 25-idrossivitamina D in ascissa. Calcolare B/Bo% per ciascun campione sconosciuto e leggere i valori dalla curva in nmol/l (nM). Per l'interpolazione dei dati è possibile utilizzare vari algoritmi di calcolo; 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.

Per la conversione delle unità, utilizzare la seguente formula:

$$\begin{array}{ccc} & \times 0,40 \Rightarrow & \\ X \text{ nmol/L} & & Y \text{ ng/ml} \\ & \Leftarrow \times 2,5 & \end{array}$$



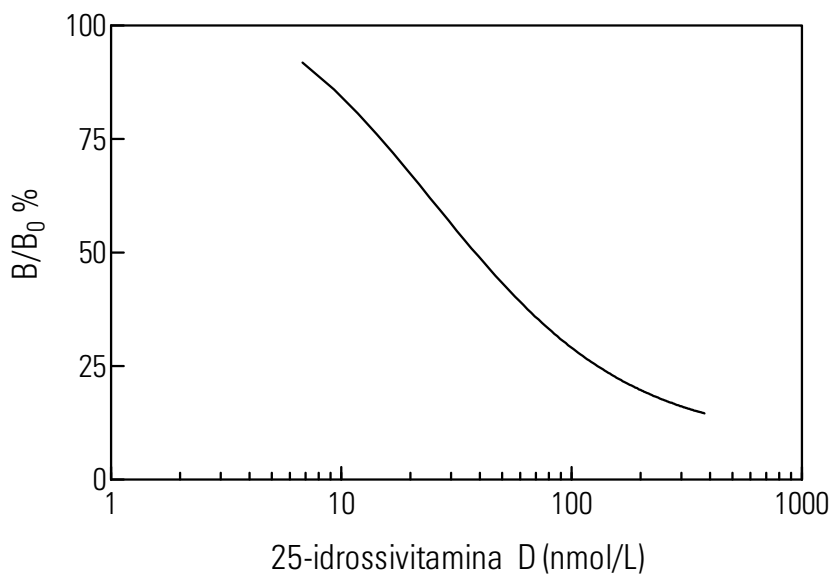
### Dati esemplificativi del dosaggio

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

Pozzetto	Descrizione	Ass.	Ass. media	B/Bo%	Risultato nmol/L
A1, A2	Standard 0 0 nmol/L	2,476 2,530	2,503		
B1, B2	Standard 1 6,8 nmol/L	2,313 2,288	2,301	91,9	
C1, C2	Standard 2 14 nmol/L	1,912 1,908	1,910	76,3	
D1, D2	Standard 3 27 nmol/L	1,495 1,499	1,497	59,8	
E1, E2	Standard 4 67 nmol/L	0,919 0,905	0,912	36,4	
F1, F2	Standard 5 179 nmol/L	0,521 0,522	0,522	20,8	
G1, G2	Standard 6 380 nmol/L	0,372 0,368	0,370	14,8	
H1, H2	Campione 1	1,237 1,257	1,247	49,8	39
A3, A4	Campione 2	0,951 0,969	0,960	38,4	62
B3, B4	Campione 3	0,591 0,612	0,602	24,0	138

### Curva di calibrazione tipica

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



### Limitazioni d'uso

1. Qualora si sospetti che i campioni contengano concentrazioni di analita superiori a quelle dello standard, sarà necessario diluirli.
2. I risultati vanno interpretati unitamente ai dati clinici presenti nella cartella del paziente e ad altre informazioni a disposizione del medico.
3. Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
4. In rari casi possono riscontrarsi interferenze causate da titoli estremamente alti di anticorpi antiavidina.
5. Le seguenti sostanze sono state analizzate e non hanno dato adito a interferenze nell'ambito del dosaggio 25-Hydroxy Vitamin D:

Emoglobina testata fino a 1470 mg/dl

Bilirubina testata fino a 513 µmol/l

Lipidi testati fino a 5,6 mmol/l di trigliceridi

### Valori attesi

Ogni laboratorio deve determinare i propri intervalli di riferimento in base alla popolazione locale. I valori consigliati sono i seguenti:

