



IVD

CE

1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA

KAP1921

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of 1,25(OH)₂ Vitamin D in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA
- B. **Catalog number :** KAP1921 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

Vitamin D is mainly synthesized in the skin from 7-dehydrocholesterol and is partially from dietary and supplementation origin. In the liver, Vitamin D is hydroxylated on carbon 25 to produce the intermediate 25OH Vitamin D. 25OH Vitamin D is further metabolized before it can carry out the functions of Vitamin D on intestine, kidneys, bone and other organs and tissues. This subsequent reaction takes place in the kidneys and in other tissues. Thus 25OH Vitamin D is further hydroxylated in the 1 α -position to produce 1 α ,25-dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂ Vitamin D). In addition to the above-mentioned tissues, placenta of pregnant women and macrophage cells in case of sarcoidosis can also produce some amount of 1,25(OH)₂ Vitamin D.

1,25(OH)₂ Vitamin D is the active form of Vitamin D with regard to the known functions whereas 25OH Vitamin D and Vitamin D itself can be excluded as being physiologically functional. 1,25(OH)₂ Vitamin D stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus. It also stimulates bone resorption and mineralization thereby preventing the development of rickets and osteomalacia.

1,25(OH)₂ Vitamin D is also active in other tissues responsible for Calcium transport (placenta, kidney, mammary gland,...) and endocrine glands such as parathyroid glands. 1,25(OH)₂ Vitamin D is rapidly metabolized and its half-life is approximately 12h in plasma. Its main metabolite is calcitric acid, a C-23 carboxylic derivative, essentially without any biological activity. In addition to this pathway, 1,25(OH)₂ Vitamin D undergoes 24-hydroxylation to produce 1,24,25-trihydroxyvitamin D. This compound has less biological activity than its parent and this metabolic route is considered as a minor pathway.

The levels of 1,25(OH)₂ Vitamin D in plasma or serum is 100 to 1000 less than that of 25OH Vitamin D. Due to its low concentrations and the presence of many similar metabolites, the measurement of 1,25(OH)₂ Vitamin D requires extraction and separation by chromatography.

B. Clinical application

The measurement of circulating 1,25(OH)₂ Vitamin D is indicated in several disorders affecting calcium metabolism such as : phosphate diabetes, sarcoidosis, renal failure, hyper and hypo-parathyroidism, rickets, tumor-associated hypercalcemia, hypercalciuria, Vitamin-resistant dysfunction and treatment with anti-convulsive medication.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

Only samples and controls, not the calibrators, are extracted with a mixture of solvents and applied on cartridges to separate 1,25(OH)₂ Vitamin D from the other Vitamin D metabolites. After elution of the 1,25(OH)₂ Vitamin D from the samples and controls cartridges, the calibrators, eluted samples and eluted controls are incubated directly in microtiterplate coated with anti-1,25(OH)₂ Vitamin D antibodies.


After an overnight incubation at 4°C, the microtiter plate is washed and the working conjugate solution is added and incubated for 1 hour at 4°C.

The microtiterplate is then washed to stop the competition reaction. The Chromogenic solution (TMB) is added and incubated for 15 minutes at room temperature (18°C to 25°C). The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is read at the appropriate wavelength.

The amount of 1,25(OH)₂ Vitamin D is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is inversely proportional to the 1,25(OH)₂ Vitamin D concentration.

A calibration curve is plotted and the 1,25(OH)₂ Vitamin D concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Reconstitution			
 Microtiterplate with 96 breakable wells coated with anti-1,25(OH) ₂ Vitamin D antibodies	96 wells	Ready for use			
<table border="1" data-bbox="49 846 225 884"><tr><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table> 1,25(OH) ₂ Vitamin D Concentrated Conjugate	CONJ	CONC	1 vial 1 mL	Dilute 40 x with conjugate buffer	
CONJ	CONC				
<table border="1" data-bbox="49 967 245 1005"><tr><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> Concentrated HRP	HRP	CONC	1 vial 0.2 mL	Dilute 200 x with conjugate buffer	
HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="97 1070 233 1108"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators - N = 0 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with bovine casein and gentamycin	CAL	N	6 vials lyophilised	Add 1 mL distilled water	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="49 1234 355 1272"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 mL	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer)
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="76 1346 244 1384"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls - N = 1 or 2 in human plasma with gentamycin	CONTROL	N	2 vials lyophilised	Add 3 mL distilled water	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="76 1469 225 1507"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubation Buffer with proclin	INC	BUF	1 vial 20 mL	Ready for use	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="76 1563 240 1601"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Conjugate Buffer with casein and proclin	CONJ	BUF	1 vial 30 mL	Ready for use	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="49 1686 256 1724"><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table> Elution Solution: contains methanol	ELU	SOLN	1 vial 30 mL	Ready for use	
ELU	SOLN				
<table border="1" data-bbox="76 1832 300 1870"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)	CHROM	TMB	1 vial 25 mL	Ready for use	
CHROM	TMB				
<table border="1" data-bbox="76 1955 252 1993"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Stop solution HCl 1.5 N	STOP	SOLN	1 vial 12 mL	Ready for use	
STOP	SOLN				

<table border="1" data-bbox="938 174 1158 212"><tr><td>PLATE</td><td>COVER</td></tr></table> Adhesive Strips	PLATE	COVER	4	
PLATE	COVER			
<table border="1" data-bbox="975 264 1062 302"><tr><td>GEL</td></tr></table> Silica cartridges	GEL	42	Store at R.T.	
GEL				

Note : Use the Calibrator 0 for dilution of samples with values above the highest calibrator (dilute before extraction step).

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- Distilled water
 - Diisopropylether ("for analysis"; GC purity ≥ 99%)
 - Cyclohexane ("for analysis"; GC purity ≥ 99.5 %)
 - Ethyl acetate("for analysis"; GC purity ≥ 99.5 %)
 - Ethanol absolute ("for analysis"; GC purity ≥ 99.9 %)
 - Dichloromethane ("for analysis"; GC purity ≥ 99.8 %)
- NB : A DIAsource extraction kit containing all these solvents is available under the reference #3019700. This kit contains quantities of solvents necessary to extract the controls and samples, for 2 kits of 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA, in duplicate measurements.
- Pipettes for delivery of: 50µL, 100µL, 150µL, 200 µL, 1mL and 3 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
 - Glass tubes (12 x 75 mm) for extraction and for elution (closed with a cap for the extraction step).
 - Glass tubes (16 x 100 mm) or (12 x 120 mm), or polypropylene tubes (falcon 2097), for the washing of the cartridges.
 - Vortex mixer
 - Magnetic stirrer
 - Centrifuge operating at 800 g
 - Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 (bichromatic reading)

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 1mL distilled water.
- Controls:** Reconstitute the controls with 3mL distilled water, **carefully to avoid overflow.**

C. Working HRP conjugate solution:

! The working HRP conjugate solution is to be prepared during the incubation and minimum 1h before its use (cf X.III).

Prepare an adequate volume of working HRP conjugate solution by mixing the 3 reagents in the following sequence : (1) Conjugate buffer, (2) Concentrated Conjugate, (3) Vortex, (4) Concentrated HRP, (5) Vortex. **The order of addition of those 3 reagents is critical and should be rigorously respected to get reproducible Optical Densities.**

Prepare the solution according to the number of used strips, as indicated in the below table: for example for 6 strips (48 wells): 250 µl of concentrated conjugate and 50 µl of concentrated HRP to 10 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize.

Until its use, keep the working HRP conjugate at room temperature and avoid direct sunlight or use a brown glass vial for its preparation.

The preparation of working HRP conjugate is not stable and must be discarded if not used.

Nb of strips	Volume of Conjugate Buffer (mL)	Volume of Concentrated Conjugate (µL)	Volume of Concentrated HRP (µL)
1	3	75	15
2	5	125	25
3	6	150	30
4	8	200	40
5	9	225	45
6	10	250	50
7	12	300	60
8	14	350	70
9	16	400	80
10	18	450	90
11	20	500	100
12	22	550	110

- D. Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- E. Extraction solvent:** 2 ml for each control or sample to be tested are needed. **Prepare a fresh solution** of diisopropylether, cyclohexane and ethyl acetate: 50/40/10 volume/volume) according to the number of extractions, as indicated in the table below.
Be careful : the exact proportion of each solvents has to be strictly respected.

Nb of extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	9.2	7.4	1.8
16	18.4	14.7	3.7
42	48.3	38.6	9.4

*Patient samples and controls

- F. Washing solvent :** 1 ml for each control or sample to be tested is needed. **Prepare a fresh solution** of diisopropylether, cyclohexane, ethyl acetate and ethanol absolute (50/40/10/1 volume/volume) according to the number of extractions, as indicated in the table below.
Be careful : the exact proportion of each solvents has to be strictly respected.

Nb of extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)	Ethanol (µl)
1	0.6	0.5	0.1	11
8	4.6	3.7	0.9	92
16	9.2	7.4	1.8	184
42	24.1	19.3	4.8	483

*Patient samples and controls

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C; **except the cartridges which must be stored at room temperature (18°C to 25°C).**
- After their reconstitution, **calibrators** are stable for 4 weeks at 2-8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for 4 months maximum. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- After their reconstitution, **controls** are stable for 3 days at 2-8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for 1 month maximum. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its use, discard working HRP conjugate.
- **Use freshly prepared extraction solvent and washing solvent, do not store them.**
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- The kit is suitable for serum samples.
- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, storage in aliquots, at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- After thawing, the samples should be vortexed and centrifuged.

X. PROCEDURE

Attention: Performance of the kit was defined based on samples tested in duplicate, it is thus important to use the kit as recommended in the IFU. For this reason, the amount of cartridges provided in the kit is only sufficient to perform the extraction for a duplicate determination of the patient samples.

- I. Extraction step : ! Only for controls and samples !**
1. Label glass tubes (12x75 mm) for extraction: 2 controls and up to 40 samples.
 2. Add 0.5mL control or sample in the respective tubes.
 3. Dispense 2mL extraction solvent in each tube.
 4. Tubes are closed with a cap and placed on a shaker for 1 hour at 1200 rpm.

5. Centrifuge each tube for 5 minutes at room temperature (18°C – 25°C at 800 g).
6. Supernatants are needed for the next step of separation.

II. Separation step : ! Only for controls and samples !

1. Label glass tubes (16 x 100 mm) or (12 x 120 mm), or polypropylene tubes (falcon 2097), for washing cartridges: 2 controls and up to 40 samples.
2. Put one silica cartridge in each tube.
3. Apply 1.6mL of supernatant (2 x 0.8mL), obtained after extraction step, on cartridge. Let draw by gravity.
4. Wash cartridges with 1mL washing solvent (cf: reagent preparation).
! Be careful: never apply vacuum on cartridges, just let solvent draw by gravity.
5. Add 500µL dichloromethane on each cartridge, let draw by gravity.
6. Add 500µL of distilled water on each cartridge and centrifuge each tube for 5 minutes at room temperature (18°C – 25°C at 800 g).
7. Label glass tubes (12 x 75 mm) for elution of 1,25(OH)₂ Vitamin D. After centrifugation, transfer cartridges in the corresponding glass tubes.
8. Apply 300µL elution solution on each cartridge to elute 1,25(OH)₂ Vitamin D and centrifuge for 5 minutes at room temperature (18°C – 25°C at 800 g).
9. **Vortex** the eluted fraction.

Note : After this step, samples must be incubated in coated microtiterplate immediately to avoid degradation.

III. Incubation step :

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Vortex briefly reconstituted calibrators, extracted controls and extracted samples.
4. Pipette 150µL of Incubation Buffer into all wells.
5. Pipette 50µL of each Calibrator (not extracted), eluted controls and eluted samples into the appropriate wells.
6. Incubate for 18±2 hours, at 2-8°C. Cover the plate with a lid or a sealing film.

