

BIOHIT HealthCare

Innovating for Health

BIOHIT TOTAL 250H VITAMIN D

Kit **ELISA** pour la mesure de 25-hydroxyvitamine D2 et D3 dans le plasma et le sérum

MODE D'EMPLOI



602 310.02

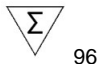


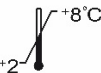




For *in vitro* diagnostic use

Store at 2-8 °C Upon Receipt

Biohit Oyj Laippatie 1, FI-00880 Helsinki, Finland

Tel. +358 9 773 861, info@biohit.fi, www.biohithealthcare.com

IVD	Pour usage diagnostique <i>in vitro</i>	CAL 0	Calibrateur 0
REF	Référence de catalogue	CAL 1-5	Calibrateurs 1-5
LOT	Numéro de lot	CONTROL N	Contrôles
	96 tests	INC BUF	Tampon d'incubation
	Protéger de la lumière solaire	CONJ BUF	Tampon de conjugué
	À utiliser avant	CONJ CONC	25OHD conjugué concentré
	Conserver entre 2 et 8 °C	HRP CONC	SA-HRP concentré
	Ne pas réutiliser	WASH 200x	Solution de lavage concentrée (200x)
	Consulter le mode d'emploi	SUBS	Solution substrat
LYO	Lyophilisé	STOP	Solution d'arrêt

MODE D'EMPLOI

Français

Remarque ! Autres langues disponibles à www.biohithealthcare.com.

Kit Elisa BIOHIT Total 25OH Vitamin D

Numéro de référence 602 310.02

SOMMAIRE

MODE D'EMPLOI	Français	3
1. UTILISATION PRÉVUE		5
2. CONTEXTE		5
3. PRINCIPE DU TEST		6
4. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS		6
5. TRAÇABILITÉ DES VALEURS		7
6. CONTENU DU KIT		7
6.1 Microplaque		7
6.2 Calibrateur 0		7
6.3 Calibrateur s 1-5		7
6.4 Contrôles		7
6.5 Tampon d'incubation		8
6.6 Tampon de lavage concentré		8
6.7 Tampon de conjugué		8
6.8 25OHD conjugué concentré		8
6.9 SA-HRP concentré		8
6.10 Solution de substrat		9
6.11 Solution d'arrêt		9
6.12 Mode d'emploi		9
7. MATÉRIEL NÉCESSAIRE, MAIS NON FOURNI		9
8. CONSERVATION ET STABILITÉ		9
9. PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS		10
10. PROCÉDURE DE TEST		10
10.1 Préparations		10
10.2 Protocole d'essai		11
10.3 Méthode automatisée		12
11. RÉSULTATS		12
11.1 Valeurs de contrôle de qualité		12
11.2 Calcul des résultats et données types		12
11.3 Interprétation des résultats et des intervalles de référence biologique		14
12. LIMITES DE LA PROCÉDURE		14
13. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES ANALYTIQUES		14
13.1 Limite de détection et limite de quantification		14
13.2 Intervalle de validité		15

13.3 Précision	15
13.4 Spécificité analytique.....	15
13.5 Interférence	16
13.6 Récupération et linéarité.....	16
13.7 Comparaison de la méthode.....	17
14. BIBLIOGRAPHIE	18
15. DATE DE PUBLICATION.....	19
16. GARANTIE	19
17. INFORMATIONS DE COMMANDE.....	19
18. RESUME DU PROTOCOLE	20

1. UTILISATION PRÉVUE

Le kit ELISA BIOHIT Total 25OH Vitamin D est un essai quantitatif immunoenzymatique pour la détermination *in vitro* de la 25-hydroxyvitamine D2 et D3 (25OH-D2 et 25OH-D3) dans le sérum et le plasma afin de permettre le diagnostic d'une carence, insuffisance ou intoxication en vitamine D.

2. CONTEXTE

La vitamine D est le nom usuel d'un groupe de prohormones stéroïdes liposolubles extrêmement importantes pour de multiples aspects de la santé humaine. Les deux formes correspondantes aux humains sont la vitamine D2 ou ergocalciférol et la vitamine D3 ou cholécalférol. La vitamine D2 et la vitamine D3 sont naturellement présentes dans certains aliments, et sont ajoutées à de nombreux aliments. Les apports supplémentaires en vitamine D sont recommandés dans de nombreux pays, notamment pendant la grossesse, et lorsque l'exposition au soleil est limitée pour des raisons climatiques ou culturelles. (1-3)

La forme majoritaire de la vitamine D3 dans le corps est la forme 25-hydroxy-vitamine D (25OHD3, également connue sous le nom de calcidiol). La vitamine D3 est métabolisée en 25-hydroxy-vitamine D3 dans le foie, et il a été récemment mis en évidence que la 25OHD3 est également disponible directement dans certains aliments d'origine animale. La 25OH D3 possède une activité limitée à elle seule et est un précurseur d'autres métabolites de la vitamine D. Dans les reins, la 25OHD3 est transformée en 1,25-dihydroxyvitamine D3, ou calcitriol, qui est la forme la plus active de la vitamine D3. La vitamine D2 est essentiellement métabolisée suivant les mêmes voies que la vitamine D3, et la vitamine D2 et D3 contribuent toutes les deux au taux global de vitamine D d'un individu. Par conséquent, pour diagnostiquer correctement la carence, l'insuffisance ou l'hypervitaminose en vitamine D, il est donc essentiel de mesurer les formes D2 et D3 de vitamine D. La manière la plus fiable de déterminer le taux de vitamine D d'une personne est de mesurer le taux de 25OHD dans le sang : la 25OHD a une demi-vie relativement longue de 15 jours en circulation et le niveau de 25OHD reflète la vitamine D obtenue par ingestion d'aliments et de compléments alimentaires ainsi que la vitamine D produite dans la peau. (1-9)