Adulti normali 47,7 - 144 nmol/L (n = 36)

### Caratteristiche del dosaggio

#### Accuratezza

Il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA è stato messo a confronto con un dosaggio radioimmunologico noto per la determinazione quantitativa della 25-idrossivitamina D e di altri metaboliti idrossilati. Una popolazione di 180 campioni, selezionati per rappresentare un vasto spettro di valori di 25-idrossivitamina D [9,3 - 151,2 nmol/l], sono stati analizzati con entrambi i metodi. L'analisi della regressione lineare è stata effettuata sui dati comparativi:

$IDS = 1,01(x) + 0,7$ ; coefficiente di correlazione ( $r$ ) = 0,91

#### Sensibilità

La sensibilità, calcolata come la concentrazione corrispondente alla media meno 2 deviazioni standard di 10 replicati dello standard zero, è risultata 5 nmo/l.

### Precisione

Intra-dosaggio media (nmol/l)	n=10 % CV	Inter- dosaggio media (nmol/l)	n=11 % CV
39,0	5,3	40,3	4,6
67,1	5,6	72,0	6,4
165	6,7	132	8,7

### Recupero

Il recupero è stato valutato aggiungendo ai campioni 25-OH D prima e del dosaggio:

Campioni	Osservato (nmol/l)	Atteso (nmol/l)	Recupero %
A	122	126	97
A	95,6	98,4	97
B	147	141	104
B	123	118	105
		<b>Media</b>	<b>101</b>

### Linearità

La linearità è stata valutata diluendo i campioni con tampone (soluzione salina tamponata al fosfato contenente albumina del siero bovina allo 9%) prima e del dosaggio.

Campioni	Osservato (nmol/l)	Atteso (nmol/l)	% O/A
A	83,9		
A/2	41,0	42,0	98
A/4	20,8	21,0	99
A/8	13,1	10,5	125
B	83,9		
B/2	43,5	42,0	104
B/4	23,1	21,0	110
B/8	10,7	10,5	102
C	104		
C/2	45,9	52,0	88
C/4	22,5	26,0	87
C/8	14,1	13,0	108
		<b>Media</b>	<b>102</b>

### Specificità

La specificità dell'antisiero è stata valutata con i seguenti analiti al 50% di legame dello standard zero.

Analita	Reattività crociata
25-idrossivitamina D <sub>3</sub>	100%
25-idrossivitamina D <sub>2</sub>	75%
24,25-diidrossivitamina D <sub>3</sub>	≥100%
coleciferolo (D <sub>3</sub> )	<0,01%
ergocalciferolo (D <sub>2</sub> )	<0,30%

## Uso previsto

### *Para diagnóstico in vitro*

El kit EIA 25-Hydroxy Vitamin D de IDS es un inmunoensayo enzimático destinado a la determinación cuantitativa de 25-hidroxivitamina D (25-OH D) y otros metabolitos hidroxilados en suero o plasma humanos. El ensayo tiene la finalidad de ayudar al facultativo en la valoración de suficiencia de vitamina D, dentro del contexto de la información clínica y otras pruebas de laboratorio del paciente en poblaciones adultas.

## Resumen y explicación

"Vitamina D" es un término colectivo empleado comúnmente para hacer referencia a un grupo de seco esteroides estrechamente relacionados entre sí. En presencia de luz solar, el 7-dehidrocolesterol, que se encuentra en el interior de las capas epidérmicas de crecimiento activo, sufre la degradación fotolítica del anillo "B" para producir previtamina D<sub>3</sub>, la cual se isomeriza a la vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol). Esta última y la vitamina D<sub>2</sub> (ergocalciferol) pueden obtenerse también por suplemento de la dieta o de un escaso número de alimentos. El metabolismo de la vitamina D<sub>2</sub> se comporta de forma similar al de la vitamina D<sub>3</sub>.