Prepare the Working HRP conjugate solution 60 min +/- 15 min before washing the wells after the overnight incubation.

7. Aspirate the liquid from each well.
Wash the plate 3 times by:
 - dispensing 0.35mL of Wash Solution into each well and
 - aspirating the content of each well
8. Pipette 200µL of Working HRP conjugate solution into each well.
9. Incubate for 1 hour at 4°C. Cover the plate with a lid or a sealing film.
10. Aspirate the liquid from each well.
Wash the plate 3 times by:
 - dispensing 0.35 ml of Wash Solution into each well and
 - aspirating the content of each well
11. Pipette 200µL of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
12. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature (18°C to 25°C), avoid direct sunlight.
13. Pipette 100µL Stop Solution into each well.
14. Read absorbances at 450 nm (reference filter 630nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
2. Calculate the mean of duplicate determinations.
3. We recommend the use of computer assisted methods to construct the calibration curve. 4-parameter logistic function curve fitting is the preferred method. Reject obvious outliers.
4. By interpolation of the sample OD values, determine the 1,25(OH)₂ Vitamin D concentrations of the samples from the calibration curve.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

1,25(OH) ₂ Vitamin D ELISA	OD units
Calibrator :	
0 pg/mL	2.93
3 pg/mL	2.52
12 pg/mL	1.85
50 pg/mL	1.11
120 pg/mL	0.57
180 pg/mL	0.36

Note : 1 pg/mL = 2.4 pmol/L

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average OD at zero binding, was 0.8 pg/mL.

B. Specificity

Cross reactivity of the 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA assay was determined by testing sera with spiked and unspiked cross reactants. The results are summarized in the following table:

Compound and concentration	Cross-Reactivity (%)
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D3at 200 pg/mL	114
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D2 at 200 pg/mL	108
25OH-Vitamin-D3at 1µg /mL	0.004
25OH-Vitamin-D2 at 1µg /mL	0.0003
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D3 at 200 ng/mL	0.03
25,26(OH) ₂ -Vitamin.D3 at 400ng/mL	0.02

The effect of potential interfering substances on samples using the DIAsource 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA test was evaluated. Different levels of Hemoglobin, Bilirubin (conjugated and unconjugated), Triglyceride and Vitamin C in serum samples were tested on samples with different 1,25(OH)₂ Vitamin D Concentration. Our acceptance criteria was to have interference of less than 15%. The tested substances did not affect the performance of the DIAsource 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA.

Substance	1,25(OH) ₂ VitaminD (pg/mL)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Mean % Variation
Hemoglobin	31.8	250	5.0%
		500	
	186.5	250	
		500	
Bilirubin Conjugated	31.8	50	-12.3%
	186.5	50	
Bilirubin Unconjugated	31.8	50	-0.4%
		100	
	186.5	50	
Triglyceride	31.8	50	-1.0%
		100	
		250	
	186.5	50	
		100	
Vitamin C	31.8	100	4.9%
		1000	
	186.5	100	
		1000	

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

Sample	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)	Sample	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV (%)
A	13	18.3 ± 2.5	13.9	A	13	26.7 ± 3.5	13.2
B	13	168.9 ± 8.4	5.0	B	13	83.4 ± 14.6	17.5

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

The sample was diluted with Calibrator 0, before extraction step.

DILUTION TEST

Sample Dilution	Theoretical Concentration (pg/mL)	Measured Concentration (pg/mL)	Slope	Y-Intercept	R	Recovery (%)
1/1	118.9	118.9	0.99	1.12	0.99	100
1/2	59.5	60.7				102
1/4	29.7	29.3				99
1/8	14.9	16.6				112

Conversion factor :

From pg/mL to pmol/L : x 2.4

From pmol/L to pg/mL : x 0.42

To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

RECOVERY TEST

Added 1,25(OH) ₂ -Vitamin D (pg/mL)	Recovered 1,25(OH) ₂ -Vitamin D (pg/mL)	Recovered (%)
52.4	54.1	103
104.7	111.1	106
157.1	155.8	99

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Controls which contain azide will interfere with the enzymatic reaction and cannot be used.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises
- It is recommended that Controls be routinely assayed as unknown samples to measure assay variability. The performance of the assay should be monitored with quality control charts of the controls. It is good practise to check visually the curve fit selected by the computer

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

Normal samples tested with DIAsource Elisa assay were measured between 19.3 and 53.8 pg/ml.

Patients with renal failure (n = 20) were measured < 6,9 pg/ml.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported.

Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987). **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763.
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124.
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79.
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403.
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193.
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983.
7. Pike J.W., Lee S.M., Meyer M.B. (2014). **Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in bone cells: exploiting new approaches and defining new mechanisms.** BoneKEy Reports, 3:482.
8. Hollis B.W. (2010). **Assessment and Interpretation of Circulating 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D in the Clinical Environment.** Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 39(2): 271–contents.

XVIII.

SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS μL	SAMPLE(S) CONTROLS μL
<u>EXTRACTION</u> <i>Calibrators</i> <i>Samples / Controls</i> <i>Extraction solvent</i>	- - -	- 500 2000
<i>Shaking</i> <i>Centrifugation</i>	1 hour at 1200 rpm 5 minutes at 800 g	
<u>SEPARATION</u> <i>Supernatant from extraction step</i>	-	1600
<u>CARTRIDGE</u> <i>Supernatant</i> <i>Washing Solvent</i> <i>Dichloromethane</i> <i>Distilled water</i> <i>Centrifugation</i> <i>Elution solution</i> <i>Centrifugation</i>	1600μL 1000μL 500μL 500μL 5 minutes at 800 g 300μL 5 minutes at 800 g Vortex	
<u>INCUBATION STEP</u> <u>In microtiterplate</u> <i>Incubation Buffer</i> <i>Calibrators</i> <i>Extracted samples</i>	150μL 50μL -	150μL - 50μL
	Cover the plate with a lid or sealing film Incubate 18 ± 2 h (overnight) at 4°C (2-8°C) Prepare working HRP solution 1 hour before next step Aspirate the contents of each well Wash 3 times with 350μL of Wash Solution and aspirate	
<i>Working HRP Conjugate</i>	200μL	200μL
	Cover the plate with a lid or sealing film and Incubate for 1 hour at 4°C (2-8°C). Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 350 μl of Wash Solution and aspirate.	
<i>TMB</i>	200μL	200μL
	Incubate for 15 min at room temperature (18°C to 25°C).	
<i>Stop Solution</i>	100μL	100μL
	Read on a microtiterplate reader. Record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm).	

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire l'intégralité du protocole avant utilisation.

1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA

I. UTILISATION PRÉVUE

Dosage immuno-enzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 1,25(OH)₂ vitamine D sérique.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Dénomination commerciale :** DIAsource 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA
- B. **Référence :** KAP1921 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
2, Rue du Bosquet, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou des informations sur une commande, contactez :

Tél. : +32 (0) 10 84.99.11

Fax : +32 (0) 10 84.99.91

III. INFORMATIONS CLINIQUES

A. Activités biologiques

La vitamine D est principalement synthétisée par la peau à partir du 7-déhydrocholestérol ; elle est partiellement issue de l'alimentation et des compléments alimentaires. Dans le foie, la vitamine D est hydroxylée sur le carbone 25 pour produire une 25-OH vitamine D intermédiaire. Cette dernière est ensuite métabolisée avant d'assumer les fonctions de la vitamine D dans les intestins, les reins, les os et autres organes et tissus. Cette réaction a lieu dans les reins et d'autres tissus. Ensuite, la 25-OH vitamine D est à nouveau hydroxylée en position 1 α pour produire une 1 α ,25-dihydroxyvitamine D (1,25(OH)₂ vitamine D). Hormis les tissus mentionnés ci-dessus, le placenta chez les femmes enceintes et les macrophages dans les cas de sarcoïdose peuvent également produire quelques quantités de 1,25(OH)₂ vitamine D.

La 1,25(OH)₂ vitamine D est la forme active de la vitamine D pour les fonctions connues alors que la 25-OH vitamine D et la vitamine D elle-même peuvent être considérées comme non fonctionnelles sur le plan physiologique. La 1,25(OH)₂ vitamine D stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Elle stimule également la résorption osseuse et la minéralisation, intervenant ainsi dans la prévention du rachitisme et de l'ostéomalacie.

La 1,25(OH)₂ vitamine D est également active dans d'autres tissus responsables du transport du calcium (placenta, reins, glandes mammaires...) ainsi que dans les glandes endocrines telles que les glandes parathyroïdes. La 1,25(OH)₂ vitamine D est rapidement métabolisée et sa demi-vie plasmatique est d'environ 12 heures. Son principal métabolite est l'acide calcitroïque, un dérivé carboxylique C-23, qui n'a principalement pas d'activité biologique. Outre cette voie, la 1,25(OH)₂ vitamine D subit une 24-hydroxylation pour produire la 1,24,25-trihydroxyvitamine D. Ce composé a une activité moins importante que son ascendant et cette voie métabolique est considérée comme mineure.

Les taux de 1,25(OH)₂ vitamine D dans le plasma ou le sérum sont 100 à 1 000 fois inférieurs à ceux de la 25-OH vitamine D. En raison de cette faible concentration et de la présence de nombreux métabolites similaires, le dosage de la 1,25(OH)₂ vitamine D nécessite des procédures d'extraction et de séparation par chromatographie.

B. Application clinique

Le dosage de la 1,25(OH)₂ vitamine D circulante est indiqué dans plusieurs troubles du métabolisme calcique tels que : diabète phosphaté, sarcoïdose, insuffisance rénale, hyper-parathyroïdie et hypo-parathyroïdie, rachitisme, hypercalcémie liée à une tumeur, hypercalciurie, vitaminorésistance et traitement par anti-épileptique.

IV. PRINCIPES DE LA PROCÉDURE

Seuls les échantillons et les contrôles (pas les étalons) sont extraits à l'aide d'un mélange d'agents solvants, puis appliqués sur des cartouches afin de séparer la 1,25(OH)₂ vitamine D des autres métabolites de la vitamine D. Après élution de la 1,25(OH)₂ vitamine D à partir des cartouches d'échantillons et de contrôles, les étalons ainsi que les échantillons et contrôles élués sont directement incubés dans une plaque de microtitration recouverte d'anticorps anti-1,25(OH)₂ vitamine D.


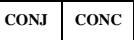
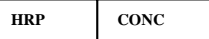
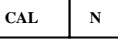


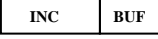
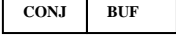

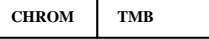
Après une nuit d'incubation à 4 °C, la plaque de microtitration est lavée et la solution de conjugué de travail est ajoutée et placée en incubation pour 1 heure à 4 °C.




La plaque de microtitration est ensuite lavée pour arrêter la réaction de compétition. La solution chromogène (TMB) est ajoutée et placée en incubation pendant 15 minutes à température ambiante (18 °C à 25 °C). La réaction est arrêtée avec l'ajout d'une solution d'arrêt et la plaque de microtitration est lue à la longueur d'onde appropriée.

La quantité de 1,25(OH)₂ vitamine D est déterminée par colorimétrie en mesurant l'absorbance, qui est inversement proportionnelle à la concentration en 1,25(OH)₂ vitamine D.