La 25OH vitamine D stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphore, et joue un rôle dans la résorption et la minéralisation osseuses. Une carence en vitamine D peut entraîner un affaiblissement des os, c'est un facteur de risque important dans le rachitisme, l'ostéomalacie et l'ostéoporose sénile. La mesure de la 25OH vitamine D2 et D3 est également nécessaire pour identifier la cause de concentrations sériques anormales de calcium. Un niveau trop élevé de vitamine D (hypervitaminose, intoxication à la vitamine D) peut endommager les reins et les tissus. Il a été démontré que la vitamine D joue également d'autres rôles dans l'organisme, dont la différenciation cellulaire, au niveau des phénomènes neuromusculaires, immunitaires et anti-inflammatoires. Le lien entre des troubles cognitifs, la démence et la carence en vitamine D a également été démontré. La littérature récente présente également des preuves émergentes des nombreux rôles de la vitamine D dans le cancer, le diabète et la grossesse. (1-6, 10-16)

3. PRINCIPE DU TEST

Le test ELISA BIOHIT Total 25OH Vitamin D est un essai d'immuno-absorption enzymatique compétitif sur microplaque (ELISA). Les calibrateurs, les contrôles et les échantillons sont d'abord ajoutés dans les puits de la plaque microtitre, immédiatement suivis par le tampon d'incubation. Pendant la phase d'incubation de 2 heures à température ambiante, la 25OHD est dissociée des protéines de sérum/plasma et se lie à l'anticorps monoclonal spécifique à la 25OHD tapissé sur les parois du puits de la plaque. Les puits sont lavés pour éliminer les composants non consolidés. Une solution prémélangée de dérivé de 25OHD marqué à la biotine et de la peroxydase de raifort (PR) marquée à la streptavidine est ensuite ajoutée dans le puits. Pendant l'incubation suivante, la 25OHD marquée et la 25OHD non marquée liée à l'anticorps entrent en compétition pour les sites de liaison de l'anticorps. Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les matériaux non liés, et un substrat chromogène (tétraméthylbenzidine, TMB) est ajouté. Après une incubation de 15 minutes, la réaction est arrêtée en ajoutant la solution d'arrêt et l'intensité de la couleur qui s'est développée est mesurée. La concentration de 25OHD est inversement proportionnelle à la couleur produite et peut être calculée en interpolant la dose de la courbe d'étalonnage.

4. MISES EN GARDE ET PRÉCAUTIONS

Pour usage diagnostique *in vitro*.

ATTENTION : Manipuler les échantillons de plasma comme un matériel présentant un risque biologique.

Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement contaminés et traités comme des produits infectieux. Consulter la publication du Ministère de la santé et des services sociaux des États-Unis (Bethesda, MD., USA) « Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories » (Sécurité biologique dans les laboratoires de microbiologie et les laboratoires biomédicaux), 1999, 4e éd. (CDC/NIH) et N° (CDC) 88-8395 sur les rapports de procédures de sécurité en laboratoire concernant différentes maladies, ou toute autre réglementation locale ou nationale.

Ce kit contient des réactifs obtenus à partir de composants sanguins humains. Les produits source fournis dans ce kit ont été testés pour ce qui concerne la présence d'anticorps anti-hépatite B et C et anti-VIH, et se sont avérés négatifs. Cependant, comme aucune méthode d'essai ne peut offrir la certitude absolue que ces pathogènes sont absents, respecter toutes les précautions d'usage lors de la manipulation des dérivés sanguins.

Tous les produits d'origine animale et leurs dérivés ont été prélevés à partir d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où aucun cas d'ESB n'a été déclaré. Cependant, les composants contenant des substances d'origine animale doivent être traités comme étant potentiellement infectieux.

Toujours porter des gants de protection pour manipuler les échantillons de patients. Pour tous les pipetages, utiliser un dispositif de pipetage de sécurité. Ne jamais pipeter avec la bouche. Lire toutes les instructions avant d'effectuer ce dosage. Les ingrédients contenant du ProClin peuvent causer des allergies cutanées (voir la fiche de données de sécurité). Éliminer toutes les solutions contenant du ProClin conformément à la législation locale en vigueur pour l'élimination des déchets. La solution d'arrêt contient du HCl (voir la fiche de

données de sécurité). En cas de contact, laver abondamment à l'eau. Le tampon d'incubation contient du PFOA, l'acide perfluorooctanoïque, (voir la fiche de données de sécurité). En cas de contact, laver abondamment à l'eau et savon.

5. TRAÇABILITÉ DES VALEURS

L'essai est étalonné selon la procédure de mesure de référence ID-LC/MS-MS (méthode de Ghent) (17-18) approuvée par le Vitamin D Standardization Program (VDSP, Programme de Standardisation des Dosages de la Vitamine D) établi par l'Office of Dietary Supplements (ODS, Bureau des compléments alimentaires) du National Institute of Health (NIH, Institut national de la santé) américain.

6. CONTENU DU KIT

Les réactifs permettent de remplir 96 puits. Ne pas mélanger des réactifs de différents lots de kits.

6.1 Microplaque

Contenu : 12 x 8 barrettes (avec puits détachables) dans un cadre, tapissées d'anticorps monoclonaux spécifiques à la 25OH vitamine D2 et D3. Emballées dans un sachet refermable contenant un dessiccant.

Préparation : Prêt à l'emploi. Ne pas sortir la microplaque ou les barrettes de la pochette en pellicule d'aluminium tant qu'elles ne sont pas à température ambiante (20-25 °C).

Stabilité : Stable jusqu'à la date de péremption. Jeter les barrettes après usage. Replacer les barrettes non utilisées dans la pochette en pellicule d'aluminium, la fermer hermétiquement et stocker à 2-8 °C.

6.2 Calibrateur 0

Contenu : 1 flacon de matière biologique lyophilisée avec de la gentamycine et du ProClin comme conservateurs. **Remarque :** Utiliser le calibrateur 0 pour la dilution d'échantillons présentant des valeurs supérieures au calibrateur le plus élevé.

Préparation : Reconstituer le calibrateur en ajoutant 2 ml d'eau distillée.

