

1,25 (OH)₂ Vitamina D ELISA kit

Per la determinazione in vitro della 1,25 (OH)₂ Vitamina D in plasma e siero

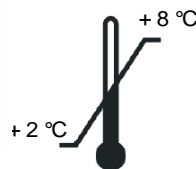
Gültig ab/valid from 17.03.2008



IMM-K 2112



48



1. APPLICAZIONE

Il kit ELISA (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay) presentato è indicato per la determinazione quantitativa della 1,25-diidrossi vitamina D in siero e plasma. E' da utilizzarsi solamente per la diagnosi *in vitro*.

2. INTRODUZIONE

La vitamina D viene sia prodotta nella pelle (sotto influenza dei raggi UV) sia introdotta con l'alimentazione. Il tipo di vitamina D immagazzinato, chiamato 25-idrossi vitamina D, si forma nel fegato. L'ormone 1,25-diidrossi vitamina D (ormone D) si forma in un secondo passaggio di idrossilazione nel rene. L'enzima responsabile, l'1 α -idrossilasi renale, è sottoposto a un rigido controllo ormonale (specialmente dall'ormone paratiroideo) e la sua attività è influenzata dalle concentrazioni di calcio e fosfato nel siero.

La concentrazione nel siero di 1,25-diidrossi vitamina D normalmente si autoregola secondo la richiesta da parte dell'organismo. Spostamenti dall'intervallo normale di 1,25-diidrossi vitamina D devono quindi sempre essere interpretate nel contesto degli altri parametri del metabolismo del calcio. La concentrazione nel siero di 1,25-diidrossi vitamina D diminuisce solo in rari casi di mancanza di vitamina D. Per la diagnosi di mancanza di vitamina D deve essere misurato il metabolita precursore, la 25-idrossivitamin D.

La ragione di una non fisiologica mancanza di 1,25-diidrossi vitamina D va ricercata in disturbi metabolici, causati da difetti genetici dell'enzima 1 α -idrossilasi (rari) o da malfunzioni renali (più comuni). Anche una funzionalità renale leggermente indebolita può portare a una diminuzione della concentrazione di 1,25-diidrossi vitamina D.

Poiché la 1,25-diidrossi vitamina D svolge un'importante funzione nel metabolismo del calcio così come nell'aumentare la secrezione dell'ormone paratiroideo dalla ghiandola paratiroide, l'aumento del malfunzionamento renale porta allo sviluppo dell'osteopatia renale, che è caratterizzata da osteomalacia e osteite fibrosa.

Il trattamento dell'osteopatia renale consiste nella somministrazione di 1,25-diidrossi vitamina D (calcitriolo) o del proormone 1 α -idrossi vitamina D. Nelle malfunzioni nei tubuli renali sono rilevati livelli diminuiti o relativamente bassi di 1,25-diidrossi vitamina D (ad es. diabete insipido, sindrome di Fanconi). Una overproduzione non fisiologica di 1,25-diidrossi vitamina D insorge nelle granulomatosi (ad es. sarcoidosi), nelle quali avviene sintesi extra renale di 1,25-diidrossi vitamina D. Questo può portare ad ipercalcemia. Anche nell'ipercalcemia idiopatica si trova un elevato livello di 1,25-diidrossi vitamina D. Concentrazioni aumentate di 1,25-diidrossi vitamina D sono rilevate in casi (rari) di recettori per la vitamina D non funzionali, in un'alimentazione carente di calcio oppure come risultato di un'overproduzione di ormone paratiroideo (ipertiroidismo primario).

Indicazioni

- Difetti della funzionalità renale
Malattia renale cronica
Emodialisi a seguito di trapianto di rene
- Osteopatia renale
- Osteomalacia da vari tipi di disturbi del metabolismo della vitamina D
- Disturbi della funzionalità dei tubuli renali (diabete insipido, sindrome di Fanconi)
- Monitoraggio della terapia con metaboliti attivi della vitamina D
- Ipercalciuria idiomatica
- Ipercalcemia.