La vitamina D se almacena en el tejido adiposo y entra en el torrente circulatorio ligada a su proteína de unión (VDBP) y a la albúmina. En el hígado, la vitamina D se hidroxila para formar 25-hidroxivitamina D, la cual también circula en forma de complejo con la VDBP. Una pequeña proporción de la 25-OH D sufre una hidroxilación adicional en el riñón, bajo regulación directa de la hormona paratiroidea y las concentraciones de ion calcio, para formar 1,25-dihidroxivitamina D, una hormona calciotrópica biológicamente activa. La hidroxilación y metabolización ulteriores de la vitamina D producen compuestos hidrosolubles que se excretan en poco tiempo.

Ya que la actividad hepática de la vitamina D-25-hidroxilasa no está regulada estrechamente, cualquier cambio en la producción cutánea de vitamina D<sub>3</sub> o la ingesta de vitamina D (D<sub>3</sub> o D<sub>2</sub>) tiene el efecto de alterar los niveles circulantes de 25-OH D<sup>(1)</sup>.

La concentración sérica de 25-OH D está considerada como la medida más fiable para valorar el estado general de la vitamina D, y por ende puede emplearse para determinar si el paciente dispone de un aporte suficiente de ésta<sup>(2)</sup>. Esta valoración puede

ser necesaria en el diagnóstico de pacientes con anomalías en las concentraciones séricas de calcio.

## Descripción del método

El kit EIA 25-Hydroxy Vitamin D de IDS es un inmunoensayo enzimático destinado a la cuantificación de la 25-OH D y otros metabolitos hidroxilados en suero o plasma. Los calibradores, controles y muestras se diluyen con 25-OH D marcada con biotina. Las muestras diluidas son incubadas en pozos de microtitulación, los cuales se recubren con un anticuerpo 25-OH D de cordero, de alta especificidad, durante 2 horas a temperatura ambiente antes de la aspiración y el lavado. Se agrega avidina marcada con enzima (peroxidasa de rábano), y ésta se fija selectivamente a la biotina en complejo; luego de un paso de adicional de lavado, se desarrolla color por intermedio de un substrato cromogénico (TMB). Utilizando un lector de placa de microtitulación, se determinan las absorbencias de las mezclas de la reacción interrumpida, siendo la intensidad cromática desarrollada inversamente proporcional a la concentración de la 25-OH D.

## Advertencias y precauciones

El kit EIA 25-Hydroxy Vitamin D de IDS está diseñado únicamente para diagnóstico in vitro, y no está destinado al uso interno en seres humanos o animales. Este producto debe emplearse siguiendo rigurosamente las instrucciones enunciadas en el prospecto informativo. IDS Limited no se responsabilizará de ninguna pérdida o daño (salvo en los casos requeridos por la ley), independientemente de su causa, que se origine por incumplimiento de las instrucciones provistas.

**PRECAUCIÓN: este kit contiene el material del origen humano y/o animal. Maneje los reactivo del kit como si sea capaz de transmitir un agente infeccioso.**

Los reactivo del kit se deben almacenar, manejar y eliminar tomando las precauciones adecuadas y satisfaciendo las buenas prácticas de laboratorio. Los reactivo del kit deben desecharse de conformidad con los reglamentos locales.

**Suero humano:** Calibradores  y controles

El material humano empleado para preparar este producto dio resultados negativos para el anticuerpo contra el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV I y II), el antígeno de superficie de la hepatitis B y el anticuerpo contra la hepatitis C, al ser analizado con los métodos recomendados por la FDA. Dado que no hay ninguna prueba capaz de ofrecer una garantía

absoluta de la ausencia de agentes patogénicos, los reactivos deben ser manipulados acatando las normas de bioseguridad 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 muéstrela 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 de este kit contienen azida sódica como conservante, la cual puede reaccionar con las cañerías de plomo, cobre o bronce para formar azidas metálicas sumamente explosivas. Al desechar estos reactivos, enjuagar con abundante agua para impedir la acumulación de azidas.

### Ácido clorhídrico 0,5 M

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

R36/38 Irrita los ojos y la piel.

S26 En caso de contacto con los ojos, enjuagarlos inmediatamente con abundante agua y buscar atención médica.

S36/37 Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

### Tetrametilbencidina

El substrato TMB [SUBS] contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina.