Stabilité : Le lyophilisat est stable jusqu'à la date de péremption. Après reconstitution, le calibrateur 0 est stable pendant huit semaines entre 2 et 8 °C. Pour de plus longues périodes de stockage, prélever des aliquotes qui seront conservés à -20 °C pendant 4 mois maximum. Éviter les cycles de congélation et décongélation successifs.

6.3 Calibrateur s 1-5

Contenu : 5 flacons contenant les calibrateurs lyophilisés 1-5 (voir les valeurs exactes sur les étiquettes des flacons) dans du plasma équin avec de la gentamycine et du ProClin comme conservateurs. Les calibrateurs ont une valeur de 25OHD spécifiques à chaque lot. La concentration exacte en 25OHD des calibrateurs est indiquée sur les flacons.

Préparation : Reconstituer les calibrateurs en ajoutant 1 ml d'eau distillée dans chaque flacon.

Stabilité : Stable jusqu'à la date de péremption. Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant huit semaines entre 2 et 8 °C. Pour de plus longues périodes de stockage, prélever des aliquotes qui seront conservés à -20 °C pendant 4 mois maximum. Éviter les cycles de congélation et décongélation successifs.

6.4 Contrôles

Contenu : 2 flacons contenant les contrôles lyophilisés (n=2) dans du sérum humain avec du ProClin comme conservateur.

Préparation : Reconstituer en ajoutant 1 ml d'eau distillée dans chaque flacon.

Stabilité : Stable jusqu'à la date de péremption. Après reconstitution, les contrôles sont stables pendant huit semaines entre 2 et 8 °C. Pour de plus longues périodes de stockage, prélever des aliquotes qui seront conservés à -20 °C pendant 4 mois maximum. Éviter les cycles de congélation et décongélation successifs.

6.5 Tampon d'incubation

Contenu : 1 flacon (20 ml) de tampon d'incubation avec de la caséine et du ProClin comme conservateurs.

Préparation : Prêt à l'emploi.

Stabilité : Stable jusqu'à la date de péremption.

6.6 Tampon de lavage concentré

Contenu : 1 flacon (10 ml) de solution de lavage concentrée (200x, TRIS-HCl).

Préparation : Diluer à 1/200 à l'eau distillée (par exemple 5 ml de tampon de lavage concentré + 995 ml d'eau). Mélanger à l'aide d'un agitateur magnétique. Préparer la solution de lavage dans un récipient en plastique propre. Pour éviter la prolifération microbienne, il est recommandé de préparer la solution de lavage le jour de son utilisation.

Stabilité : Stable jusqu'à la date de péremption.

6.7 Tampon de conjugué

Contenu : 1 flacon (30 ml) de tampon de conjugué avec de la caséine et du ProClin comme conservateurs.

Préparation : Prêt à l'emploi. Pour préparer la solution de conjugué, ajouter le conjugué concentré 25OHD et le concentré de streptavidine-PR au tampon de conjugué suivant les indications du schéma de dilution ci-après.

Stabilité : Stable jusqu'à la date de péremption.

6.8 25OHD conjugué concentré

Contenu : 1 flacon (0,3 ml) de conjugué concentré de 25OH vitamine D.

Préparation : Pour la préparation de la solution de conjugué, diluer 100x avec le tampon de conjugué suivant les instructions du schéma de dilution ci-après.

Stabilité : Le concentré est stable jusqu'à la date de péremption.

6.9 SA-HRP concentré

Contenu : 1 flacon (0,2 ml) de concentré de streptavidine-HRP.

Préparation : Pour la préparation de la solution de conjugué, diluer 200x avec le tampon de conjugué suivant les instructions du schéma de dilution ci-après.

Stabilité : Le concentré est stable jusqu'à la date de péremption.

Préparation de la solution de conjugué. La solution doit être préparée au moins 1 h et 45 minutes avant son utilisation ! Il est recommandé de préparer la solution de conjugué pendant la première phase d'incubation.

Préparer un volume adéquat de la solution de conjugué en mélangeant les 3 réactifs selon l'ordre suivant: (1) Tampon de conjugué, (2) 25OHD conjugué concentré, (3) Agitateur Vortex, (4) SA-HRP concentré, (5) Agitateur Vortex. **L'ordre chronologique d'addition de ces 3 réactifs est importante et doit être rigoureusement respecté afin d'obtenir des densités optiques reproductibles.** Stocker la solution de conjugué à température ambiante jusqu'à son utilisation. Éviter la lumière directe du soleil. La solution préparée n'est pas stable à long terme et doit être jetée si elle n'est pas utilisée le jour de sa préparation.

Schéma de dilution

Barrettes	Tampon de conjugué (ml)		25OHD conjugué concentré (µl)		SA-HRP concentré (µl)		Volume total (ml) *
	CONJ	BUF	CONJ	CONC	HRP	CONC	
1		3		30		15	3,045
2		5		50		25	5,075
3		6		60		30	6,090
4		8		80		40	8,120
5		9		90		45	9,135
6		10		100		50	10,150
7		12		120		60	12,180
8		14		140		70	14,210
9		16		160		80	16,240
10		18		180		90	18,270
11		20		200		100	20,300
12		22		220		110	22,330

* 200 µl par puits

6.10 Solution de substrat

Contenu : 1 flacon (13 ml) de tétraméthylbenzidine (TMB) en solution aqueuse.

Préparation : Prêt à l'emploi.

Stabilité : Stable jusqu'à la date de péremption. Ne pas exposer à la lumière directe.

6.11 Solution d'arrêt

Contenu : 1 flacon (13 ml) de HCl 1M.

Préparation : Prêt à l'emploi. La solution d'arrêt contient du HCl (voir la fiche de données de sécurité). En cas de contact, laver abondamment à l'eau.

Stabilité : Stable jusqu'à la date de péremption.

6.12 Mode d'emploi

Le mode d'emploi en français est inséré dans chaque kit.

D'autres langues sont disponibles à l'adresse www.biohithealthcare.com.