La courbe d'étalonnage est dessinée et les concentrations en 1,25(OH)₂ vitamine D dans les échantillons sont déterminées par interpolation de la dose sur la courbe d'étalonnage.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Kit de 96 tests	Reconstitution
 Plaque de microtitration composée de 96 puits sécables recouverts d'anticorps anti-1,25(OH) ₂ vitamine D	96 puits	Prêt à l'emploi
 Conjugué de 1,25(OH) ₂ vitamine D Concentré	1 flacon 1 ml	Diluer 40 x avec un tampon de conjugué
 HRP concentrée	1 flacon 0,2 ml	Diluer 200 x avec le tampon de conjugué
 Étalons - N = 0 à 5 (voir les valeurs exactes sur les étiquettes des flacons) dans un tampon de phosphate avec de la caséine bovine et de la gentamicine	6 flacons lyophilisés	Ajouter 1 ml d'eau distillée
 Solution de lavage (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique)
 Contrôles - N = 1 ou 2 dans le plasma humain avec de la gentamicine	2 flacons lyophilisés	Ajouter 3 ml d'eau distillée
 Tampon d'incubation avec Proclin	1 flacon 20 ml	Prêt à l'emploi
 Tampon de conjugué	1 flacon 30 ml	Prêt à l'emploi
 Solution d'élution : contient du méthanol	1 flacon 30 ml	Prêt à l'emploi
 Solution chromogène à la TMB (tétraméthylbenzidine)	1 flacon 25 ml	Prêt à l'emploi

 Solution d'arrêt HCl 1,5 N	1 flacon 12 ml	Prêt à l'emploi
 Bandes adhésives	4	
 Cartouches de silice	42	Stocker à température ambiante (18°C à 25°C)

Remarque :

utiliser l'étalon 0 pour diluer les échantillons ayant des valeurs supérieures à l'étalon le plus élevé (diluer avant la phase d'extraction).

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

Le matériel suivant est requis mais n'est pas fourni dans le kit :

- Eau distillée
 - Di-isopropyléther (« pour analyse » ; pureté (chromatographie gazeuse) ≥ 99 %)
 - Cyclohexane (« pour analyse » ; pureté (chromatographie gazeuse) ≥ 99,5 %)
 - Acétate d'éthyle (« pour analyse » ; pureté (chromatographie gazeuse) ≥ 99,5 %)
 - Éthanol absolu (« pour analyse » ; pureté (chromatographie gazeuse) ≥ 99,9 %)
 - Dichlorométhane (« pour analyse » ; pureté (chromatographie gazeuse) ≥ 99,8 %)
- NB: Un kit d'extraction DIASource contenant ces solvants est disponible sous la référence 3019700. Ce kit contient les quantités de solvants nécessaires à l'extraction des contrôles et des échantillons, pour 2 kits de 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA, en duplicata.
- Pipettes pour : 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 1 ml et 3 ml (l'utilisation de pipettes précises avec embouts jetables en plastique est recommandée)
 - Tubes en verre (12 x 75 mm) pour l'extraction et l'élution (fermés par un bouchon pour la phase d'extraction).
 - Tubes en verre (16 x 100 mm) ou (12 x 120 mm) ou tubes en polypropylène (falcon 2097) pour laver les cartouches.
 - Agitateur-mélangeur vortex
 - Agitateur magnétique
 - Centrifugeuse adaptée pour 800 g
 - Lecteur de plaques de microtitration capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

VII. PRÉPARATION DU RÉACTIF

- Étalons** : reconstituer les étalons avec 1 ml d'eau distillée.
- Contrôles** : reconstituer les contrôles avec 3 ml d'eau distillée, **soigneusement afin d'éviter un débordement.**
- Solution de conjugué HRP de travail** :

! La solution du conjugué HRP de travail doit être préparée pendant l'incubation et au minimum 1h avant son utilisation cf X.III)

Préparer un volume adéquat de la solution du conjugué HRP de travail en mélangeant les 3 réactifs dans l'ordre suivant : (1) le tampon de conjugué, (2) le conjugué concentré, (3) vortex, (4) la HRP concentrée, (5) vortex.

L'ordre d'addition des 3 réactifs dans la préparation de la solution du conjugué HRP de travail est critique et doit être rigoureusement respecté afin de garantir des Densités Optiques reproductibles.

Préparer la solution du conjugué HRP de travail pour le nombre de barrettes utilisées, comme le tableau ci-dessous l'indique: par exemple, pour 6 barrettes (48 puits), 250 µl de conjugué concentré et 50 µl de HRP concentrée pour 10 ml de tampon de conjugué.

Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser.

Laisser le conjugué HRP de travail à température ambiante jusqu'à ce qu'il soit utilisé et éviter les rayons directs du soleil ou utiliser une bouteille en verre brun pour sa préparation.

La préparation du conjugué HRP de travail n'est pas stable et doit être jetée si elle n'est pas utilisée.

Nb de barrettes	Volume de tampon de conjugué (ml)	Volume de conjugué concentré (µl)	Volume de HRP concentrée (µl)
1	3	75	15
2	5	125	25
3	6	150	30
4	8	200	40
5	9	225	45
6	10	250	50
7	12	300	60
8	14	350	70
9	16	400	80
10	18	450	90
11	20	500	100
12	22	550	110

D. Solution de lavage : Préparer un volume approprié de solution de lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de solution de lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser la solution. Jeter la solution de lavage non utilisée en fin de journée.

E. Solvant d'extraction : il est nécessaire d'utiliser 2 ml pour chaque contrôle ou échantillon à tester. **Préparer une solution fraîche** de di-isopropyléther, cyclohexane et acétate d'éthyle (50/40/10 volume/volume) en fonction du nombre d'extractions, comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

Attention : il convient de respecter les proportions exactes pour les volumes.

Nb d'extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	9.2	7.4	1.8
16	18.4	14.7	3.7
42	48.3	38.6	9.4

* Échantillons de patients et contrôles

F. Solvant de lavage : il est nécessaire d'utiliser 1 ml pour chaque contrôle ou échantillon à tester.

Préparer une solution fraîche de di-isopropyléther, cyclohexane, acétate d'éthyle et éthanol absolu (50/40/10/1 volume/volume) en fonction du nombre d'extractions, comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

Attention : il convient de respecter les proportions exactes pour les volumes.

Nb d'extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)	Ethanol (µl)
1	0.6	0.5	0.1	11
8	4.6	3.7	0.9	92
16	9.2	7.4	1.8	184
42	24.1	19.3	4.8	483

* Échantillons de patients et contrôles

VIII. STOCKAGE ET EXPIRATION DES RÉACTIFS

- Avant ouverture ou reconstitution, tous les composants des kits sont stables jusqu'à leur date d'expiration (mentionnée sur la notice) s'ils sont conservés entre 2 et 8 °C, à l'exception des cartouches qui doivent être conservées à température ambiante (18 °C à 25 °C).
- Après reconstitution, les **étalons** restent stables pendant 4 semaines entre 2 et 8 °C. Pour une conservation plus longue, il convient de créer des aliquotes et de les conserver à -20 °C sur un maximum de 4 mois. Éviter les cycles de congélation/décongélation successifs.
- Après reconstitution, les **contrôles** restent stables pendant 3 jours entre 2 et 8 °C. Pour une conservation plus longue, il convient de créer des aliquotes et de les conserver à -20 °C sur un maximum de 1 mois. Éviter les cycles de congélation/décongélation successifs.
- La solution de travail récemment préparée doit être utilisée le jour même.
- Après utilisation, jeter la solution de conjugué HRP de travail.
- **Utiliser les solvants d'extraction et de travail récemment préparés ; ne pas les conserver pour utilisation ultérieure.**

- L'altération de l'apparence physique des réactifs peut indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. RECUEIL ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

- Le kit peut être utilisé avec des échantillons de sérum.
- Les échantillons de sérum doivent être conservés à 28 °C.
- Si le test n'est pas effectué dans les 24 heures, il est recommandé de les conserver sous forme d'aliquotes à -20 °C.
- Éviter les cycles de congélation/décongélation successifs.
- Après décongélation, les échantillons doivent être agités et centrifugés.

X. PROCÉDURE

Attention : Les performances du kit ont été définies sur la base d'échantillons testés en double, il est donc important d'utiliser le kit tel que recommandé dans la notice. Pour cette raison, la quantité de cartouches fournies dans le kit est seulement suffisante pour effectuer l'extraction pour une détermination en double des échantillons de patients.

I. Phase d'extraction : ! Uniquement pour les contrôles et les échantillons !

1. Étiqueter les tubes en verre (12 x 75 mm) pour l'extraction : 2 contrôles et jusqu'à 40 échantillons.
2. Ajouter 0,5 ml de contrôle ou d'échantillon dans les tubes correspondants.
3. Ajouter 2 ml de solvant d'extraction dans chaque tube.
4. Fermer les tubes à l'aide d'un bouchon et les placer dans un agitateur pendant 1 heure à 1 200 tr/min.
5. Centrifuger chaque tube pendant 5 minutes à 18 °C - 25 °C (à 800 g).
6. Les surnageants seront nécessaires à la prochaine phase de séparation.

II. Phase de séparation : ! Uniquement pour les contrôles et les échantillons !

1. Étiqueter les tubes en verre (16 x 100 mm) ou (12 x 120 mm) ou les tubes en polypropylène (falcon 2097) pour laver les cartouches : 2 contrôles et jusqu'à 40 échantillons.
2. Placer une cartouche de silice dans chaque tube.
3. Ajouter 1,6 ml de surnageant (2 x 0,8 ml), obtenu après la phase d'extraction, sur la cartouche. Laisser couler par gravité.
4. Laver les cartouches avec 1 ml de solvant de lavage (voir préparation du réactif).
! Attention : ne jamais appliquer de vide sur les cartouches ; laisser simplement le solvant couler par gravité.
5. Ajouter 500 µl de dichlorométhane sur chaque cartouche et laisser couler par gravité.
6. Ajouter 500 µl d'eau distillée sur chaque cartouche et centrifuger chaque tube pendant 5 minutes à 18 °C - 25 °C (à 800 g).
7. Étiqueter les tubes en verre (12 x 75 mm) pour l'élution de la 1,25(OH)₂ vitamine D. Après centrifugation, transférer les cartouches dans les tubes en verre correspondants.
8. Ajouter 300 µl de solution d'élution sur chaque cartouche pour l'élution de la 1,25(OH)₂ vitamine D et centrifuger pendant 5 minutes à 18°C - 25°C (à 800 g).
9. **Agiter** la fraction éluée au vortex.

Remarque : après cette phase, les échantillons doivent être immédiatement placés en incubation dans une plaque de microtitration pour éviter toute dégradation.

III. Phase d'incubation :

1. Sélectionner le nombre de barrettes requises pour le test. Les bandes non utilisées doivent être remplacées dans leur sac avec le dessiccant et conservées entre 2 et 8 °C.
2. Fixer les barrettes dans leur cadre.
3. Agiter brièvement les étalons reconstitués, ainsi que les contrôles et échantillons extraits.
4. Pipeter 150 µl de tampon d'incubation dans tous les puits.
5. Pipeter 50 µl de chaque étalon (non extrait), des contrôles et échantillons élués dans les puits appropriés.
6. Laisser incuber pendant 18 heures ±2 à une température comprise entre 2 et 8 °C. Recouvrir la plaque d'un couvercle ou d'un film d'étanchéité.

Après incubation d'une nuit, préparer la solution de conjugué HRP de travail 60 minutes +/- 15 minutes avant le lavage des puits.