3. MATERIALE FORNITO

N°. catalogo	denominazione	componenti del kit	quantità
K2112MTP	piastra	Supporto con strisce pretrattate	12 x 8 pozzetti
K2112WP	WASHBUF	Tampone di lavaggio ELISA 10x	100 ml
K2112E	ETHANOL	Etanolo pronto all'uso	1,5 ml
K2112TR	TRIS-HCL	Tampone Tris-HCl pronto all'uso	30 ml
K2112A1	AB	Anticorpo anti 1,25-diidrossi vitamina D pronto all'uso	25 ml
K2112ST	STD	Standard che include NSB pronto all'uso (per intervallo dei valori vedere le istruzioni o l'etichetta)	7 x 25 ml
K2112KO	CTRL	Controllo pronto all'uso (per intervallo dei valori vedere le istruzioni o l'etichetta)	2 x 2,5 ml
K2112K	CONJ	Coniugato, anticorpo policlonale marcato con per ossidasi, pronto all'uso	22 ml
K2112TMB	SUB	Substrato TMB (tetrametilbenzidina) pronto all'uso	2 x 15 ml
K2112AC	STOP	Soluzione di arresto pronta all'uso	15 ml

4. MATERIALE RICHIESTO NON FORNITO

- Acqua bidistillata
- 48 colonne Chromabond (n° catalogo: Se2112)
- 48 cartucce di silice (cartucce per estrazione in fase solida, n° catalogo: Sb2221)
- Diisopropil etero (p.A.) 99,0%
- Isopropanolo (p.A.) 99,9%
- n-esano (p.A.) 98,3%
- Metanolo (p.A.) 99,9%
- Provette di vetro (non di plastica) 75 x 12
- Rack per estrazione (n° catalogo: K2221sv)
- Pipettatori di precisione e puntali disposable per dispensare 10-1000 µl
- Involucro per coprire la piastra microtiter
- Agitatore orizzontale per piastre microtiter
- Dispensatore per micropiastre o dispensatore automatico
- Centrifuga da 3000 x g
- Vortex-mixer
- Centrifuga da vuoto o distributore di azoto
- Vetreria da laboratorio
- Lettore di micropiastre a 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 620 o 690 nm).

5. PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

- Al fine di poter utilizzare più volte i reattivi assicurarsi che siano conservati alle condizioni descritte sulle etichette. **Preparare solo le quantità necessarie per ciascuna determinazione.** Il kit può essere utilizzato per 4 volte entro la data di scadenza espressa sulla confezione.
- Il **tampone ELISA concentrato** (WASHBUF) deve essere diluito con acqua bidistillata **1:10** prima dell'uso (100 ml di concentrato + 900 ml di acqua bidistillata), miscelare bene. Potrebbero verificarsi delle cristallizzazioni dovute all'elevata concentrazione di sali nella soluzione madre. I cristalli devono essere sciolti a temperatura ambiente o in acqua a 37°C prima della diluizione. Il tampone concentrato è stabile a **2-8°C** fino alla data di scadenza presente sull'etichetta. **La soluzione diluita può essere conservata in un flacone chiuso a 2-8°C per 1 mese.**
- Tutti gli altri reagenti sono pronti all'uso. Sono stabili fino alla data di scadenza (vedere l'etichetta della confezione) se conservati a **2-8°C**.

6. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

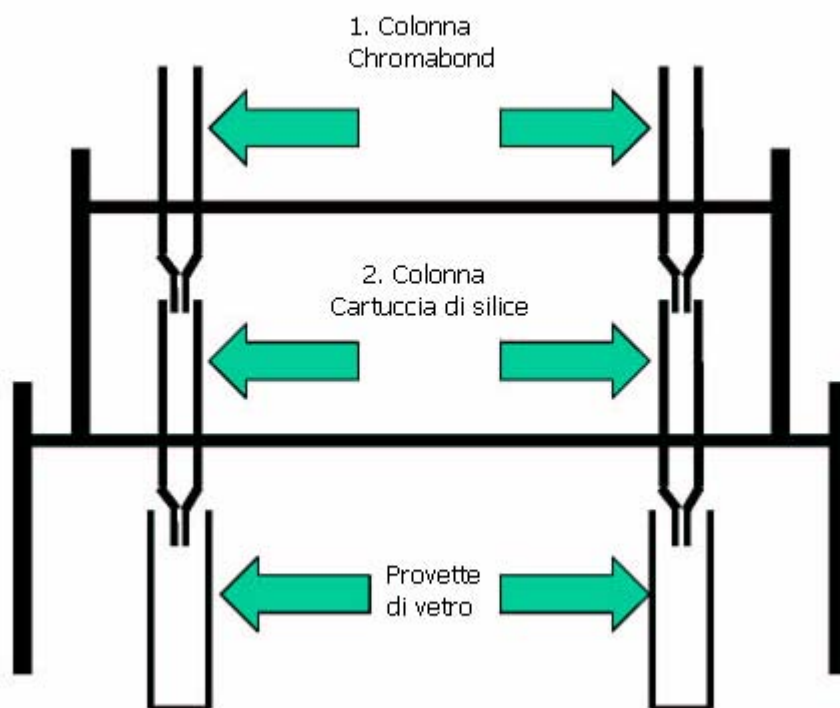
Campioni di siero/plasma

Il sangue appena raccolto deve essere centrifugato entro un'ora. Conservare i campioni a -20°C se non vengono analizzati il giorno stesso. Campioni lipemici o emolizzati possono dare risultati errati. I campioni devono essere mescolati bene prima dell'analisi. Si raccomanda di eseguire analisi in duplicato per ciascun campione.

Si raccomanda di applicare 1000 μl di campione per cartuccia. Se il volume del campione è inferiore a 1000 μl aggiungere una quantità appropriata di tampone Tris-HCl nella colonna e poi il campione (minimo 500 μl) per un volume totale di 1000 μl .

Per calcolare la concentrazione ogni risultato deve essere moltiplicato per il rispettivo fattore di diluizione.

Estrazione del campione



- L'unità di estrazione è costituita da tre parti che vanno poste una sopra l'altra.
- La parte superiore è usata per le colonne Chromabond (rack di estrazione I), la parte inferiore per le cartucce di silice (rack di estrazione II).
- Durante l'applicazione del campione e l'intera procedura di lavaggio tutta l'unità deve essere posta in un contenitore grande abbastanza da raccogliere i solventi di estrazione (rack di estrazione I e rack di estrazione II). Dopo il primo passaggio di estrazione (etere) rimuovere il rack di estrazione I con le colonne Chromabond.
- Si raccomanda di disporre le provette di vetro direttamente sotto le cartucce per l'ultimo passaggio di eluizione. Le provette possono poi essere usate direttamente per il successivo passaggio del saggio.

7. PROCEDURA

Principio del test

Il saggio utilizza una tecnica competitiva Enzyme-Immuno-Assay (EIA) con un anticorpo monoclonale selezionato che riconosce la 1,25-diidrossi vitamina D.

Standard, NSB (non-specific binding), controlli e campioni di pazienti che sono testati per la 1,25-diidrossi vitamina D, dopo il passaggio di estrazione, sono incubati con l'anticorpo. La soluzione pre-incubata è poi trasferita alla micropiastra coattata con la 1,25-diidrossi vitamina D. Durante questo passaggio di incubazione la 1,25-diidrossi vitamina D nel campione e una quantità fissa di 1,25-diidrossi vitamina D legata al pozzetto della piastra competono per il legame con l'anticorpo. In seguito un anticorpo anti topo coniugato con perossidasi viene aggiunto in ciascun pozzetto e si forma un complesso 1,25-diidrossi vitamina D – anticorpo – coniugato. La Tetrametilbenzidina (TMB) è usata come substrato della perossidasi. Al termine viene aggiunta una soluzione di arresto acida per terminare la reazione e il colore cambia da blu a giallo. L'intensità del colore giallo è inversamente proporzionale alla concentrazione di 1,25-diidrossi vitamina D. Usando i valori ottenuti dagli standard si crea una curva dose risposta di unità di assorbanza (densità ottica, OD a 450 nm) contro concentrazione. La 1,25-diidrossi vitamina D nei campioni viene determinata da questa curva.