7. MATÉRIEL NÉCESSAIRE, MAIS NON FOURNI

Eau distillée ou déionisée, micropipettes et embouts jetables pour le dosage précis de 50 - 1000 µl, pipettes pour le dosage précis de 1-10 ml, pipette à 8 canaux permettant de doser 100 µl et 200 µl, cylindre gradué (1000 ml p. ex.), agitateur magnétique, mélangeur vortex, agitateur de plaque, laveur de microplaque, minuteur, lecteur de microplaque à principe de mesure verticale pour la lecture à 450 nm (contre 630 ou 650 nm, lecture bichromatique recommandée), tube de prélèvement sanguin en plastique pour sérum ou plasma EDTA, récipient pour bain à l'eau glacée.

8. CONSERVATION ET STABILITÉ

Conserver le kit BIOHIT 25OH Vitamin D au réfrigérateur (2-8 °C). S'il est conservé à ces températures, le kit est stable jusqu'à la date de péremption imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur chaque composant du kit. Ne pas congeler ni exposer le kit à des températures élevées ni le stocker à plus de 8 °C lorsqu'il n'est pas utilisé.

Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption imprimée sur l'étiquette. Ne pas utiliser de réactifs provenant de kits portant des numéros de lot différents ni les remplacer

par des réactifs de kits d'autres fabricants. Utiliser uniquement de l'eau distillée ou déionisée. Les composants du kit sont fournis à une concentration précise. Toute dilution supplémentaire et toute autre altération des réactifs peuvent donner des résultats incorrects. Voir le chapitre 6 pour les différents composants après reconstitution.

Toute altération de l'aspect physique des réactifs du kit peut indiquer une instabilité ou une détérioration. La solution substrat doit être incolore ou bleu pâle. Toute autre couleur indique une détérioration de la solution substrat.

9. PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES ÉCHANTILLONS

La matrice échantillon pour le kit BIOHIT Total 25OH Vitamin D est le sérum ou le plasma EDTA.

Préparation du plasma :

Après avoir prélevé l'échantillon sanguin dans un tube EDTA sans additifs, mélanger immédiatement les tubes en les tournant à l'envers 5 à 6 fois. Le plasma doit être séparé par centrifugation immédiatement 2 heures au plus tard après le prélèvement (par exemple StatSpin[®] Express 2, centrifugation pendant 2 minutes à 4440 x g, consulter les instructions du fabricant de la centrifugeuse pour la séparation du plasma). Transférer le plasma dans un tube en plastique propre.

Préparation du sérum :

Après avoir prélevé l'échantillon sanguin dans un tube à sérum sans additifs, laisser le spécimen coaguler entièrement en le laissant immobile en position verticale dans un support pour tubes à température ambiante pendant 30 min. Éliminer le caillot en centrifugeant (p. ex. Stat Spin 180s, centrifugation pendant 10 min à 2000xg, voir les instructions du fabricant du tube et de la centrifugeuse pour la séparation du sérum). La centrifugation doit avoir lieu dans un délai d'une heure après prélèvement de l'échantillon. Transférer le sérum dans un tube en plastique propre.

Stockage des échantillons :

Après la séparation sérum/plasma, l'échantillon peut être conservé pendant 4 jours au réfrigérateur à 2-8 °C et temporairement (< 24 h) à température ambiante. S'il n'est pas utilisé dans les quatre jours, le stockage à -20 °C est recommandé. Pour un stockage prolongé, le stocker à -70 °C. Mélanger soigneusement les échantillons après les avoir décongelés. Ne pas congeler et décongeler les échantillons de manière répétée. Éliminer les échantillons grossièrement hémolysés, lipémiques ou turbides.

Les échantillons susceptibles d'avoir une concentration supérieure à celle du calibrateur le plus élevé doivent être dilués avec le calibrateur 0 pour le dosage.

10. PROCÉDURE DE TEST

10.1 Préparations

Laisser tous les réactifs et la microplaque atteindre la température ambiante (20-25 °C). Reconstituer les calibrateurs lyophilisés et les contrôles avec de l'eau distillée suivant les indications du chapitre 6. Diluer le tampon de lavage concentré à 1/200 (par exemple 5 ml + 995 ml) à l'eau distillée ou déionisée. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires

pour la série. Replacer les barrettes non utilisées dans la pochette en pellicule d'aluminium avec un dessiccant, la fermer hermétiquement et stocker à 2-8 °C. Immobiliser les barrettes dans le cadre support.

Décongeler rapidement les échantillons congelés dans un bain d'eau à température ambiante en mélangeant de temps en temps. Quand ils sont presque décongelés, les placer dans un bain de glace pilée. **Lire la totalité de la procédure d'essai avant de commencer. Il est recommandé d'appliquer tous les calibrateurs et les contrôles sur la plaque comme doublons. Il est nécessaire d'utiliser les calibrateurs et les contrôles à chaque série d'essais.**

Bien mélanger tous les réactifs et les échantillons avant l'utilisation par agitation ou brassage doux. Remarque ! Toutes les incubations doivent être réalisées à 20-30 °C (température ambiante). Ne pas dépasser la température indiquée.

10.2 Protocole d'essai

ÉTAPE 1 : ÉCHANTILLON

Pipeter 50 µl de chaque calibrateur, contrôle et échantillon dans les puits de la plaque microtitre.

Remarque 1 : Les échantillons susceptibles d'avoir une concentration de 25OHD supérieure à celle du calibrateur le plus élevé doivent être dilués avec le calibrateur 0 pour le dosage.

Remarque 2 : Afin d'éviter la dérive des résultats en raison de la durée du pipetage, il ne doit pas s'écouler plus de 20 minutes entre le pipetage du premier calibrateur et du dernier échantillon.

PHASE 2 : TAMPON D'INCUBATION

Pipeter 150 µl de tampon d'incubation dans les puits. Incuber pendant 2 heures à température ambiante, sur un agitateur de plaques (300 à 700 tr/min).

Remarque ! Préparer la solution de conjugué pendant l'incubation et au moins 1h45 avant son utilisation.