R21/22 Tóxico por ingestión y en contacto con la piel.

S36/37 Úsense indumentaria y guantes de protección adecuados.

### Preparación de los reactivos

Calibradores [CAL] y controles [CTRL]: Los calibradores [CAL] y los controles [CTRL] se suministran liofilizados. Reconstituir con 1 ml de agua destilada o desionizada, colocar nuevamente el tapón y dejar reposar por 10-15 minutos a temperatura ambiente. Voltar varias veces para procurar una reconstitución completa. Conservar a 2-8 °C.

**Solución 25-D Biotin** [25-D BIOTIN] [SOLN]: El concentrado 25-D Biotin [25-D BIOTIN] [50x] se suministra liofilizado. Añadir 3 ml de tampón [BUF] al

frasco de concentrado 25-D Biotin liofilizado [25-D BIOTIN] [50x] (color azul). Colocar nuevamente el tapón y dejar reposar por 10-15 minutos a temperatura ambiente. Voltar varias veces para procurar una reconstitución completa. Añadir el concentrado 25-D Biotin [25-D BIOTIN] [50x] (3 ml) nuevamente al frasco que contiene el tampón remanente [BUF]. Mezclar bien por inversión. La solución 25-D Biotin (50 ml) es de color verde. Rotular el frasco como "solución 25-D Biotin". Conservar a 2-8 °C.

**Solución de lavado** [WASHBUF] [SOLN]: Añadir el contenido de cada frasco de concentrado para lavado [WASHBUF] [20x] a 950 ml de agua destilada o desionizada y mezclar. Conservar a temperatura ambiente.

Todos los demás reactivos se suministran listos para usarse.

Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes del uso.

Es preciso homogeneizar los reactivos invirtiéndolos varias veces antes de emplearlos en el ensayo.

### Duración y conservación de los reactivos

Si se conserva según las especificaciones, este kit es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Al recibirlo, conservar todos los reactivos entre 2 y 8 °C.

Los calibradores [CAL], controles [CTRL] y la solución 25-D Biotin [25-D BIOTIN] [SOLN], una vez reconstituidos, pueden conservarse a 2-8 °C hasta por 8 semanas.

Las tiras inutilizadas de la placa recubierta de anticuerpos [MICROPLAT] deben ponerse de vuelta en la bolsa metálica que contiene el desecante. Plegar el extremo de la bolsa metálica y sellarla con una de las bolsas plásticas autosellantes suministradas. Conservar a 2-8 °C hasta por 8 semanas.

La solución de lavado [WASHBUF] [SOLN] puede conservarse a temperatura ambiente hasta por 8 semanas.

### Indicaciones de posible deterioro de los reactivos del kit

Presencia de partículas anormales en alguno de los reactivos.

Disminución de la absorbencia del calibrador "0".

Desplazamiento en la pendiente de la curva respecto a su posición normal.

## Recogida y conservación de las muestras

El ensayo debe realizarse en muestras de suero o plasma (tratadas con EDTA o heparina). Las muestras deberán separarse lo antes posible después de su recogida; para conservación a largo plazo, almacenarlas a -20 oC. Evitar los ciclos de congelación y descongelación de las muestras.