Estrazione

1. Applicare **1000 µl** di standard, NSB, controllo e campione (plasma o siero) sulla colonna Chromabond e incubare per 10 minuti. Per campioni con volume inferiore a 1000 µl bagnare le cartucce con tampone Tris-HCl, ad es. pipettare nella cartuccia 500 µl di Tris-HCl e 500 µl di campione.
2. Estrarre la vitamina D dalla colonna Chromabond con **4 x 1 ml** di diisopropil etero (3 minuti per ogni eluizione). L'eluato deve gocciolare dalla colonna Chromabond direttamente su una cartuccia di silice non trattata e asciutta. **Dopo l'estrazione la colonna Chromabond deve essere rimossa (rack di estrazione I).**
3. Lavare la cartuccia di silice (rack di estrazione II) con **5 x 2 ml di Isopropanolo/Esano (4/96 v/v).**
4. Lavare la cartuccia di silice (rack di estrazione II) con **3 x 2 ml di Isopropanolo/Esano (6/94 v/v).**
5. Fluire la 1,25-diidrossi vitamina D dalla cartuccia di silice con **2 x 2 ml di Isopropanolo/Esano (25/75 v/v).** Nota: le provette di vetro (rack di estrazione III) devono essere poste direttamente sotto le cartucce di silice.
6. Far evaporare l'eluato con un flusso di azoto a 37°C o in una centrifuga a vuoto.

Pre-incubazione

1. Aggiungere **20 µl** di etanolo in ciascuna provetta di vetro. Immediatamente dopo aver aggiunto l'etanolo mescolare gentilmente ciascuna provetta al fine di evitare ogni possibile evaporazione.
2. Aggiungere **450 µl** di soluzione di anticorpo in ciascuna provetta di vetro. La soluzione di anticorpo è viscosa. Pipettare lentamente e con attenzione. Mescolare completamente.
3. Coprire le provette di vetro con parafilm e incubare esattamente per **1 ora** a temperatura ambiente.

Procedura del test

Prima di usare il kit consentire a tutti i reattivi e ai campioni di raggiungere la temperatura ambiente (18-26°C) e miscelarli bene
Riportare le posizioni di STD/NSB/SAMPLE/CTRL (Standard/NSB/Campione/Controllo) in un protocollo operativo.
Preparare le strisce dal kit. Stoccare le strisce che non vengono utilizzate a 2-8°C dopo averle coperte. Sono stabili fino alla data di scadenza.
Aggiungere 200 µl di STD/NSB/SAMPLE/CTRL in duplicato nei rispettivi pozzetti. Tutte queste soluzioni sono viscosi. Pipettare lentamente e attentamente. Si raccomanda di bagnare il puntale della pipetta prima di usarlo per trasferire il pre-incubato.
Coprire bene la piastra e incubare per 18-22 ore a 4-8°C*.
Eliminare il contenuto di ciascun pozzetto. Lavare 5 volte dispensando 250 µl di WASHBUF (tampone di lavaggio) diluito in ciascun pozzetto. Dopo il passaggio finale di lavaggio rimuovere il tampone residuo picchiando leggermente la piastra su carta assorbente.
Aggiungere 200 µl di CONJ (coniugato) in ciascun pozzetto.
Coprire bene la piastra e incubare per esattamente 1 ora a temperatura ambiente (18-26°C) su un agitatore orizzontale.
Eliminare il contenuto di ciascun pozzetto. Lavare 5 volte dispensando 250 µl di WASHBUF (tampone di lavaggio) diluito in ciascun pozzetto. Dopo il passaggio finale di lavaggio rimuovere il tampone residuo picchiando leggermente la piastra su carta assorbente.
Aggiungere 200 µl di SUB (substrato) in ciascun pozzetto.
Incubare per 20 – 30 minuti a temperatura ambiente (18-26°C) al buio.**
Aggiungere 50 µl di STOP (soluzione di arresto) in ciascun pozzetto, mescolare completamente.
Determinare immediatamente l'assorbanza con un lettore di micropiastre a 450 nm contro 620 (o 690) nm come riferimento. Se non vi è la possibilità di una lunghezza d'onda di riferimento, leggere solo a 450 nm. Se lo standard più alto cade fuori dalla capacità del fotometro, l'assorbanza deve essere misurata immediatamente a 405 nm contro un riferimento di 620 nm.