ÉTAPE 3 : LAVAGE

Laver les barrettes de la microplaque 3 fois en répartissant 350 µl de solution de lavage dans chaque puits et en aspirant le contenu de chaque puits.

ÉTAPE 4 : SOLUTION DE CONJUGUÉ

Pipeter 200 µl de la solution de conjugué dans chaque puits. Incuber la microplaque pendant 30 minutes à température ambiante, sur un agitateur de plaques (300 à 700 tr/min).

ÉTAPE 5 : LAVAGE

Laver les barrettes de la microplaque 3 fois en répartissant 350 µl de solution de lavage dans chaque puits et en aspirant le contenu de chaque puits.

ÉTAPE 6 : SUBSTRAT

Pipeter 100 µl de la solution substrat (TMB) dans chaque puits. Incuber la microplaque pendant 15 minutes à température ambiante, sur un agitateur de plaques (300 à 700 tr/min). Veiller à éviter la lumière directe du soleil. Distribuer la solution substrat dans les 15 minutes après le lavage de la microplaque.

ÉTAPE 7 : ARRÊT DE LA RÉACTION

Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt dans les puits de la microplaque avec une pipette à 8 canaux.

ÉTAPE 8 : MESURE DES RÉSULTATS SUIVANT LE PRINCIPE DE MESURE VERTICAL

Mesurer l'absorbance des puits de la microplaque à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) dans un délai d'1 heure et calculer les résultats en suivant les instructions de la section 11.

10.3 Méthode automatisée

Le test 25OHD a été conçu pour les processus automatisés. Dès que les protocoles spécifiques à l'essai sont créés et validés, la réalisation du BIOHIT Total 25OHD avec un automate ELISA ouvert autonome permet d'économiser des ressources et est facile à utiliser, en évitant par exemple les troubles induits par pipetage tels que les microtraumatismes répétés.

11. RÉSULTATS

11.1 Valeurs de contrôle de qualité

Les bonnes pratiques de laboratoire préconisent l'utilisation de contrôles appropriés pour s'assurer que tous les réactifs et protocoles fonctionnent comme prévu. Le kit Biohit Total 25 OH Vitamin D est fourni avec deux contrôles spécifiques au lot. Les graphiques de contrôle qualité du lot doivent être maintenus pour suivre les performances du contrôle. Alternativement, des méthodes statistiques appropriées peuvent être utilisées pour analyser les valeurs de contrôle de laboratoire internes, qui devraient se situer dans les intervalles de confiance appropriés employés dans chaque laboratoire. Pour pouvoir accepter les résultats, il est nécessaire d'obtenir les résultats prévus pour le contrôle. Il est recommandé de vérifier visuellement l'ajustement de la courbe sélectionnée par ordinateur.

11.2 Calcul des résultats et données types

DONNÉES TYPES :

Les données suivantes sont les valeurs caractéristiques obtenues pour les calibrateurs. Ces valeurs sont fournies à titre d'exemple uniquement et ne doivent pas être substituées aux données en temps réel obtenues pour chaque série.

25OH Vitamin D ELISA	DO (450 nm)
0 ng/ml	2,96
6,0 ng/ml	2,56
13,0 ng/ml	2,03
33,0 ng/ml	1,29
69,0 ng/ml	0,68
138 ng/ml	0,23

Remarque : 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

CALCUL DES RÉSULTATS :

Préparer une courbe d'étalonnage séparément pour chaque série. Ne pas utiliser les données de séries précédentes.

Calculer les valeurs moyennes de DO pour la détermination des doubles. Pour chaque calibrateur, contrôle et échantillon, calculer le signal correspondant (%) en divisant le signal (A) par le signal obtenu depuis le calibrateur 0 (A0) et en le multipliant par 100.

$$\frac{A}{A_0} (\%) = \frac{DO (\text{étalon contrôle ou échantillon})}{DO (\text{étalon } 0)} \times 100$$

Tracer le signal correspondant moyen (A/A0, %) des calibrateurs par rapport à leur concentration (indiquée sur les flacons). Les valeurs d'absorbance sont converties en concentration en 25OHD en interpolant les inconnues de la courbe d'ajustement optimal des calibrateurs. L'utilisation de méthodes assistées par ordinateur est recommandée, dans ce cas, utiliser un ajustement de courbe à fonction logistique à 4 paramètres. La figure 1 représente une courbe d'étalonnage typique.

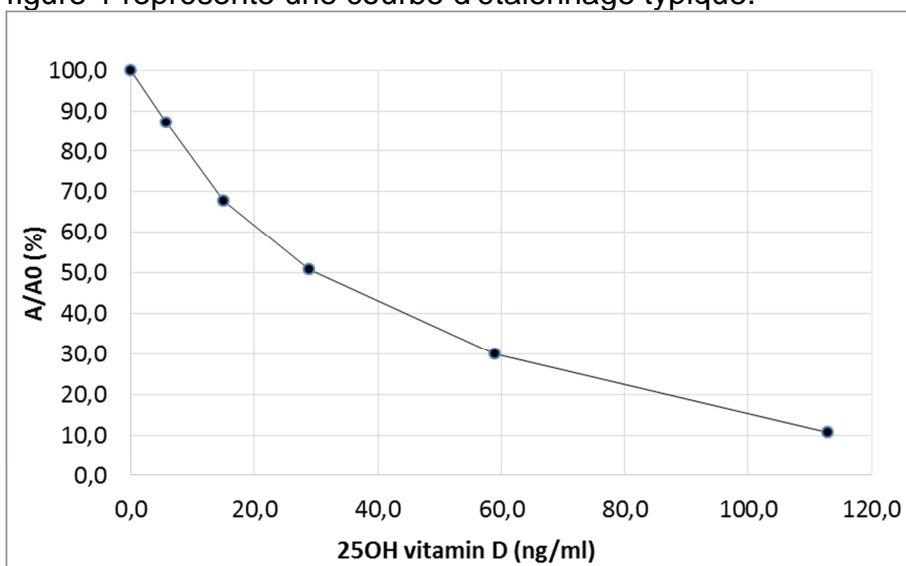


Figure 1. Exemple de courbe d'étalonnage typique.