7. Aspirer le liquide de chaque puits.
Laver la plaque à 3 reprises en :
 - versant 0,35 ml de solution de lavage dans chaque puits et
 - aspirant le contenu de chaque puits.
8. Pipeter 200 µl de solution de conjugué HRP de travail dans chaque puits.
9. Laisser incuber pendant 1 heure à 4 °C. Recouvrir la plaque d'un couvercle ou d'un film d'étanchéité.
10. Aspirer le liquide de chaque puits.
Laver la plaque à 3 reprises en :
 - versant 0,35 ml de solution de lavage dans chaque puits et
 - aspirant le contenu de chaque puits.
11. Pipeter 200 µl de solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes qui suivent la phase de lavage.
12. Laisser incuber la plaque de microtitration pendant 15 minutes à température ambiante (18 °C à 25 °C) : éviter l'exposition à la lumière directe.
13. Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.
14. Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence : 630 nm ou 650 nm) dans l'heure qui suit et calculer les résultats comme décrit dans la section XI.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

1. Lire la plaque à 450 nm par rapport à un filtre de référence à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne des déterminations doubles.
3. Il est recommandé d'utiliser des méthodes informatiques pour établir la courbe d'étalonnage. L'utilisation d'une courbe de fonction logistique à 4 paramètres est la méthode préférée. Rejeter les valeurs aberrantes évidentes.
4. Déterminer les concentrations en 1,25(OH)₂ vitamine D dans les échantillons à partir de la courbe d'étalonnage, par interpolation des valeurs de densité optique des échantillons.

XII. DONNÉES TYPES

Les données suivantes sont uniquement fournies à titre d'exemple et ne doivent jamais être utilisées à la place de la véritable courbe d'étalonnage.

Dosage par technique ELISA de la 1,25(OH) ₂ vitamine D	Unités de densité optique
Étalon :	
0 pg/ml	2,93
3 pg/ml	2,52
12 pg/ml	1,85
50 pg/ml	1,11
120 pg/ml	0,57
180 pg/ml	0,36

Remarque : 1 pg/ml = 2,4 pmol/l

XIII. PERFORMANCES ET LIMITES

A. Limite de détection

Vingt étalons 0 ont été évalués avec un groupe d'autres étalons. La limite de détection, définie par une concentration apparente à deux écarts-types en dessous de la densité optique moyenne à la liaison zéro, était de 0,8 pg/ml.

B. Spécificité

La réactivité croisée du test ELISA de la 1,25(OH)₂ vitamine D a été déterminée en testant des sérums contenant des réactifs croisés (surchargés ou non). Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Composé et concentration	Réactivité croisée (%)
1,25(OH) ₂ -vitamine D3 à 200 pg/ml	114
1,25(OH) ₂ -vitamine D2 à 200 pg/ml	108
25OH-vitamine D3 à 1 µg/ml	0,004
25OH-vitamine D2 à 1 µg/ml	0,0003
24,25(OH) ₂ -vitamine D3 à 200 ng/ml	0,03
25,26(OH) ₂ -vitamine D3 à 400 ng/ml	0,02

L'effet de substances pouvant interférer sur les résultats des tests DIAsource pour le dosage par la technique ELISA de la 1,25(OH)₂ vitamine D a été évalué. Différents taux d'hémoglobine, de bilirubine (conjuguée ou non), de triglycérides et de vitamine C dans les échantillons sériques ont été testés dans les échantillons avec plusieurs concentrations de 1,25(OH)₂ vitamine D. Le critère d'acceptation a été défini par une interférence inférieure à 15 %. Les substances testées n'ont pas modifié les performances du test DIAsource pour le dosage par la technique ELISA de la 1,25(OH)₂ vitamine D.

Substance	1,25(OH) ₂ vitamine D (pg/ml)	Concentration de la substance interférant (mg/dl)	Variation moyenne (%)
Hémoglobine	31,8	250	5,0%
		500	
	186,5	250	
		500	
Bilirubine conjuguée	31,8	50	-12,3 %
	186,5	50	
Bilirubine non conjuguée	31,8	50	-0,4%
		100	
	186,5	50	
		100	
Triglycérides	31,8	50	-1,0%
		100	
		250	
	186,5	50	
		100	
		250	
Vitamine C	31,8	100	4,9%
		1000	
	186,5	100	
		1000	

C. Précision

PRÉCISION INTRA-ESSAI

PRÉCISION INTER-ESSAI

Échantillon	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Échantillon	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	13	18,3 ± 2,5	13,9	A	13	26,7 ± 3,5	13,2
B	13	168,9 ± 8,4	5,0	B	13	83,4 ± 14,6	17,5

SD : écart-type ; CV : coefficient de variation

D. Exactitude

L'échantillon a été dilué à l'aide de l'étalon 0, avant la phase d'extraction.

TEST DE DILUTION

Dilution de l'échantillon	Concentration théorique (pg/ml)	Concentration mesurée (pg/ml)	Pente	Intercept Y	R	Récupération (%)
1/1	118,9	118,9	0,99	1,12	0,99	100
1/2	59,5	60,7				102
1/4	29,7	29,3				99
1/8	14,9	16,6				112

Facteur de conversion :

de pg/ml en pmol/l : x 2,4
de pmol/l en pg/ml : x 0,42

À notre connaissance, aucun matériel de référence internationale n'existe pour ce paramètre.

TEST DE RÉCUPÉRATION

1,25(OH) ₂ vitamine D ajoutée (pg/ml)	1,25(OH) ₂ vitamine D récupérée (pg/ml)	Récupération (%)
52,4	54,1	103
104,7	111,1	106
157,1	155,8	99

XIV. CONTRÔLE QUALITÉ INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le contrôle 1 et/ou le contrôle 2 ne se trouvent pas dans l'intervalle indiqué sur l'étiquette du flacon, ils ne peuvent pas être utilisés sauf si des informations satisfaisantes ont permis d'expliquer ce décalage.
 - Au besoin, chaque laboratoire peut créer ses propres échantillons de contrôle qui doivent être conservés gelés sous forme d'aliquotes. Les contrôles contenant de l'azote auront une influence sur la réaction enzymatique et ne peuvent, par conséquent, pas être utilisés.
 - Les critères d'acceptation pour les différences entre les résultats dupliqués des échantillons doivent s'appuyer sur les Bonnes Pratiques de Laboratoire.
 - Il est recommandé de tester régulièrement les contrôles comme des échantillons inconnus afin de mesurer la variabilité du test. Les performances du test doivent être surveillées à l'aide des graphiques de contrôle qualité conçus pour les contrôles.
- Il est recommandé de vérifier visuellement l'ajustement de courbe sélectionné par l'ordinateur.

XV. INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

Les valeurs sont données uniquement à titre indicatif ; chaque laboratoire doit établir son intervalle de valeurs normales.

Les échantillons normaux testés avec le test DIASource (technique ELISA) ont obtenu des valeurs comprises entre 19,3 et 53,8 pg/ml.

Les patients atteints d'insuffisance rénale (n = 20) ont obtenu des valeurs < 6,9 pg/ml.

XVI. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Les composants du sang humain inclus dans ce kit ont été testés selon des méthodes approuvées par l'Union européenne et/ou la FDA et ont obtenu des résultats négatifs aux tests HBsAg, anti-VHC et anti-VIH 1 et 2. Aucune méthode connue ne permet de garantir à 100 % que les dérivés de sang humain ne transmettront pas l'hépatite, le SIDA ou d'autres infections. Aussi, la manipulation des réactifs et des échantillons de sérum ou plasma doit être effectuée conformément aux procédures de sécurité locales.

Tous les produits et dérivés d'origine animale ont été prélevés sur des animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays dans lesquels aucun cas d'ESB n'a été recensé. Néanmoins, les composants contenant des substances d'origine animale doivent être considérés comme potentiellement infectieux.

Éviter tout contact des réactifs avec la peau. La solution d'arrêt contient de l'HCl. En cas de contact, laver abondamment à l'eau.

Ne pas fumer, boire, manger ni utiliser de produits cosmétiques dans la zone de travail. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements de protection et des gants jetables.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987). **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763.
- Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124.
- Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79.
- Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403.
- Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193.
- Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983.
- Pike J.W., Lee S.M., Meyer M.B. (2014). **Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in bone cells: exploiting new approaches and defining new mechanisms.** BoneKey Reports, 3:482.
- Hollis B.W. (2010). **Assessment and Interpretation of Circulating 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D in the Clinical Environment.** Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 39(2): 271—contents.

XVIII.

RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	ÉTALONS µl	ÉCHANTILLON(S) CONTRÔLES µl
EXTRACTION <i>Étalons</i> <i>Échantillons / Contrôles</i> <i>Solvant d'extraction</i>	- - -	- 500 2000
<i>Mélange</i> <i>Centrifugation</i>	1 heure à 1200 tr/min 5 minutes à 800 g	
SÉPARATION <i>Surnageants issus de la phase d'extraction</i>	-	1600
CARTOUCHE <i>Surnageants</i> <i>Solvant de lavage</i> <i>Dichlorométhane</i> <i>Eau distillée</i> <i>Centrifugation</i> <i>Solution d'éluion</i> <i>Centrifugation</i>	1600 µl 1000 µl 500 µl 500 µl 5 minutes à 800 g 300 µl 5 minutes à 800 g Vortex	
PHASE D'INCUBATION Dans la plaque de microtitration <i>Tampon d'incubation</i> <i>Étalons</i> <i>Échantillons extraits</i>	150 µl 50 µl -	150 µl - 50 µl
	Recouvrir la plaque d'un couvercle ou film d'étanchéité Laisser incuber 18 ± 2 h (une nuit) à 4 °C (2 à 8 °C) Préparer la solution HRP de travail 1 heure avant la prochaine phase Aspirer le contenu de chaque puits Laver à 3 reprises avec 350 µl de solution de lavage et aspirer	
<i>Conjugué HRP de travail</i>	200 µl	200 µl
	Recouvrir la plaque d'un couvercle ou film d'étanchéité et Laisser incuber 1 h à 4 °C (2 à 8 °C). Aspirer le contenu de chaque puits. Laver à 3 reprises avec 350 µl de solution de lavage et aspirer.	
<i>TMB</i>	200 µl	200 µl
	Laisser incuber pendant 15 minutes à température ambiante (18 °C à 25 °C)	
<i>Solution d'arrêt</i>	100 µl	100 µl
	Lire sur le lecteur de plaques de microtitration Enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (vs 630 ou 650 nm)	

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

Immunozymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von 1,25(OH)₂ Vitamin D im Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung:** DIAsource 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA
- B. **Katalognummer:** KAP1921: 96 Tests
- C. **Hersteller:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellinformationen wenden Sie sich bitte an:

Tel.: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Vitamin D wird vorwiegend in der Haut aus 7-Dehydrocholesterin synthetisiert und stammt teilweise aus der Nahrung und Nahrungsergänzung. Durch Hydroxylierung auf Kohlenstoff 25 in der Leber entsteht das Zwischenprodukt 25OH Vitamin D. Dieses wird weiter verstoffwechselt, bevor es die Aufgaben des Vitamin D für Darm, Nieren, Knochen und andere Organe und Gewebe erfüllen kann. Diese Folgereaktion findet in den Nieren und anderen Geweben statt. So wird das 25OH Vitamin D in der 1 α -Position weiter hydroxyliert, sodass 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂ Vitamin D) entsteht. Neben den oben genannten Geweben können auch die Plazenta von Schwangeren und Makrophagen-Zellen im Fall einer Sarkoidose eine gewisse Menge von 1,25(OH)₂ Vitamin D bilden.

1,25(OH)₂ Vitamin D ist im Hinblick auf die bekannten Funktionen die aktive Form des Vitamin D, während ausgeschlossen werden kann, dass 25OH Vitamin D und Vitamin D selbst physiologisch funktional sind. 1,25(OH)₂ Vitamin D stimuliert die Aufnahme von Kalzium und Phosphor in den Darm. Darüber hinaus regt es die Knochenresorption und -mineralisierung an und beugt so der Entstehung von Rachitis und Osteomalazie vor.