## Procedimiento

### Materiales suministrados

- CAL 0 - 6 – Calibradores**  
(REF AC-5701A - AC-5701G):  
Suero humano tamponado liofilizado que contiene 25-hidroxivitamina D y azida sódica al <1% (0,09 % reconstituido). El valor exacto de cada calibrador está indicado en la etiqueta del vial; 1 ml por frasco, 7 frascos por kit.
- MICROPLAT - Placa recubierta de anticuerpos**  
(REF AC-5702W):  
Microplaca con anticuerpo policlonal 25-hidroxivitamina D de cordero pegado a la superficie interna de los pozos de poliestireno, tiras de pozo de 12 x 8 en una bolsa metálica con desecante.
- 25-D BIOTIN 50x - Concentrado 25-D Biotin**  
(REF AC-5703):  
Tampón liofilizado que contiene 25-hidroxivitamina D marcada con biotina, y estabilizantes patentados, 1 ml por frasco. 1 (F1) o 2 (F2) frascos por kit.
- BUF - Buffer**  
(REF AC-5703B):  
Reactivo patentado utilizado para disociar el 25-hidroxivitamina D de proteínas de unión, 50 ml por frasco. 1 (F1) o 2 (F2) frascos por kit.
- ENZYMCONJ - Enzima conjugado**  
(REF AC-5704):  
Suero tamponado con fosfato que contiene avidina marcada con peroxidasa de rábano, proteína, estabilizadores de enzima y conservante. 22 ml por frasco. 1 (F1) o 2 (F2) frascos por kit.
- CTRL 1 - 2 – Controles**  
(REF AC-5705A - AC-5705B):  
Suero humano liofilizado que contiene 25-hidroxivitamina D y azida sódica al <1% (0,09 % reconstituido); 1 ml por frasco, 2 frascos por kit.

- SUBS - Substrato TMB**

(REF AC-SUBS):

Preparación acuosa patentada de tetrametilbencidina (TMB) y peróxido de hidrógeno, 28 ml por frasco. 1 (F1) o 2 (F2) frascos por kit.

- HCL - Solución de parada**

(REF AC-STOP):

Ácido clorhídrico 0,5 M, 13 ml por frasco. 1 (F1) o 2 (F2) frascos por kit.

- WASHBUF 20x - Concentrado para lavado**

(REF AC-WASHL):

Suero tamponado con fosfato que contiene Tween, 50 ml por frasco.

- Sellador de la placa adhesiva**

8 por kit.

- Documentación**

Prospecto e informe de CC.

### Materiales necesarios que no se suministran

- Tubos desechables de vidrio de borosilicato o polipropileno, 12 x 75 mm.  
*Nota: los tubos de poliestireno no son adecuados. No reutilizar los tubos.*
- Micropipetas de alta precisión capaces de suministrar 25 µl y 200 µl.
- Pipeta multicanal para suministrar 1 ml, por ej., Eppendorf Multipipette 4780 o un equipo similar.
- Pipetas multicanal de alta precisión para suministrar 100 µl y 200 µl.
- Agitador vórtex.
- Lavador de microplacas automático (opcional).
- Lector fotométrico de microplaca y equipo de análisis de datos.

## Procedimiento de ensayo

Reconstituir o preparar los reactivos siguiendo las instrucciones de la sección "Preparación de los reactivos".

1. Preparar y etiquetar un tubo de vidrio de borosilicato o polipropileno por cada calibrador [CAL], control [CTRL] y muestra [SPE] a analizar.
2. Añadir **25 µl** de calibrador [CAL], control [CTRL] o muestra a analizar a los tubos con la etiqueta correspondiente.
3. Añadir **1 ml** de solución 25-D Biotin [25-D BIOTIN] [SOLN] a todos los tubos. Agitar en vórtex a fondo durante 10 segundos.
4. Añadir **200 µl** de cada muestra a analizar, calibrador o control diluido a los pozos apropiados de la placa recubierta de anticuerpos [MICROPLAT] en duplicado.  
Cubrir la placa con un sellador de placas adhesivo. Incubar a 18-25 °C durante 2 horas.
5. Lavar todos los pozos tres veces con solución de lavado [WASHBUF] [SOLN].
  - a) Lavado de placas automático: Preparar el lavador de placas para que suministre al menos 300 µl de solución de lavado [WASHBUF] [SOLN] por pozo. Llenar y aspirar durante 3 ciclos.
  - b) Lavado manual: Voltar completamente para decantar el contenido de los pozos. Suministrar 250 µl de solución de lavado [WASHBUF] [SOLN] a todos los pozos. Decantar y repetir dos veces.