11.3 Interprétation des résultats et des intervalles de référence biologique

Le Guide de pratique clinique (Clinical Practice Guideline) de l'Endocrine Society définit la carence en vitamine D par une concentration de 25OHD inférieure à 20 ng/ml et l'insuffisance en vitamine D par une concentration de 25OHD de 21–29 ng/ml (2). Les concentrations sériques toujours supérieures à 150 ou 200 ng/ml sont considérées comme potentiellement toxiques (1, 10, 20) et c'est sur cette base qu'une limite de sécurité de 100 ng/ml a été suggérée (20). Cependant, des effets indésirables sur la santé pourraient être associés à des concentrations bien plus faibles de 25OHD. Il a donc été suggéré d'éviter les concentrations supérieures à 50-60 ng/ml (2). Des facteurs tels que l'apport nutritionnel, la démographie et la saison sont connus pour affecter les concentrations normales de 25OH vitamine D (1, 6, 21). Chaque laboratoire doit établir sa propre plage en fonction de la population locale et des recommandations éventuelles des autorités sanitaires nationales.

La concentration optimale en vitamine D dans le sérum fait encore débat (1-2, 4, 6, 21). Une suggestion de détermination du taux sérique de 25OH vitamine D reposant sur le Guide de l'Endocrine Society (2) et la littérature récente (21-23) est présentée ci-dessous.

Taux	ng/ml
Carence	<20 ng/ml
Insuffisance	21-29 ng/ml
Taux normal	>30 ng/l
Toxicité potentielle	>100 ng/ml

Remarque : 1 ng/ml = 2,5 nmol/l

12. LIMITES DE LA PROCÉDURE

Comme dans toute procédure diagnostique, les résultats du test Biohit 25OH Vitamin D doivent être interprétés sur la base du dossier clinique du patient, et de toute autre information à la disposition du médecin.

13. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES ANALYTIQUES

Tous les essais de performances ont été réalisés à température ambiante (20-25 °C). Tous les échantillons ont été analysés avec des puits de microplaque en doubles.

13.1 Limite de détection et limite de quantification :

La limite du blanc (Limit of Blank, LoB), la limite de détection (Limit of Detection, LoD) et la limite de quantification (Limit of Quantitation, LoQ) ont été déterminées conformément à la directive EP17-A du CLSI avec une proportion de faux positifs (α) inférieure à 5 % et de faux négatifs (β) inférieure à 5 % (14). La LB a été déterminée à 1,7 ng/l et la LoD à 2,8 ng/l.

La LoQ a été déterminée en testant 5 échantillons à faible valeur en 14 essais. La LoQ a été calculée à 4,4 ng/l avec un CV% entre les mesures $\leq 20,0$.

La LoD a également été testée suivant une deuxième méthode à l'aide de 20 calibrateurs 0 et d'un autre jeu des calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration

apparente de deux écarts-types en dessous de la DO moyenne à zéro liaison, est de 1,5 ng/ml.

13.2 Intervalle de validité :

L'intervalle de validité de l'essai Biohit 25OH Vitamin D est de 4,4-123 ng/ml.

13.3 Précision

La précision de l'essai a été déterminée en analysant les échantillons sur 20 essais (pendant au moins 20 jours) à l'aide de kits de 3 lots différents.

Pour la précision de répétabilité (intra-essai), la plage de moyennes allait de 5,5 ng/ml à 81,2 ng/ml, les écarts-types de 0,4 ng/ml à 2 ng/ml, et le CV% de 2,5 % à 7,8 %.

Pour la précision intra-laboratoire (inter-essai), la plage d'écarts-types est de 1,2 ng/ml à 7,8 ng/ml, et le %CV de 4,7 % à 9,2 %.

Précision de répétabilité				Précision intra-laboratoire			
Échantil	N	[X] ± SD (ng/ml)	CV (%)	Échantil	N	[X] ± SD (ng/ml)	CV (%)
S1	24	5,5 ± 0,4	7,8	S4	39	17,7 ± 1,3	7,4
S2	35	27,4 ± 1,6	5,7	S5	10	26,3 ± 1,2	4,7
S3	24	81,2 ± 2,0	2,5	S6	21	85,4 ± 7,8	9,2

SD : Écart type, CV : Coefficient de variation

13.4 Spécificité analytique

L'essai 25OH Vitamin D a été testé pour les réactions croisées avec d'autres formes de vitamine D. La réactivité croisée de l'essai ELISA BIOHIT Total 25OH Vitamin D a été déterminée en testant des sérums avec des réactifs croisés enrichis. Les pourcentages de réactions croisées pour chaque substance, estimés par comparaison de la concentration produisant une inhibition de 50 %, sont résumés dans le tableau suivant, et sont respectivement :

Composé et concentration	% de réaction croisée
25OH-Vitamin D3	100
25OH-Vitamin D2	84
Vitamine D3	<0,2
Vitamine D2	<0,2
1,25(OH) ₂ -vitamine D3	50
1,25(OH) ₂ -vitamine D2	<0,2
24,25(OH) ₂ -vitamine D3	>100
25,26(OH) ₂ -vitamine D3	>100
3-epi-25OH-vitamine D3	<0,2

13.5 Interférence

Le test Biohit 25 OH Vitamin D a été testé pour les interférences à trois niveaux sériques de 25OHD différents (25 OHD à 6-43 ng/ml). Le biais causé par l'hémoglobine, la bilirubine non conjuguée, la bilirubine conjuguée ou les triglycérides à des concentrations interférentes respectives de 5 mg/ml, 0,5 mg/ml et 5 mg/ml, est inférieur à 10 %. Cette interférence a été considérée comme non significative. Éviter les échantillons grossièrement hémolysés, lipémiques ou turbides.