* Come in ogni saggio immunologico competitivo, tempi di incubazione consistenti e temperatura sono essenziali per confronti accurati piastra con piastra. Fluttuazioni nell'incubazione overnight possono portare a un aumento del CV intraserie. E' quindi raccomandabile usare sempre lo stesso tempo di incubazione, ad es. 20 ore.

** L'intensità del cambio di colore è sensibile alla temperatura. Si raccomanda di osservare il cambiamento di colore e di fermare la reazione dopo un buon differenziamento.

8. RISULTATI

I seguenti algoritmi possono essere utilizzati alternativamente per calcolare i risultati. Si raccomanda di usare l' "algoritmo a 4 parametri".

1. algoritmo a 4 parametri

si suggerisce di utilizzare in ordinata lineare la densità ottica e in ascissa logaritmica la concentrazione. Quando si usa un'ascissa logaritmica, lo zero del calibratore deve essere corrispondente ad un valore inferiore ad 1 (es. 0.01)

2. calcolo point-to-point

si raccomanda un'ordinata lineare per la densità ottica ed un'ascissa lineare per la concentrazione.

3. curva algoritmica

si suggerisce di utilizzare in ordinata lineare la densità ottica e in ascissa logaritmica la concentrazione. Quando si usa un'ascissa logaritmica, lo zero del calibratore deve essere corrispondente ad un valore inferiore ad 1 (es. 0.01)

L'accettabilità dei risultati potrebbe essere verificata prima di una loro validazione. Se questo non è possibile con il programma in uso, un controllo dei risultati in doppio potrebbe essere fatto manualmente.

9. LIMITAZIONI

Campioni con livelli di 1,25-diidrossi vitamina D maggiori rispetto al valore dello standard più alto devono essere testati di nuovo. Usare al posto di 1 ml di campione un volume di 500 µl o 750 µl sulla colonna Chromabond pre-tamponata. Ricalcolare il risultato con il fattore di diluizione.

10. CONTROLLO DI QUALITA'

Immundiagnostik AG raccomanda l'uso di campioni di controllo per il controllo di qualità interno, se sono reperibili.

I campioni di controllo dovrebbero essere analizzati ad ogni seduta. L'accettabilità dei risultati deve essere verificata con appropriati metodi statistici. I risultati dei campioni dei pazienti potrebbero non essere validi se nella stessa seduta uno o più valori del controllo di qualità sono fuori dai limiti.

Valori attesi

Intervallo normale (plasma o siero)

Adulti in buona salute (età 20-50):

17 – 53 pg/ml

Bambini fino a 12 anni:

valori più alti di circa il 40%

Donne in stato di gravidanza (8-42 settimane)

valori più alti di circa il 60%

Persone con oltre 70 anni:

valori più bassi di circa il

40%

L'intervallo di normalità è indipendente dalla stagione.

Si suggerisce a ciascun laboratorio di stabilire dei propri intervalli di concentrazione.

11. CARATTERISTICHE DEL TEST

Precisione e riproducibilità

Intra-serie (n=20)		
Campione	1,25 (OH) ₂ Vitamina D [pg/ml]	CV [%]
1	55.3	6.69

Inter-serie (n=20)		
Campione	1,25 (OH) ₂ Vitamina D [pg/ml]	CV [%]
1	39	9

Sensibilità

La sensibilità è stata misurata a B₀ + 2SD. Lo zero di riferimento è stato misurato 20 volte.