1,25(OH)₂ Vitamin D ist auch in anderen Geweben, die für den Transport von Kalzium zuständig sind (Plazenta, Niere, Brustdrüse usw.), sowie in endokrinen Drüsen wie den Nebenschilddrüsen aktiv. 1,25(OH)₂ Vitamin D wird rasch metabolisiert, und seine Halbwertszeit im Plasma liegt bei etwa 12 Stunden. Sein Hauptmetabolit ist die Calcitriolsäure, ein C-23-Karboxyl-Derivat, welches eigentlich ohne irgendeine biologische Aktivität ist. Zusätzlich zu diesem Weg unterliegt das 1,25(OH)₂ Vitamin D auch einer 24-Hydroxylierung, damit 1,24,25-Trihydroxy-Vitamin D gebildet wird. Diese Verbindung hat eine geringere biologische Aktivität als seine Eltern, und diese metabolische Route ist als ein unbedeutender Weg zu betrachten.

Die Konzentrationen von 1,25(OH)₂ Vitamin D in Plasma oder Serum sind 100- bis 1000-fach geringer als diejenigen von 25OH Vitamin D. Aufgrund dieser geringen Konzentrationen und der Anwesenheit zahlreicher ähnlicher Metaboliten erfordert die Bestimmung des 1,25(OH)₂ Vitamin D Extraktion sowie eine Separation durch Säulenchromatografie.

B. Klinische Anwendung

Die Messung des zirkulierenden 1,25(OH)₂ Vitamin D ist bei verschiedenen den Kalziumstoffwechsel betreffenden Erkrankungen angezeigt, darunter Phosphatdiabetes, Sarkoidose, Nierenversagen, Über- bzw. Unterfunktion der Schilddrüsen, Rachitis, tumorvermittelte Hyperkalzämie, Hyperkalziurie, vitaminresistente Mangelfunktion und Behandlung mit antikonvulsiven Medikamenten.

IV. GRUNDSÄTZE DER METHODE


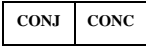
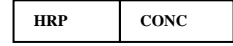
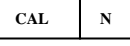


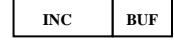
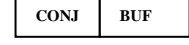
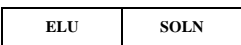
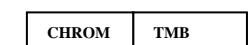
Es werden nur Proben und Kontrollen und nicht die Kalibratoren mit einem Lösungsmittelgemisch extrahiert und auf Kartuschen aufgetragen, um 1,25(OH)₂ Vitamin D von den anderen Vitamin-D-Metaboliten zu trennen. Nach der Eluierung des 1,25(OH)₂ Vitamin D aus den Proben und Kontrollen werden Kalibratoren, eluierte Proben und eluierte Kontrollen direkt in mit Anti-1,25(OH)₂ Vitamin D-Antikörpern beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert.

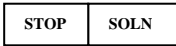
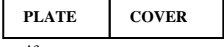

Nach Inkubation über Nacht bei 4°C wird die Mikrotiterplatte gewaschen, und die Arbeitskonjugatlösung wird hinzugefügt und eine Stunde lang bei 4°C inkubiert. Die Mikrotiterplatte wird gewaschen, um die Verdrängungsreaktion zu stoppen. Danach wird die Farblösung (TMB) hinzugefügt und 15 Minuten bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung angehalten, und die Mikrotiterplatte wird bei der geeigneten Wellenlänge gelesen.

Die Menge an 1,25(OH)₂ Vitamin D wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die umgekehrt proportional zur 1,25(OH)₂ Vitamin-D-Konzentration ist.

Es wird eine Kalibrationskurve gedruckt, und die 1,25(OH)₂ Vitamin-D-Konzentrationen der Proben werden über Dosis-Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Test Kit	Rekonstitution
 Mikrotiterplatte mit 96 mit Anti- 1,25(OH) ₂ Vitamin D- Antikörpern beschichteten brechbaren Kavitäten	96 Kavitäten	Gebrauchsfertig
 1,25(OH) ₂ Vitamin D Konzentriertes Konjugat	1 Fläschchen 1 ml	40 x mit Konjugatpuffer verdünnen
 Konzentriertes HRP	1 Fläschchen 0,2 ml	200 x mit Konjugatpuffer verdünnen
 Kalibratoren - N = 0 bis 5 (für genaue Werte siehe Fläschchenetiketten) in Phosphatpuffer mit Rinder-casein und Gentamycin	6 Fläschchen lyophilisiert	1 ml destilliertes Wasser hinzufügen
 Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Fläschchen 10 ml	200 x mit destilliertem Wasser verdünnen (Magnetrührer verwenden)
 Kontrollen - N = 1 oder 2 in Humanplasma und Gentamycin	2 Fläschchen lyophilisiert	3 ml destilliertes Wasser hinzufügen
 Inkubationspuffer mit Proclin	1 Fläschchen 20 ml	Gebrauchsfertig
 Konjugatpuffer mit Casein und Proclin	1 Fläschchen 30 ml	Gebrauchsfertig
 Eluierungslösung: enthält Methanol	1 Fläschchen 30 ml	Gebrauchsfertig
 Farblösung TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Fläschchen 25 ml	Gebrauchsfertig

 Stopplösung HCl 1.5 N	1 Fläschchen 12 ml	Gebrauchsfertig
 Klebestreifen	4	
 Silikakartuschen	42	Bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) lagern

Bemerkung: Verwenden Sie den Null-Kalibrator zur Verdünnung der Proben mit Werten über dem höchsten Kalibrator (vor Separationsschritt verdünnen).

VI. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- 1 Destilliertes Wasser
 - 2 Diisopropylether („für Analyse“; GC-Reinheit ≥ 99 %)
 - 3 Cyclohexan („für Analyse“; GC-Reinheit ≥ 99,5 %)
 - 4 Ethylacetat („für Analyse“; GC-Reinheit ≥ 99,5 %)
 - 5 Ethanol absolut („für Analyse“; GC-Reinheit ≥ 99,9 %)
 - 6 Dichlormethan („für Analyse“; GC-Reinheit ≥ 99,8 %)
- Hinweis: Ein DIASource-Extraktionskit, das alle diese Lösungsmittel enthält, ist unter der Referenznummer 3019700 erhältlich. Dieses Kit enthält die für die Extraktion der Kontrollen und Proben erforderlichen Mengen an Lösungsmitteln für 2 Kits mit 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA in Doppelmessungen.
- 7 Pipetten für: 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl, 1 ml und 3 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen aus Kunststoff wird empfohlen).
 - 8 Glasröhrchen (12 x 75 mm) für Extraktion und Eluierung (für Extraktionsschritt mit Verschluss).
 - 9 Glasröhrchen (16 x 100 mm) oder (12 x 120 mm) oder Polypropylenröhrchen (Falcon 2097) für das Waschen der Kartuschen.
 - 10 Vortexmischer
 - 11 Magnetrührer
 - 12 Zentrifuge für Betrieb mit 800 g
 - 13 Mikrotiterplattenleser zum Lesen bei 450 nm und 650 nm (bichromatisches Ablesen)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 1 ml destilliertem Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 3 ml destilliertem Wasser. **Vorsicht, nicht zum Überlaufen zu bringen.**
- HRP-Arbeitskonjugatlösung:**

! Die HRP-Arbeitskonjugatlösung muss während der Inkubation und spätestens 1 h vor Benutzung bereit werden (siehe X.B.5).

Bereiten Sie eine entsprechende Menge der HRP-Arbeitskonjugatlösung durch Mischen der drei Reagenzien in folgender Reihenfolge: (1) Konjugatpuffer, (2) konzentriertes Konjugat, (3) Vortex-Mixer, (4) konzentriertes HRP, (5) Vortex-Mixer.

Die Reihenfolge der Hinzufügung dieser 3 Reagenzien ist kritisch und sollte strikt eingehalten werden, um reproduzierbare optische Dichten zu erhalten.

Bereiten Sie die Lösung entsprechend der Anzahl der verwendeten Streifen vor, die in der Tabelle unten angegeben: zum Beispiel für 6 Streifen (48 Behälter): 250 µl konzentriertes Konjugat und 50 µl konzentriertes HRP zu 10 ml Konjugatpuffer..

Benutzen Sie einen Vortex zum Homogenisieren.

Bis zur Verwendung lagern Sie das gebrauchsfertige HRP Konjugat bei Raumtemperatur und vermeiden Sie direktes Sonnenlicht oder benutzen Sie ein braunes Glasröhrchen für die Zubereitung.

Die Herstellung von gebrauchsfähigem HRP Konjugat ist nicht stabil und muss bei Nichtgebrauch verworfen werden.

D. Arbeitswaschlösung: Zur Vorbereitung einer angemessenen Menge an Arbeitswaschlösung 199 Volumen destilliertes Wasser zu 1 Volumen Waschlösung geben (200 x) Mit einem Magnetrührer homogenisieren. Überflüssige Arbeitswaschlösung nach jedem Arbeitstag entsorgen.

E. Extraktionslösungsmittel: Für jede zu testende Kontrolle oder Probe sind 2 ml erforderlich. **Vorbereitung einer frischen Lösung** aus Diisopropylether, Cyclohexan und Ethylacetat (50, 40, 10 V/V) entsprechend der Anzahl der Extraktionen vor, wie in der nachstehenden Tabelle angegeben. **Achtung:**

Die genauen Mengenanteile sind strengstens zu beachten.

Nb der Extraktion*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	9.2	7.4	1.8
16	18.4	14.7	3.7
42	48.3	38.6	9.4

* Patientenproben und Kontrollen

F. Waschlösung: Für jede Kontrolle oder Probe ist 1 ml erforderlich. **Vorbereitung einer frischen Lösung** aus Diisopropylether, Cyclohexan, Ethylacetat und Ethanol absolut (50, 40, 10/1 V/V) entsprechend der Anzahl der Extraktionen vor, wie in der nachstehenden Tabelle angegeben. **Achtung: Die genauen Mengenanteile sind strengstens zu beachten.**

Nb der Extraktion*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)	Ethanol (µl)
1	0.6	0.5	0.1	11
8	4.6	3.7	0.9	92
16	9.2	7.4	1.8	184
42	24.1	19.3	4.8	483

* Patientenproben und Kontrollen

VIII. AUFBEWAHRUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum haltbar; **ausgenommen hiervon sind die Kartuschen, die bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) zu lagern sind.**
- Nach ihrer Rekonstitution sind **Kalibratoren** 4 Wochen bei 2-8°C haltbar. Für längere Aufbewahrungszeiten sind sie zu aliquotieren und einzufrieren und bei -20°C maximal 4 Monate aufzubewahren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Nach ihrer Rekonstitution sind **Kontrollen** 3 Tage bei 2-8°C haltbar. Für längere Aufbewahrungszeiten sind sie zu aliquotieren und einzufrieren und bei -20°C maximal 1 Monat aufzubewahren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Die frisch hergestellte Waschlösung sollte am selben Tag aufgebraucht werden.
- Das HRP-Arbeitskonjugat nach seiner Verwendung entsorgen.
- **Es wird empfohlen, Extraktions- und Waschlösungsmittel jeweils frisch herzustellen und nicht zu lagern.**
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Der Kit eignet sich für Serumproben.
- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben aliquotiert und bei -20°C aufgehoben werden.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Nach dem Auftauen müssen die Proben auf dem Vortex gemischt und zentrifugiert werden.

X. DURCHFÜHRUNG

Achtung: Die Leistung des Kits wurde anhand von doppelt getesteten Proben definiert, daher ist es wichtig, das Kit wie in der Anleitung empfohlen zu verwenden. Aus diesem Grund reicht die im Kit enthaltene Menge an Kartuschen nur aus, um die Extraktion für eine Doppelbestimmung der Patientenproben durchzuführen.