L'interférence avec l'acide ascorbique (vitamine C, 1 mg/ml testé), le conjugué de bilirubine (1 mg/ml testé) et la biotine (40 µg/ml testé) a également été testée et s'est avérée inférieure à 10 %. L'inhibition par le Zemplar (50 ng/ml) a été testée à des concentrations de 25OHD de 18 ng/ml et de 34 ng/ml, et elle s'est aussi avérée inférieure à <10 %, et est donc considérée comme une interférence non significative.

13.6 Récupération et linéarité

La récupération a été estimée en enrichissant un échantillon à faible concentration de 25OHD (8,2 ng/ml) avec différents niveaux de 25OH vitamine D2 ou D3. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

TEST DE RÉCUPÉRATION	
25OH vitamine D3 ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
0	100
31.3	96
53.9	92
25OH vitamine D2 ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
0	100
22.9	105
38.4	95

Pour l'analyse de la linéarité des dilutions, trois échantillons de concentration répartie sur la plage mesurable ont été testés à des dilutions équidistantes. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Échantillon S1

Dilution de l'échantillon	Concentration mesurée (ng/ml)	Récupération (%)
aucune	66,2	100
1/2	34,5	104
1/4	15,5	94
1/8	8,2	99
1/16	4,4	106

Échantillon S2

Dilution de l'échantillon	Concentration mesurée (ng/ml)	Récupération (%)
aucune	99,2	100
1/2	53,9	109
1/4	24,6	99
1/8	11,8	95
1/16	6,5	105

Échantillon S3

Dilution de l'échantillon	Concentration mesurée (ng/ml)	Récupération (%)
aucune	123	100
1/2	64,5	105
1/4	31,5	103
1/8	15,0	98
1/16	7,6	99

L'essai montre que les séries de dilution sont linéaires de 7,6 à 123 ng/ml (dilution 1/16). L'intervalle de validité, défini comme LQ de la concentration la plus haute mesurée, a été déterminé de 4,4 à 123 ng/ml.

13.7 Comparaison de la méthode

La performance du test ELISA BIOHIT Total 25OH Vitamin D a été déterminée par une étude de corrélation effectuée sur un total de 127 échantillons. Les échantillons ont été testés à la fois sur le test ELISA BIOHIT Total 25OH Vitamin D et sur un test d'immunodosage en chimioluminescence (CLIA) de la 25OH vitamine D du commerce. Le coefficient de corrélation entre les deux méthodes a été de 0,94, avec une pente de 0,976 et une intersection avec l'axe y de 1,94. Les résultats sont représentés dans la figure 2 ci-dessous.

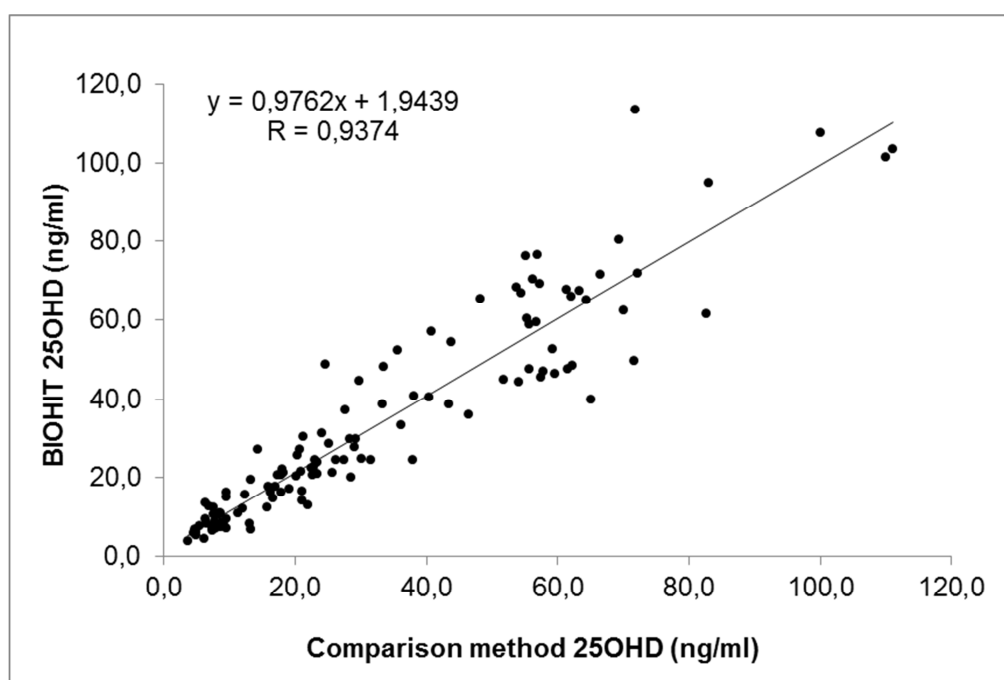


Figure 2. Corrélation de l'essai Biohit 25OH Vitamin D et d'une méthode CLIA du commerce.