Apretar firmemente la placa invertida con papel absorbente a fin de eliminar el exceso de solución de lavado [WASHBUF] [SOLN] antes de seguir al paso siguiente.
6. Añadir **200 µl** de enzima conjugado [ENZYMCONJ] a todos los pozos utilizando una pipeta multicanal.  
Cubrir la placa con un sellador de placas adhesivo. Incubar a 18-25 °C por 30 minutos.
7. Repetir el paso de lavado (n.º 5).
8. Añadir **200 µl** de sustrato TMB [SUBS] a todos los pozos utilizando una pipeta multicanal.
9. Cubrir la placa con un sellador de placas adhesivo. Incubar a 18-25 °C por 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.*

10. Añadir **100 µl** de solución de parada [HCL] a todos los pozos utilizando una pipeta multicanal.
11. Medir la absorbencia de cada pozo a 450 nm (referencia: 650 nm) utilizando un lector de microplaca no más de 30 minutos después de añadir la solución de parada.

## Calibración

Los calibradores 25-OH D se han estandarizado mediante cuantificación U.V.

## Control de calidad

Se recomienda el uso sistemático de muestras de control a diversas concentraciones del analito, para validar los resultados diarios. Se suministran dos controles en el kit, los cuales deben tratarse como si fueran muestras desconocidas. Se deben conservar los resultados del control de calidad para observar el rendimiento del ensayo.

## Cálculo de los resultados

Calcular el porcentaje de unión (B/Bo %) de cada calibrador, control y muestra de la manera siguiente:

$$B/Bo\% = \frac{\text{(promedio de absorbencia)}}{\text{(promedio de absorbencia para "0")}} \times 100$$

Preparar una curva estándar en papel gráfico semilogarítmico, representando en el eje de ordenadas B/Bo % y en el eje de las abscisas la concentración de 25-hidroxivitamina D. Calcular B/Bo % para cada muestra y leer los valores interpolándolos de la curva en nmol/l (nM). Pueden emplearse técnicas alternativas de cálculo de datos, pero en ese caso los usuarios deberán confirmar que el ajuste de la curva seleccionada es el correcto y da resultados aceptables. Se recomienda aplicar ajustes de curva suavizada SPLINE o 4PL.

Conversión de unidades:

$$\begin{array}{ccc} & X 0,40 \Rightarrow & \\ X \text{ nmol/l} & & \text{Yng/ml} \\ & \Leftarrow x 2,5 & \end{array}$$

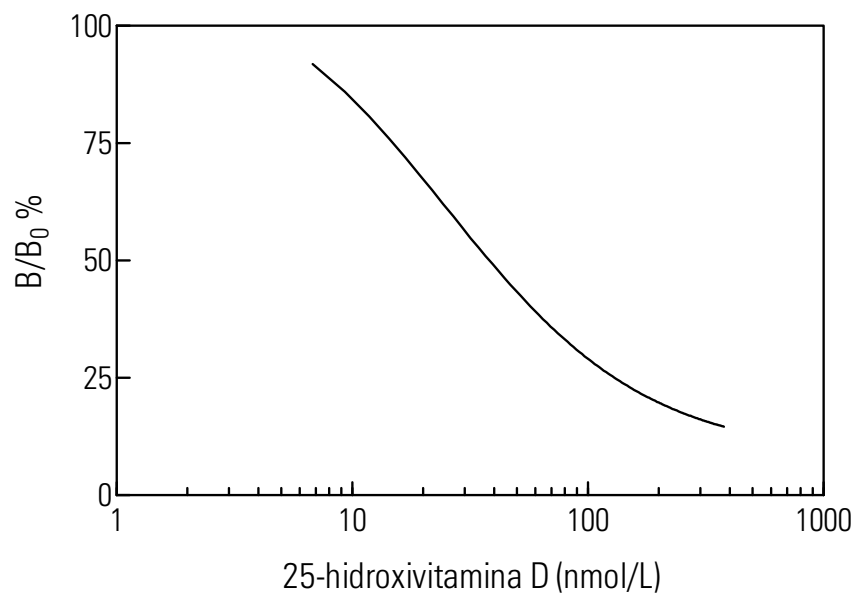
### Ejemplo de datos de un ensayo

Estos datos son meramente ilustrativos y no deben utilizarse para el cálculo de ningún resultado de muestras.