Anzahl Streifen	Menge an Konjugatpuffer (ml)	Menge an Konzentriertem Konjugat (µl)	Menge an Konzentriertem HRP (µl)
1	3	75	15
2	5	125	25
3	6	150	30
4	8	200	40
5	9	225	45
6	10	250	50
7	12	300	60
8	14	350	70
9	16	400	80
10	18	450	90
11	20	500	100
12	22	550	110

I. Extraktionsschritt: ! Nur für Kontrollen und Proben !

1. Glasröhrchen (12 x 75 mm) für die Extraktion beschriften: 2 Kontrollen und bis zu 40 Proben.
2. In die jeweiligen Röhrchen 0,5 ml Kontrolle oder Probe pipettieren.
3. 2 ml Extraktionslösungsmittel in alle Röhrchen geben.
4. Röhrchen mit Verschluss schließen und 1 Stunde auf einem Schüttler (1200 rpm) inkubieren.
5. Alle Röhrchen 5 min. bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C - 800 g) zentrifugieren.
6. Für den nächsten Separationsschritt Überstände verwenden.

II. Separationsschritt: ! Nur für Kontrollen und Proben !

1. Glasröhrchen (16 x 100 mm) oder (12 x 120 mm) oder Polypropylenröhrchen (Falcon 2097) für das Waschen der Kartuschen beschriften: 2 Kontrollen und bis zu 40 Proben.
2. In jedes Röhrchen eine Silikakartusche geben.
3. 1,6 ml des Überstandes (2 x 0,8 ml) aus dem Extraktionsschritt auf die Kartuschen tragen. Durch Schwerkraft passieren lassen.
4. Kartuschen mit 1 ml Waschlösungsmittel (vgl. Reagenzienvorbereitung) waschen.
! Niemals Vakuum an die Kartuschen anlegen, sondern Lösungsmittel allein durch Schwerkraft passieren lassen.
5. 500 µl Dichlormethan auf die Kartuschen pipettieren; durch Schwerkraft passieren lassen.
6. 500 µl destilliertes Wasser auf jede Kartusche geben und alle Röhrchen 5 Minuten lang bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C - 800 g) zentrifugieren.
7. Glasröhrchen (12 x 75 mm) für das Eluieren von 1,25(OH)₂ Vitamin D beschriften. Kartuschen nach dem Zentrifugieren in die entsprechenden Glasröhrchen übertragen.
8. 300 µl Eluierungslösung auf jede Kartusche tragen, um 1,25(OH)₂ Vitamin D zu eluieren, und 5 Min. bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C - 800 g) zentrifugieren.
9. Die eluierte Fraktion **vortexmischen**.

Bemerkung: Nach diesem Schritt müssen die Proben unverzüglich in die beschichtete Röhrchen überführt werden, um einen Abbau zu vermeiden.

III. Inkubationsschritt:

1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl von Streifen für den Durchgang. Die nicht verwendeten Streifen sollten wieder mit einem Trocknungsmittel in einem Beutel verschlossen und bei 2-8°C aufbewahrt werden.
2. Die Streifen im Halterahmen befestigen.
3. Rekonstituierte Kalibratoren, extrahierte Kontrollen und extrahierte Proben kurz vortexen.
4. 150 µl Inkubationspuffer in alle Kavitäten pipettieren.
5. 50 µl von jedem Kalibrator (nicht extrahiert), eluierte Kontrollen und eluierte Proben in die entsprechenden Kavitäten pipettieren.
6. 18±2 Stunden bei 2-8°C inkubieren. Platte mit einem Deckel oder einer Folie abdecken.

HRP-Arbeitskonjugatlösung 60 Min. +/- 15 Minuten vor dem Waschen der Kavitäten nach der Übernachtinkubation vorbereiten.

7. Flüssigkeit aus jeder Kavität absaugen.
Platte drei Mal wie folgt waschen:
 - 0,35 ml Waschlösung in jede Kavität geben und
 - Inhalt aus jeder Kavität absaugen.
8. 200 µl HRP-Arbeitskonjugatlösung in jede Kavität pipettieren.
9. 1 Stunde bei 4°C inkubieren. Platte mit einem Deckel oder einer Folie abdecken.

10. Flüssigkeit aus jeder Kavität absaugen.
Platte drei Mal wie folgt waschen:
 - 0,35 ml Waschlösung in jede Kavität geben und
 - Inhalt aus jeder Kavität absaugen.
11. Binnen 15 Minuten nach dem Waschschrift 200 µl der Farblösung in jede Kavität pipettieren.
12. Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) inkubieren, dabei direktes Sonnenlicht vermeiden.
13. 100 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren.
14. Absorption bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) binnen 1 Stunde ablesen und Ergebnisse wie in Punkt XI beschrieben berechnen.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Platte bei 450 nm unter Vergleich mit einem Referenzfilter von 650 nm (oder 630 nm) ablesen.
2. Den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen berechnen.
3. Für die Erstellung der Kalibrationskurve wird die Verwendung von computergestützten Methoden empfohlen. Die bevorzugte Methode ist die „4-Parameter“-Kurvenfunktion. Offensichtliche „Ausreißer“ ausschließen.
4. Die 1,25(OH)₂ Vitamin-D-Konzentrationen der Proben über Interpolation der OD-Probenwerte aus der Kalibrationskurve bestimmen.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationskurve verwendet werden.

Substanz	1,25(OH) ₂ VitaminD (pg/ml)	Konzentration der Störsubstanz (mg/dl)	Abweichung zum Durchschnitt %
Hämoglobin	31.8	250	5.0%
		500	
	186.5	250	
		500	
Bilirubin konjugiert	31.8	50	-12.3%
	186.5	50	
Bilirubin unkonjugiert	31.8	50	-0.4%
		100	
	186.5	50	
		100	
Triglycerid	31.8	50	-1.0%
		100	
		250	
	186.5	50	
		100	
Vitamin C	31.8	100	4.9%
		1000	
		100	
	186.5	100	
		1000	

1,25(OH) ₂ Vitamin D ELISA	OD-Einheiten
Kalibrator:	
0 pg/mL	2,93
3 pg/mL	2,52
12 pg/mL	1,85
50 pg/mL	1,11
120 pg/mL	0,57
180 pg/mL	0,36

Anmerkung: 1 pg/ml = 2,4 pmol/l

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen OD-Werts bei Nullbindung, entsprach 0,8 pg/ml.

B. Spezifität

Die Kreuzreaktivität des 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA Assay wurde durch Testen von Seren mit dotierten und nicht-dotierten Kreuzreaktionsmitteln bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Verbindung und Konzentration	Kreuz-Reaktivität (%)
1,25(OH) ₂ -Vitamin-D3 bei 200 pg/ml	114
1,25(OH) ₂ -Vitamin-D2 bei 200 pg/ml	108
25OH-Vitamin-D3 bei 1µg/ml	0.004
25OH-Vitamin-D2 bei 1µg/ml	0.0003
24,25(OH) ₂ -Vitamin-D3 bei 200 ng/ml	0.03
25,26(OH) ₂ -Vitamin-D3 bei 400 ng/ml	0.02

Die Auswirkung potenziell störender Substanzen auf Proben wurde mit dem DIAsource 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA Test beurteilt. Verschiedene Konzentrationen von Hämoglobin, Bilirubin (konjugiert und unkonjugiert), Triglycerid und Vitamin C in Serumproben wurden an Proben mit unterschiedlicher 1,25(OH)₂ Vitamin-D-Konzentration getestet. Das Annahmekriterium war eine Störung von weniger als 15 %. Die Leistung des DIAsource 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA wurde durch die getesteten Substanzen nicht beeinflusst.

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

INTER-ASSAY PRÄZISION

Probe	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Probe	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	13	18.3 ± 2.5	13.9	A	13	26.7 ± 3.5	13.2
B	13	168.9 ± 8.4	5.0	B	13	83.4 ± 14.6	17.5

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

Die Probe wurde vor dem Extraktionsschritt mit Null-Kalibrator verdünnt.

VERDÜNNUNGSTEST

Probenverdünung	Theoretische Konzentration (pg/ml)	Gemessene Konzentration (pg/ml)	Steigung	Schnittpunkt Y-Achse	R	Wiederfindungsrate (%)
1/1	118.9	118.9	0.99	1.12	0.99	100
1/2	59.5	60.7				102
1/4	29.7	29.3				99
1/8	14.9	16.6				112

Umrechnungsfaktor:

Von pg/ml in pmol/l: x 2,4

Von pmol/l in pg/ml: x 0,42

Laut unserem Wissen gibt es keine internationale Referenzen zu diesen Parametern.

WIEDERFINDUNGSTEST

Hinzugefügtes 1,25(OH) ₂ -Vitamin D (pg/ml)	Wiedergefunden 1,25(OH) ₂ -Vitamin D (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
52.4	54.1	103
104.7	111.1	106
157.1	155.8	99

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ergebnisse für Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen, die Azid enthalten, stören die enzymatische Reaktion und dürfen nicht verwendet werden.

- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, dass Kontrollen routinemäßig als unbekannte Proben untersucht werden, um die Zuverlässigkeit des Assays zu bestimmen. Die Leistung des Assays sollte mit Qualitätskontrollencharts der Kontrollen überwacht werden. Es gilt als gute Praxis, visuell die vom Computer gewählte Kurvenanpassung zu prüfen.

XV. ZU ERWARTENDE BEREICHE

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Mit dem DIAsource Elisa Assay getesteten Proben lagen zwischen 19,3 und 53,8 pg/ml.

Bei Patienten mit Nierenversagen (n = 20) lag der Wert < 6,9 pg/ml.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für *in vitro* Diagnostik.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und/oder in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den lokalen Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien, die Stopplösung enthält HCl. Bei Kontakt gründlich mit Wasser waschen.

Bitte im Arbeitsbereich nicht rauchen, trinken, essen oder Kosmetika anwenden. Nicht mit dem Mund pipettieren. Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe tragen.

XVII. LITERATUR

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987). **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763.
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124.
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79.
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403.
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193.
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983.
7. Pike J.W., Lee S.M., Meyer M.B. (2014). **Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in bone cells: exploiting new approaches and defining new mechanisms.** BoneKey Reports, 3:482.
8. Hollis B.W. (2010). **Assessment and Interpretation of Circulating 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D in the Clinical Environment.** Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 39(2): 271—contents.

XVIII.

ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN µl	PROBE(N) KONTROLLEN µl
EXTRAKTION <i>Kalibratoren</i> <i>Proben / Kontrollen</i> <i>Extraktionslösungsmittel</i>	- - -	- 500 2000
<i>Schütteln</i> <i>Zentrifugierung</i>	1 Stunde bei 1200 rpm 5 Minuten (800 g)	
SEPARATION <i>Überstand aus dem</i> <i>Extraktionsschritt</i>	-	1600
KARTUSCHE <i>Überstand</i> <i>Waschlösungsmittel</i> <i>Dichlormethan</i> <i>Destilliertes Wasser</i> <i>Zentrifugierung</i> <i>Eluierungslösung</i> <i>Zentrifugierung</i>	1600 µl 1000 µl 500 µl 500 µl 5 Minuten (800 g) 300 µl 5 Minuten (800 g) Vortex	
INKUBATIONSSCHRITT In Mikrotiterplatte <i>Inkubationspuffer</i> <i>Kalibratoren</i> <i>Extrahierte Proben</i>	150 µl 50 µl -	150 µl - 50 µl
<i>HRP-Arbeitskonjugat</i>	200 µl	200 µl
Platte mit einem Deckel oder einer Folie abdecken und 1 Stunde bei 4°C (2-8°C) inkubieren. Inhalt aus jeder Kavität absaugen. 3 Mal mit 350 µl Waschlösung waschen und absaugen.		
<i>TMB</i>	200 µl	200 µl
15 Minuten bei Raumtemperatur (18°C bis 25°C) inkubieren.		
<i>Stopplösung</i>	100 µl	100 µl
Auf einem Mikrotiterplattenleser ablesen. Die Absorption jeder Kavität bei 450 nm (im Vergleich zu 630 oder 650 nm) verzeichnen.		

Lea todo el protocolo antes de usar.