Campione	1,25 (OH) ₂ Vitamina D valore medio [OD]	Deviazione standard (SD)	Limite di lettura [pg/ml]
1	1.201	0.025	4.8

Crossreattività

1,25-(OH) ₂ Vit D ₃	100%
Vit D ₂ & D ₃	< 0.01%
24,25-(OH) ₂ Vit D ₃	< 0.1%
25-OH Vit D ₂	< 0.1%
25-OH Vit D ₃	< 0.01%
Alfacalcidolo	< 0.003%

Linearità

Sono stati analizzati volumi diversi di due campioni di pazienti. I risultati sono mostrati di seguito:

n=2

Campione	Diluizione	Atteso [pg/ml]	Rilevato [pg/ml]
A	1000	21.2	21.2
	750	15.9	15.9
	500	10.6	11.2
	250	5.3	8.5
B	1000	29.6	29.6
	750	22.2	27.3
	500	14.8	16.9
	250	7.4	7.2

12. RIGENERAZIONE DELLE CARTUCCE DI SILICE

Le cartucce di silice possono essere utilizzate per un totale di 5 volte se vengono rigenerate come di seguito. La rigenerazione può essere fatta direttamente dopo l'estrazione. Le cartucce di silice devono essere asciugate prima del successivo utilizzo.

- **2 x 2 ml** metanolo
- **2 x 2 ml** n-esano
- Asciugare le colonne in termostato.

13. PRECAUZIONI

- Solo per diagnostica *in vitro*.
- Devono essere osservate le linee guida del controllo di qualità.
- Il materiale di derivazione umana presente nel kit è stato testato ed è negativo per HIV, Epatite B ed Epatite C. In ogni caso, per ragioni di sicurezza, si raccomanda di trattare ogni componente come potenzialmente infetto.
- I reagenti contengono sodio azide e mertiolato come battericida. Sono entrambi tossici. I substrati per le reazioni enzimatiche colorimetriche sono tossici e cancerogeni. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La soluzione di arresto è composta da acido solforico, che è un acido forte. Anche diluito va maneggiato con cura. Può causare bruciature e deve essere maneggiato con guanti, occhiali e camice. Gli schizzi devono essere immediatamente risciacquati con abbondanti quantità d'acqua.

14. ACCENNI TECNICI

- Non utilizzare componenti del kit di lotti differenti.
- I reagenti non devono essere usati oltre la data di scadenza espressa sull'etichetta.
- La soluzione del substrato deve rimanere incolore fino all'utilizzo.
- Per assicurare risultati corretti è necessario chiudere in modo appropriato le piastre durante le incubazioni.
- Evitare la produzione di schiuma quando si miscelano i reagenti.
- La seduta deve procedere seguendo quanto spiegato nel manuale.

15. NOTE GENERALI SUL TEST

- Questo sistema è stato prodotto e presentato sul mercato in accordo con le linee guida IVD del 98/79/EC.
- Tutti i reagenti contenuti nel kit sono solo per uso diagnostico *in vitro*.
- Sono state osservate le linee guida per i laboratori bio-medici.
- I tempi di incubazione, le temperature di incubazione e i volumi utilizzati sono definiti nella procedura. Ogni variazione della procedura del test, non accordata con la casa produttrice, può influenzare i risultati del test. Immundiagnostik AG non è responsabile degli eventuali danni recati da un uso non appropriato.
- Segnalazioni e reclami devono essere fatti entro 14 giorni dal ricevimento del prodotto. Il prodotto deve essere rispedito ad Immundiagnostik accompagnato da una spiegazione scritta.

16. BIBLIOGRAFIA

1. Wildermuth S. et al., 1993; Clinica chimica Acta, 220, 61
2. Schilling M. et al., 1987; Clinical Chemistry, 33, 187
3. Armbruster F.P. et al., 1990; Ärztl. Lab., 36, 75
4. Durham B.W. et al., 1995; Ann. Clin. Biochem., 32, 77
5. Hollis B.W., 1996; Calcif. Tissue Int., 58, 4
6. Hollis B.W., 1995; Clinical Chemistry, 41, 1313
7. Iqbal S.J. et al., 1996; Clinical Chemistry, 42, 112
8. Withold W. et al., 1995; Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 33, 15