Pozo	Descripción	Abs.	Abs. Media	B/Bo%	Resultado (nmol/L)
A1, A2	Calibrador 0 0 nmol/L	2,476 2,530	2,503		
B1, B2	Calibrador 1 6.8 nmol/L	2,313 2,288	2,301	91,9	
C1, C2	Calibrador 2 14 nmol/L	1,912 1,908	1,910	76,3	
D1, D2	Calibrador 3 27 nmol/L	1,495 1,499	1,497	59,8	
E1, E2	Calibrador 4 67 nmol/L	0,919 0,905	0,912	36,4	
F1, F2	Calibrador 5 179 nmol/L	0,521 0,522	0,522	20,8	
G1, G2	Calibrador 6 380 nmol/L	0,372 0,368	0,370	14,8	
H1, H2	Muestra 1	1,237 1,257	1,247	49,8	39
A3, A4	Muestra 2	0,951 0,969	0,960	38,4	62
B3, B4	Muestra 3	0,591 0,612	0,602	24,0	138

### Curva de calibración típica

Esta curva de calibración es un ejemplo meramente ilustrativo.



### Limitaciones de uso

1. Las muestras que parezcan contener concentraciones del analito superiores al estándar más elevado deben diluirse.
2. Al igual que en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados deben interpretarse en el contexto del cuadro clínico del paciente y demás información disponible al facultativo.
3. No se han establecido las características de rendimiento de este ensayo en una población pediátrica.
4. En casos aislados pueden presentarse interferencias por títulos extremadamente altos de anticuerpos contra la avidina.
5. Se ha verificado que las sustancias siguientes no interfieren en el ensayo 25-Hydroxy Vitamin D:

Hemoglobina verificada hasta 1470 mg/dl  
Bilirrubina verificada hasta 513 µmol/l  
Lípidos verificados hasta 5,6 mmol/l de triglicéridos

### Valores esperados

Utilizando el kit EIA 25-Hydroxy Vitamin D de IDS para determinar el siguiente intervalo, que se suministra únicamente como guía. Cada laboratorio debe determinar los intervalos de normalidad apropiados para su población local.

Adultos normales 47,7 - 144 nmol/L (n = 36)

### Datos de funcionamiento

#### Exactitud

Se comparó el kit EIA 25-Hydroxy Vitamin D de IDS con un radioinmunoensayo reconocido para la determinación cuantitativa de 25-hidroxivitamina D y otros metabolitos hidroxilados. Se ensayó con cada método a una población de 180 muestras, seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de 25-hidroxivitamina D (9,3 - 151,2 nmol/l). Se aplicó el análisis de regresión lineal a los datos comparativos, obteniéndose los siguientes resultados:

IDS = 1,01(x) + 0,7; coeficiente de correlación (r) = 0,91

#### Sensibilidad

La sensibilidad, definida como la concentración correspondiente a la media menos 2 desviaciones estándar de 10 repeticiones del calibrador cero, es 5 nmol/l.

### Precisión

Media intraensayo (nmol/l)		Media interensayo (nmol/l)	
n=10	% CV	n=11	% CV
39,0	5,3	40,3	4,6
67,1	5,6	72,0	6,4
165	6,7	132	8,7

### Recuperación

Se determinó la recuperación añadiendo 25-OH D a las muestras antes de su ensayo.

Muestra	Medida (nmol/l)	Esperada (nmol/l)	Recuperación %
A	122	126	97
A	95,6	98,4	97
B	147	141	104
B	123	118	105
	<b>Media</b>		<b>101</b>

### Linealidad

Se determinó la linealidad diluyendo muestras con tampón (suero tamponado con fosfato que contiene la albúmina de suero bovina al 9%) antes de su ensayo.

Muestra	Medida (nmol/l)	Esperada (nmol/l)	% M/E
A	83,9		
A/2	41,0	42,0	98
A/4	20,8	21,0	99
A/8	13,1	10,5	125
B	83,9		
B/2	43,5	42,0	104
B/4	23,1	21,0	110
B/8	10,7	10,5	102
C	104		
C/2	45,9	52,0	88
C/4	22,5	26,0	87
C/8	14,1	13,0	108
	<b>Media</b>		<b>102</b>

### Especificidad

Se determinó la especificidad del antisuero con los siguientes analitos, a un nivel de unión del 50 % con el calibrador cero.