1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA

I. INDICACIONES

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa *in vitro* de vitamina 1,25(OH)₂ D en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** DIAsource 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA
- B. **Número de catálogo:** KAP1921: 96 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

A. Actividades biológicas

La vitamina D se sintetiza principalmente en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol y es parcialmente de origen dietético y de suplementos. En el hígado, la vitamina D se hidroxila en el carbono 25 para producir la vitamina 25OH D intermedia. La vitamina 25OH D se metaboliza aún más antes de que pueda desempeñar las funciones de la vitamina D en el intestino, los riñones, los huesos y otros órganos y tejidos. Esta reacción posterior tiene lugar en los riñones y en otros tejidos. Por lo tanto, la vitamina 25OH D se hidroxila aún más en la posición 1α para producir 1α, 25-dihidroxitamina D (vitamina 1,25(OH)₂ D). Además de los tejidos mencionados anteriormente, la placenta de las mujeres embarazadas y las células de macrófagos en el caso de sarcoidosis también puede producir cierta cantidad de vitamina 1,25(OH)₂ D.

La vitamina 1,25(OH)₂ D es la forma activa de la vitamina D con respecto a las funciones conocidas, mientras que la vitamina 25OH D y la vitamina D también pueden excluirse como fisiológicamente funcionales. La vitamina 25(OH) D estimula la absorción intestinal tanto del calcio como del fósforo. También estimula la reabsorción y mineralización ósea, impidiendo así el desarrollo de raquitismo y osteomalacia.

La vitamina 25(OH) D puede también estar activa en otros tejidos responsables del transporte de calcio (placenta, riñón, glándula mamaria...) y glándulas endocrinas como las glándulas paratiroides. La vitamina 1,25(OH)₂ D se metaboliza rápidamente y su vida media es de aproximadamente 12 h en plasma. Su principal metabolito es el ácido calcitroico, un derivado del ácido carboxílico C-23, que en esencia carece de actividad biológica. Además de esta ruta, la vitamina 1,25(OH)₂ D sufre una hidroxilación en el carbono 24 para producir 1,24,25-trihidroxitamina D. Este compuesto tiene menos actividad biológica que su molecular precursora y su ruta metabólica está considerada como una ruta menor.

Los niveles de vitamina 1,25(OH)₂ D en plasma o suero son 100 a 1000 menores que los de vitamina 25OH D. Debido a sus bajas concentraciones y la presencia de muchos metabolitos similares, la medida de vitamina 1,25(OH)₂ D necesita extracción y separación por cromatografía.

B. Aplicación clínica

La medición de vitamina 1,25(OH)₂ D circulante está indicada en varios trastornos que afectan al metabolismo del calcio, como: diabetes de fosfato, sarcoidosis, insuficiencia renal, hiper e hipoparatiroidismo, raquitismo, hipercalcemia asociada a tumores, hipercalciuria, disfunción resistente a la vitamina y tratamiento con medicación anticonvulsiva.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Solo las muestras y los controles, no los calibradores, se extraen con una mezcla de solventes y se aplican en cartuchos para separar la vitamina 1,25(OH)₂ D de los otros metabolitos de la vitamina D. Después de la elución de la vitamina 1,25(OH)₂ D de los cartuchos de muestras y controles, los calibradores, las muestras eluidas y los controles eluidos se incuban directamente en una placa de microvaloración recubierta con anticuerpos anti-vitamina 1,25(OH)₂ D.


Después de una incubación durante la noche a 4 °C, la placa de microvaloración se lava y la solución del conjugado de trabajo se añade y se incuba durante 1 hora a 4 °C.

Después, se lava la placa de microvaloración para detener la reacción de competición. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada.

La cantidad de vitamina 1,25(OH)₂ D se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es inversamente proporcional a la concentración de vitamina 1,25(OH)₂ D.

Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de vitamina 1,25(OH)₂ D de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit con 96 pruebas	Reconstitución			
 Placa de microvaloración con 96 pocillos separables recubiertos con anticuerpos anti vitamina	96 pocillos	Listo para usar			
<table border="1" data-bbox="87 952 231 996"><tr><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table> Concentrado de vitamina 1,25(OH) ₂ D Conjugado	CONJ	CONC	1 vial 1 ml	Diluir 40 x con tampón de conjugado	
CONJ	CONC				
<table border="1" data-bbox="87 1102 279 1146"><tr><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table> HRP concentrado	HRP	CONC	1 vial 0,2 ml	Diluir 200 x con tampón de conjugado	
HRP	CONC				
<table border="1" data-bbox="135 1191 263 1236"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores - N = 0 a 5 (véanse los valores exactos en la etiqueta del vial) en el tampón fosfato con caseína bovina y gentamicina	CAL	N	6 viales liofilizados	Añadir 1 ml de agua destilada	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="87 1348 343 1393"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Diluir 200 x con agua destilada (usar un agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="103 1460 279 1505"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en plasma humano con gentamicina	CONTROL	N	2 viales liofilizados	Añadir 3 ml de agua destilada	
CONTROL	N				
<table border="1" data-bbox="103 1572 263 1617"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón de incubación con Proclin	INC	BUF	1 vial 20 ml	Listo para usar	
INC	BUF				
<table border="1" data-bbox="103 1684 279 1729"><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón de conjugado con caseína y Proclin	CONJ	BUF	1 vial 30 ml	Listo para usar	
CONJ	BUF				
<table border="1" data-bbox="87 1796 263 1841"><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de elución: contiene metanol	ELU	SOLN	1 vial 30 ml	Listo para usar	
ELU	SOLN				
<table border="1" data-bbox="103 1930 327 1975"><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table> Solución cromogénica (TMB) (Tetrametilbencidina)	CHROM	TMB	1 vial 25 ml	Listo para usar	
CHROM	TMB				

<table border="1" data-bbox="885 145 1061 190"><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table> Solución de parada HCl 1,5 N	STOP	SOLN	1 vial 12 ml	Listo para usar
STOP	SOLN			
<table border="1" data-bbox="885 291 1093 336"><tr><td>PLATE</td><td>COVER</td></tr></table> Tiras adhesivas	PLATE	COVER	4	
PLATE	COVER			
<table border="1" data-bbox="885 414 981 459"><tr><td>GEL</td></tr></table> Cartuchos de sílice	GEL	42	Almacenar a temperatura ambiente	
GEL				

Nota: Usar el calibrador 0 para la dilución de muestras con valores por encima del calibrador más alto (diluir antes del paso de extracción)

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

- 1 Agua destilada
 - 2 Diisopropiléter ("para análisis"; pureza de GC ≥ 99 %)
 - 3 Ciclohexano ("para análisis"; pureza de GC ≥ 99,5 %)
 - 4 Acetato de etilo ("para análisis"; pureza de GC ≥ 99,5 %)
 - 5 Etanol absoluto ("para análisis"; pureza de GC ≥ 99,9 %)
 - 6 Diclorometano ("para análisis"; pureza de GC ≥ 99,8%)
- Nota: Hay disponible un kit de extracción DAsource que contiene todos estos solventes bajo el n.º de referencia 3019700. Este kit contiene las cantidades de solventes necesarios para extraer los controles y las muestras, para 2 kits de 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA, en medidas duplicadas.
- 7 Pipetas para dispensación de: 50µl, 100µl, 150µl, 200 µl, 1ml y 3 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
 - 8 tubos de vidrio (12 x 75 mm) para extracción y para elución (cerrado con una tapa para el paso de extracción).
 - 9 Tubos de vidrio (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm), o tubos de polipropileno (falcon 2097), para el lavado de los cartuchos.
 - 10 Agitador tipo vórtex
 - 11 Agitador magnético
 - 12 Centrífuga que funciona a 800 g
 - 13 Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450 nm y a 650 nm (lectura bicromática)

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- A. Calibradores:** Reconstituya los calibradores con 1 ml de agua destilada.
- B. Controles:** Reconstituya, **cuidadosamente**, los controles con 0,5 ml de agua destilada **para evitar el desbordamiento**.
- C. Solución de trabajo del conjugado de HRP:**
! La solución de trabajo del conjugado de HRP debe prepararse durante la incubación y al menos 1 hora antes de su uso (véase X.III).
 Prepare un volumen adecuado de la solución del conjugado de HRP de trabajo mezclando los 3 reactivos en la secuencia siguiente: 1) tampón de conjugado, 2) conjugado concentrado, 3) agite con un vórtex, 4) HRP concentrado, 5) agite con un vórtex.
El orden en el que se añaden esos 3 reactivos es crítico y debe respetarse estrictamente para obtener densidades ópticas reproducibles.
 Prepare la solución conforme al número de tiras utilizadas, según se indica en la tabla siguiente: por ejemplo, para 6 tiras (48 pocillos): 250 µl de conjugado concentrado y 50 µl de HRP concentrado para 10 ml de tampón conjugado.
 Use un vórtex para homogeneizar.
 Hasta su uso, mantenga el conjugado de HRP de trabajo a temperatura ambiente y evite la luz solar directa o utilice un vial de cristal marrón para su preparación.
 La preparación del conjugado de HRP de trabajo no es estable y debe desecharse si no se usa.

N.º de tiras	Volumen del tampón de conjugado (ml)	Volumen del conjugado concentrado (µl)	Volumen del HRP concentrado (µl)
1	3	75	15
2	5	125	25
3	6	150	30
4	8	200	40
5	9	225	45
6	10	250	50
7	12	300	60
8	14	350	70
9	16	400	80
10	18	450	90
11	20	500	100
12	22	550	110

D. Solución de lavado de trabajo: Prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo añadiendo 199 volúmenes de agua destilada a 1 volumen de solución de lavado (200x). Use un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final de la jornada.

E. Solvente de extracción: Se necesitan 2 ml para cada control o muestra a analizar. **Prepare una solución nueva** de diisopropiléter, ciclohexano y acetato de etilo: 50/40/10 volumen/volumen según el número de extracciones, como se indica en la tabla que aparece a continuación.

Tenga cuidado: la proporción exacta de cada solvente debe respetarse estrictamente.

Nota de extracción*	Diisopropiléter (ml)	Ciclohexano (ml)	Acetato de etilo (ml)
1	1,1	0,9	0,2
8	9,2	7,4	1,8
16	18,4	14,7	3,7
42	48,3	38,6	9,4

*Muestras y controles de pacientes

F Solvente de lavado: Se necesita 1 ml para cada control o muestra a analizar. Prepare una solución nueva de diisopropiléter, ciclohexano, acetato de etilo y etanol absoluto (50/40/10 volumen/volumen) según el número de extracciones, como se indica en la tabla que aparece a continuación.

Tenga cuidado: la proporción exacta de cada solvente debe respetarse estrictamente.

Nota de extracción*	Diisopropiléter (ml)	Ciclohexano (ml)	Acetato de etilo (ml)	Etanol (µl)
1	0,6	0,5	0,1	11
8	4,6	3,7	0,9	92
16	9,2	7,4	1,8	184
42	24,1	19,3	4,8	483

*Muestras y controles de pacientes

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- **Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2 y 8 °C, excepto los cartuchos que deben almacenarse a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C).**

- Tras la reconstitución, los **calibradores** se mantienen estables durante 4 semanas a 2-8 °C. Para períodos de tiempo más largos, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a -20 °C durante un máximo de 4 meses. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.

- Tras la reconstitución, los **controles** se mantienen estables durante 3 días a 2-8 °C. Para períodos de tiempo más largos, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a -20 °C durante un máximo de 1 mes. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.

- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.

- Después de su uso, desechar la solución de trabajo del conjugado de HRP.

- **Use solventes de extracción y solventes de lavado recién preparados, no los almacene.**

- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- El kit es adecuado para muestras de suero.

- Las muestras de suero deben conservarse a 2-8 °C.