14. BIBLIOGRAPHIE

1. HOLICK MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-281.
2. HOLICK MF, BINKLEY NC, BISCHOFF-FERRARI HA, GORDON CM, HANLEY DA, HEANEY RP, MURAD MH, WEAVER CM. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 6(7):1911-30.
3. OMS. Directive : Supplémentation en vitamine A chez la femme enceinte. Genève, Organisation mondiale de la Santé, 2012.
4. ROSS AC, TAYLOR CL, YAKTINE AL, DEL VALLE HB, eds. Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D. Washington, DC: National Academy Press (2010).
5. HOLICK MF Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. *Ann Epidemiol* 2009; 19:73-78.
6. GRÖBER U, SPITZ J, REICHRATH J, KISTERS K, HOLICK MF. Vitamin D Update 2013: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermatoendocrinol* 2013; 5(3): 331–347.
7. ZERWEKH JE. Blood biomarkers of Vitamin D status. *Am J Clin Nutr* 2008; 87(suppl):1087S-91S.
8. TAYLOR CL, PATTERSON KY, ROSELAND JM, WISE SA, MERKEL JM, PEHRSSON PR, YETLEY EA. Including food 25-hydroxyvitamin D in intake estimates may reduce the discrepancy between dietary and serum measures of vitamin D status. *J Nutr* 2014; 144:654-9.
9. HEANEY RP, ARMAS LA, FRENCH C. All-source basal vitamin D inputs are greater than previously thought and cutaneous inputs are smaller. *J Nutr* 2013; 143:571–5.
10. HOLICK MF. Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116:2062-2072.
11. CHRISTAKOS S, HEWISON M, GARDNER DG, WAGNER CL, SERGEEV IN, RUTTEN E, PITTAS AG, BOLAND R, FERRUCCI L, BIKLE DD. Vitamin D: beyond bone. *Ann NY Acad Sci* 2013; 1287: 45–58.
12. SCHLÖGL M, HOLICK MF. Vitamin D and neurocognitive function. *Clin Interv Aging* 2014; 9: 559–568.
13. JACOBS ET, KOHLER LN, KUNIHICO AG, JURUTKA PW. Vitamin D and Colorectal, Breast, and Prostate Cancers: A Review of the Epidemiological Evidence. *J. Cancer* 2016; 7(3):232-240.
14. NAKASHIMA A, YOKOYAMA K, YOKOO T, URASHIMA M. Role of vitamin D in diabetes mellitus and chronic kidney disease. *World J Diabetes* 2016; 7(5):89-100
15. ANIC GM, ALBANES D, ROHRMANN S, KANAREK N, NELSON WG, BRADWIN G, RIFAI N, MCGLYNN KA, PLATZ EA, MONDUL AM. Association between serum 25-hydroxyvitamin D and serum sex steroid hormones among men in NHANES. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2016; Epub ahead of print: doi:10.1111/cen.13062.
16. DE-REGIL LM, PALACIOS C, LOMBARDO LK, PEÑA-ROSAS JP. Vitamin D supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016 14;1
17. STEPMAN HC, VANDERROOST A, VAN UYTFANGHE K, THIENPONT LM. Candidate Reference Measurement Procedures for Serum 25-Hydroxyvitamin D3 and 25-Hydroxyvitamin D2 by Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry (ID-LC/ MS-MS). *Clin Chem* 2011; 57(3): 441 – 44.
18. THIENPONT LM, STEPMAN HCM, VESPER HW. Standardization of measurements of 25-Hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand. J Clin Lab Inves* 2012; 72(Suppl. 243):41-49.
19. DANIEL W, THOLEN MS. Clinical and laboratory standards Institute (CLSI) (2004). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline. CLSI document EP17-A.
20. JONES G. Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr* 2008; 88:582S-6S.
21. HEANEY RP. Health is better at serum 25(OH) D above 30ng/mL. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 136:224-8.
22. VIETH R. Why the minimum desirable serum 25-hydroxyvitamin D level should be 75 nmol/L (30 ng/ml). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25(4):681-91.
23. DAWSON-HUGHES B, HEANEY RP, HOLICK MF, LIPS P, MEUNIER PJ, VIETH R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005; 16(7):713-6.

15. DATE DE PUBLICATION

Notice du kit BIOHIT Total 25OH Vitamin D.
Version 4.0, mai 2017.

16. GARANTIE

Le fabricant doit remédier à tous les défauts détectés dans tout produit (le « produit défectueux ») qui résultent de matériaux inadaptés ou de fabrication négligente et qui empêchent le fonctionnement mécanique ou l'utilisation prévue des produits, y compris, mais sans s'y limiter, les fonctions spécifiées dans les spécifications du produit par le fabricant. CEPENDANT, LA PRÉSENTE GARANTIE EST CONSIDÉRÉE COMME NULLE SI LE DÉFAUT A ÉTÉ CAUSÉ PAR UNE UTILISATION IMPROPRE OU ABUSIVE DU PRODUIT, UN DOMMAGE ACCIDENTEL, UN STOCKAGE INAPPROPRIÉ OU ENCORE L'UTILISATION DU PRODUIT POUR DES OPÉRATIONS EN DEHORS DE LEURS LIMITATIONS OU DE LEURS SPÉCIFICATIONS, OU CONTRAIRES AUX INSTRUCTIONS FOURNIES DANS CE MODE D'EMPLOI.

Cette période de garantie pour le distributeur est définie dans le mode d'emploi des Produits et prend effet à compter de la date d'expédition du produit concerné par le fabricant. En cas de différends concernant l'interprétation, le texte anglais fait foi.

Ce kit de diagnostic Biohit a été fabriqué selon les protocoles de gestion de la qualité ISO 9001/ISO 13485 et a passé toutes les procédures d'Assurance qualité concernées qui lui sont associées.

17. INFORMATIONS DE COMMANDE

Kit Elisa BIOHIT Total 25OH Vitamin D
Référence de catalogue 602 310.02

Siège social
Biohit Oyj
Laippatie 1
00880 Helsinki, Finlande
Tél. : +358-9-773 861
Fax : +358-9-773 2867
Courriel : info@biohit.fi
www.biohithealthcare.com

18. RESUME DU PROTOCOLE

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante

Ne pas oublier de bien mélanger tous les réactifs et les échantillons juste avant le pipetage

*

Après le mélange, pipeter 50 µl des échantillons du patient, des calibrateurs et des contrôles dans les puits

*

Ajouter 150 µl de tampon d'incubation

*

Incuber pendant 2 heures à température ambiante en agitant

Pendant l'incubation, préparer la solution de conjugué (au moins 1h45 avant l'utilisation)

*

Laver les puits 3 fois avec 350 µl de solution de lavage diluée

*

Pipeter 200 µl de la solution de conjugué dans les puits

*

Incuber pendant 30 minutes à température ambiante en agitant

*

Laver les puits 3 fois avec 350 µl de solution de lavage

*

Pipeter 100 µl de la solution substrat mélangée dans les puits

*

Incuber pendant 15 minutes à température ambiante en agitant

*

Pipeter 100 µl de la solution d'arrêt mélangée dans les puits

*

Mesurer à **450 nm** (contre 630 ou 650 nm)