Analito	Reactividad cruzada
25-hidroxivitamina D <sub>3</sub>	100 %
25-hidroxivitamina D <sub>2</sub>	75 %
24,25-dihidroxivitamina D <sub>3</sub>	≥ 100 %
Colecalciferol (D <sub>3</sub> )	< 0,01 %
Ergocalciferol (D <sub>2</sub> )	< 0,30 %











**References • Bibliographie • Literatur •  
Riferimenti bibliografici • Bibliografía**

1. Reichel, H., Koeffler, H.P., Norman, A.W. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. N. Engl. J. Med. 320: 981-991. (1989)
2. Holick, M.F., Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc., In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research., 3rd Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 74-81. (1996).

Doc: AC-57PL-A  
Issue: 7  
09 March 2009



	<p>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></p>		<p>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></p>
	<p>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></p>		<p>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></p>
	<p>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></p>		<p>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>Zdravotnícka 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></p>
	<p>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>Przestrzeżać zakresu temperatury</i></p>		<p>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></p>

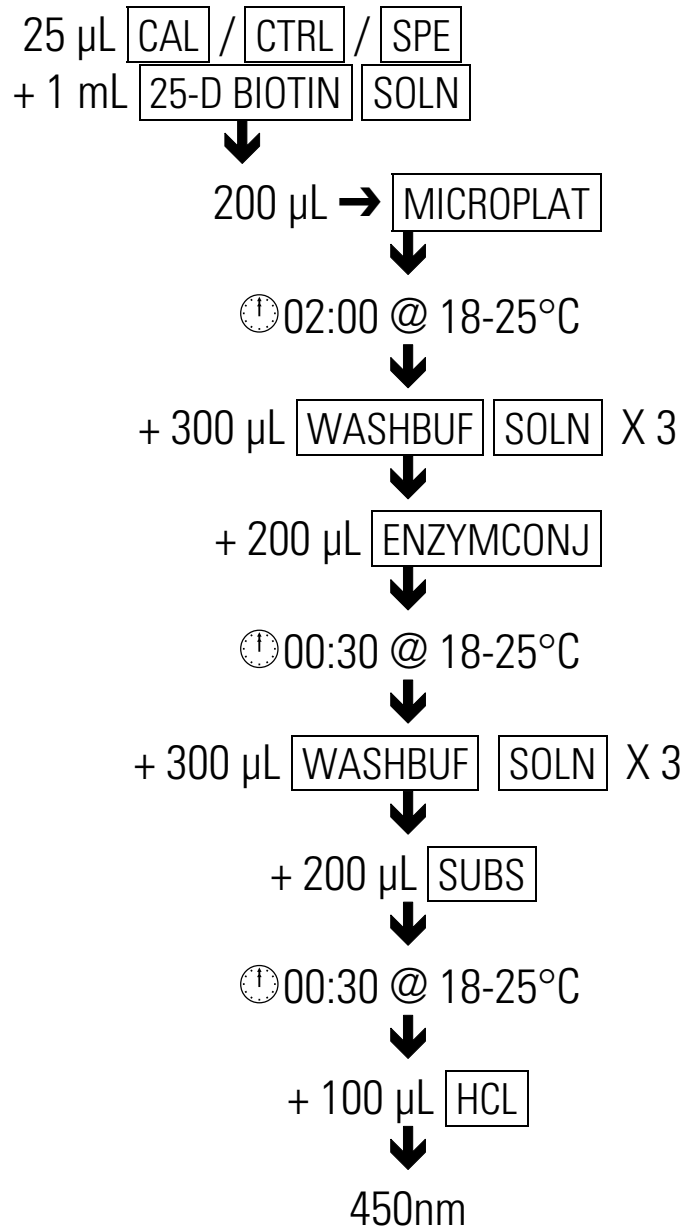
## Procedure Summary

## Résumé du procédé

## Zusammenfassung des Testablaufes

## Procedura

## Resumen del procedimiento



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