Si la prueba no se realiza antes de 24 horas se recomienda conservar en partes alícuotas a -20°C.

- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.

- Después de descongelar, las muestras deben agitarse y centrifugarse.

X. PROCEDIMIENTO

Atención: El rendimiento del kit se definió en base a muestras analizadas por duplicado, por lo que es importante utilizar el kit como se recomienda en las instrucciones. Por este motivo, la cantidad de cartuchos proporcionados en el kit solo es suficiente para realizar la extracción para una determinación por duplicado de las muestras de los pacientes.

I. Paso de extracción: ! ¡Solo para controles y muestras!

1. Etiqueta de tubos de vidrio (12x75 mm) para extracción: 2 controles y hasta 40 muestras.

2. Añada 0,5 ml de control o muestra en los tubos respectivos.

3. Dispense 2 ml de solvente de extracción en cada tubo.

4. Los tubos se cierran con una tapa y se colocan en un agitador durante 1 hora a 1200 rpm.

5. Centrifugue cada tubo durante 5 minutos a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C a 800 g).

6. Se necesitan sobrenadantes para el siguiente paso de separación.

II. Paso de separación: ! ¡Solo para controles y muestras!

1. Etiqueta de tubos de vidrio (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm), o tubos de polipropileno (falcon 2097), para lavar cartuchos: 2 controles y hasta 40 muestras.

2. Ponga un cartucho de sílice en cada tubo.

3. Aplique 1,6 ml de sobrenadante (2 x 0,8 ml), obtenido después del paso de extracción, en el cartucho. Drene por gravedad.

4. Lave los cartuchos con 1 ml de solvente de lavado (véase: preparación de reactivos).

!Tenga cuidado: no aplique nunca vacío en los cartuchos, simplemente deje que el solvente se drene por gravedad.

5. Añada 500 µl de diclorometano en cada cartucho, deje que se drene por gravedad.

6. Añada 500 µl de agua destilada en cada cartucho y centrifugue cada tubo durante 5 minutos a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C a 800 g).

7. Etiquete los tubos de vidrio (12 x 75 mm) para la elución de vitamina 1,25 (OH)₂ D. Después de la centrifugación, transfiera los cartuchos a los tubos de vidrio correspondientes.

8. Aplique 300 µl de solución de elución en cada cartucho para eluir vitamina 1,25 (OH)₂ D y centrifugue durante 5 minutos a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C a 800 g).

9. Agite la fracción eluida en un **vórtex**.

Nota: Después de este paso, las muestras deben incubarse en una placa de microvaloración recubierta inmediatamente para evitar la degradación.

III. Paso de incubación:

1. Seleccione el número necesario de tiras para el análisis. Las tiras no utilizadas deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 y 8 °C.

2. Fije las tiras en el marco de soporte.

3. Agite en un vórtex brevemente los calibradores reconstituidos, los controles de extracción y las muestras extraídas.

4. Pipetee 150 µl de tampón de incubación en todos los pocillos.

5. Pipetee 50 µl de cada calibrador (no extraído), control eluido y muestras eluidas en los pocillos adecuados.

6. Incube durante 18 ± 2 horas, a 2-8 °C. Cubra la placa con una tapa o un film sellador.

Prepare la solución de trabajo del conjugado de HRP 60 min +/- 15 min antes de lavar los pocillos después de la incubación durante la noche.

7. Aspire el líquido de cada pocillo.

Lave la placa 3 veces:

- Dispense 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo y

- Aspire el contenido de cada pocillo

8. Pipetee 200 µl de solución de trabajo del conjugado de HRP en cada pocillo.

9. Incube durante 1 hora a 4 °C. Cubra la placa con una tapa o un film sellador.

10. Aspire el líquido de cada pocillo.
Lave la placa 3 veces:
 - Dispense 0,35 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspire el contenido de cada pocillo
11. Pipetee 200 µl de la solución cromogénica en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
12. Incube la placa de microvaloración durante 15 minutos a temperatura ambiente, y evite la luz solar directa.
13. Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
14. Lea las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 1 hora y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Lea la placa a 450 nm con respecto a un filtro de referencia configurado a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcule la media de las determinaciones por duplicado.
3. Se recomienda el uso de métodos informáticos para generar la curva de calibración. Se prefiere el método de ajuste de la curva mediante función logística de 4 parámetros. Rechace los valores atípicos obvios.
4. Determine las concentraciones de vitamina 25(OH)₂ D de las muestras en la curva de calibración mediante interpolación de los valores DO de las muestras.

XII. DATOS TÍPICOS

Los datos siguientes son solo a efectos ilustrativos y no deben utilizarse nunca en lugar de la curva de calibración generada en tiempo real.

1,25(OH) ₂ Vitamin D ELISA	Unidades de DO
Calibrador:	
0 pg/ml	2,93
3 pg/ml	2,52
12 pg/ml	1,85
50 pg/ml	1,11
120 pg/ml	0,57
180 pg/ml	0,36

Nota: 1 pg/ml = 2,4 pmol/l

XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Se analizaron veinte calibradores cero junto con un conjunto de otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente dos desviaciones estándar por debajo del promedio de DO en la unión cero, fue de 0,8 pg/ml.

B. Especificidad

La reactividad cruzada del ensayo 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA se determinó analizando los sueros con reactivos cruzados enriquecidos y no enriquecidos. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Compuesto y concentración	Reactividad cruzada (%)
Vitamina 1,25(OH) ₂ D3 a 200 ng/ml	114
Vitamina 1,25(OH) ₂ D2 a 200 ng/ml	108
Vitamina 25OH D3 a 1 µg/ml	0,004
Vitamina 25OH D2 a 1 µg/ml	0,0003
Vitamina 24,25(OH) ₂ D3 a 200 ng/ml	0,03
Vitamina 25,26(OH) ₂ D3 a 20 ng/ml	0,02

Se evaluó el efecto de posibles sustancias interferentes en las muestras utilizando la prueba 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA de DIASource. Se analizaron distintos niveles de hemoglobina, bilirrubina (conjugada y sin conjuguar), triglicéridos y vitamina D de las muestras de suero en muestras con distintas concentraciones de vitamina 1,25(OH)₂ D. Nuestro criterio de aceptación fue que hubiera una interferencia menor al 15 %, Las sustancias analizadas no influyeron en la eficacia del 1,25(OH)₂ Vitamin D ELISA de DIASource.

Sustancia	Vitamina 1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	Concentración de interferente (mg/dl)	% variación medio
Hemoglobina	31,8	250	5,0%
		500	
	186,5	250	
		500	
Bilirrubina conjugada	31,8	50	-12,3%
	186,5	50	
Bilirrubina sin conjuguar	31,8	50	-0,4%
		100	
	186,5	50	
		100	
Triglicéridos	31,8	50	-1,0%
		100	
		250	
	186,5	50	
		100	
		250	
Vitamina C	31,8	100	4,9%
		1000	
	186,5	100	
		1000	

C. Precisión

PRECISIÓN INTRAENSAYO

PRECISIÓN INTERENSAYO

Muestra	N	<X> ± DE (pg/ml)	CV (%)	Muestra	N	<X> ± SE (pg/ml)	CV (%)
A	13	18,3 ± 2,5	13,9	A	13	26,7 ± 3,5	13,2
B	13	168,9 ± 8,4	5,0	B	13	83,4 ± 14,6	17,5

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

D. Exactitud

La muestra se diluyó con el calibrador 0, antes del paso de extracción.

PRUEBA DE DILUCIÓN

Dilución de la muestra	Concentración teórica (pg/ml)	Concentración medida (pg/ml)	Pendiente	Ordenada a en origen	R	Recuperación (%)
1/1	118,9	118,9	0,99	1,12	0,99	100
1/2	59,5	60,7				102
1/4	29,7	29,3				99
1/8	14,9	16,6				112

Factor de conversión:

De µg/ml a pmol/l: x 2,4
De pmol/l a pg/ml : x 0,42

No existe, que nosotros sepamos, ningún material de referencia internacional para este parámetro.

PRUEBA DE RECUPERACIÓN

Vitamina 1,25(OH) ₂ D añadida (pg/ml)	Recuperada Vitamina 1,25(OH) ₂ D (pg/ml)	Recuperada (%)
52,4	54,1	103
104,7	111,1	106
157,1	155,8	99

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.

- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los duplicados de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.
 - Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.
- Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores se proporcionan solo como guía; cada laboratorio debería establecer su propio intervalo de valores normales.

Las muestras normales analizadas con el ensayo Elisa de DIAsource se midieron entre 19,3 y 53,8 pg/ml.

Los pacientes con insuficiencia renal (n = 20) se midieron <6,9 pg/ml.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

Los componentes de la sangre humana incluidos en este kit se han analizado mediante métodos europeos aprobados y/o métodos aprobados por la FDA, siendo negativos para HBsAg, anti-VHC y anti-VIH-1 y 2. Ningún método conocido puede ofrecer una garantía total de que los hemoderivados humanos no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por tanto, la manipulación de reactivos y las muestras de suero o plasma debe realizarse de conformidad con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos y derivados de animales se han obtenido de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que no se ha notificado EEB. Sin embargo, los componentes que contengan sustancias animales deben tratarse como potencialmente infecciosos.

Evite el contacto con la piel de los reactivos; la solución de parada contiene HCl. En caso de contacto, lávese bien con agua.

No fume, beba, coma ni use cosméticos en la zona de trabajo. No pipetee con la boca. Lleve ropa protectora y guantes desechables.

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987). **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763.
- Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124.
- Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79.
- Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P. (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403.
- Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193.
- Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983.
- Pike J.W., Lee S.M., Meyer M.B. (2014). **Regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in bone cells: exploiting new approaches and defining new mechanisms.** BoneKey Reports, 3:482.
- Hollis B.W. (2010). **Assessment and Interpretation of Circulating 25-Hydroxyvitamin D and 1,25-Dihydroxyvitamin D in the Clinical Environment.** Endocrinol. Metab. Clin. North Am., 39(2): 271-contents.

XVIII.

RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES µl	MUESTRA(S) CONTROLES µl
EXTRACCIÓN <i>Calibradores</i> <i>Muestras/controles</i> <i>Solvente de extracción</i>	- - -	- 500 2000
<i>Agitación</i> <i>Centrifugación</i>	1 hora a 1200 rpm 5 minutos a 800 g	
SEPARACIÓN <i>Sobrenadante del paso de extracción</i>	-	1600
CARTUCHO <i>Sobrenadante</i> <i>Solventa de lavado</i> <i>Diclorometano</i> <i>Agua destilada</i> <i>Centrifugación</i> <i>Solución de elución</i> <i>Centrifugación</i>	1600 µl 1000 µl 500 µl 500 µl 5 minutos a 800 g 300 µl 5 minutos a 800 g Vórtex	
PASO DE INCUBACIÓN <i>En placa de microvaloración</i> <i>Tampón de incubación</i> <i>Calibradores</i> <i>Muestras extraídas</i>	150µL 50µL -	150µL - 50µL
	Cubra la placa con una tapa o film sellador Incube 18 ± 2 h (toda la noche) a 4 °C (2 - -8 °C) Prepare la solución de trabajo de HRP una hora antes del siguiente paso Aspire el contenido de cada pocillo Lave 3 veces con 350 µl de solución de lavado y aspire	
<i>Conjugado de HRP de trabajo</i>	200µL	200µL
	Cubra la placa con una tapa o film sellador e Incube durante 1 h a 4 °C (2 - -8°C). Aspire el contenido de cada pocillo. Lave 3 veces con 350 µl de solución de lavado y aspire.	
<i>TMB</i>	200µL	200µL
	Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).	
<i>Solución de parada</i>	100µL	100µL
	Lea en un lector de placas de microvaloración. Registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (en comparación con 630 o 650 nm).	