

Dosage immuno-enzymatique pour la détermination quantitative *in vitro* de la 25-hydroxyvitamine D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> (25OH-D<sub>2</sub> et 25OH-D<sub>3</sub>) dans le

**R<sub>x</sub> ONLY**

## RÉSUMÉ

### Préparation de réactif et d'échantillon

- Diluer le concentré tampon de lavage de 1:200 avec de l'eau désionisée
- Reconstituer les échantillons étalon et les échantillons témoin avec de l'eau désionisée ou de l'eau distillée

### Procédure de dosage

Pipeter **50 µl** de solution étalon, de solution témoin et d'échantillons dans les puits de test

Pipeter **150 µl** de tampon de dosage dans tous les puits

Laisser incuber **2 heures** sous agitation (400 tr/min) à température ambiante Préparer\* la solution de conjugué de HRP de travail pendant l'incubation et au moins 1 heure et 45 minutes avant utilisation.

**\*REMARQUE : La séquence de préparation est critique. Voir PRÉPARATION DES RÉACTIFS.**

Laver **3 fois** avec la solution de lavage 1X

Pipeter **200 µl** de solution de conjugué de HRP

Laisser incuber **30 minutes** sous agitation (400 tr/min) à température ambiante

Laver **3 fois** avec la solution de lavage 1X

Pipeter **100 µl** de solution chromogénique

Laisser incuber **15 minutes** sous agitation (400 tr/min) à température ambiante, éviter la lumière directe du soleil

Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt (lire les résultats au bout d'1 heure)

Lire les absorptions à **450 nm** (filtre de référence : 630 nm ou 650 nm)



## UTILISATION PREVUE

Le test MicroVue pour le dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D a pour objectif la détermination quantitative de la 25-hydroxy-vitamine D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub> (25OH D<sub>2</sub> et 25OH D<sub>3</sub>) dans le sérum humain. Les résultats doivent être utilisés conjointement à ceux d'autres tests cliniques et en laboratoire afin de déterminer le taux de vitamine D d'un patient.

## RESUME ET EXPLICATIONS

Vitamine D est le terme générique utilisé pour désigner la vitamine D<sub>2</sub>, ou ergocalciférol, et la vitamine D<sub>3</sub> ou cholécalciférol. Les êtres humains produisent naturellement de la vitamine D<sub>3</sub> lorsque la peau est exposée aux rayons UV émis par le soleil. La vitamine D<sub>3</sub> est métabolisée principalement dans le foie en 25-hydroxy-vitamine D<sub>3</sub> (25OH D<sub>3</sub>), qui constitue la forme principale de vitamine D circulant dans le corps. La 25-OH-vitamine D<sub>3</sub> est un précurseur des autres métabolites de la vitamine D, et son activité propre est limitée. Le dérivé le plus actif est la 1,25-hydroxy-vitamine D<sub>3</sub>, produite par le rein (ou le placenta) par 1-hydroxylation de la 25-OH-vitamine D<sub>3</sub>. La 25-OH-vitamine D stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphore ainsi que la résorption et la minéralisation des os. La 25-OH-vitamine D peut également être active dans d'autres tissus responsables du transport du calcium (placenta, rein, glande mammaire, etc.) et dans la glande endocrine (glandes parathyroïdiennes, cellules bêta, etc.).

La vitamine D<sub>3</sub> et la vitamine D<sub>2</sub> sont également présentes par ingestion de nourriture ou de compléments alimentaires. Étant donné que la vitamine D<sub>2</sub> et la vitamine D<sub>3</sub> sont métabolisées de façon similaire, toutes deux contribuent au taux de vitamine D d'un individu. C'est pourquoi il est très important d'effectuer une mesure identique des deux formes de 25-OH-vitamine D afin d'établir un diagnostic correct de carence, d'insuffisance ou d'intoxication par la vitamine D.

Une carence en vitamine D est un facteur de risque important de rachitisme, d'ostéomalacie, d'ostéoporose sénile, de cancer et de problèmes durant la grossesse. La mesure des deux formes de 25-OH-vitamine D est également requise pour déterminer la cause d'une concentration anormale de calcium sérique chez les patients. Il a été montré qu'une intoxication par la vitamine D entraînait des dommages aux reins et aux tissus.

## PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Le test MicroVue pour le dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D est un dosage immuno-enzymatique en phase solide quantitatif effectué sur des plaques de micro-titrage. Lors de la phase d'incubation de 2 heures, à température ambiante, la 25-OH-vitamine D totale (D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>) présente dans les étalons, les contrôles et les échantillons est dissociée des protéines sériques de liaison, et elle se fixe aux sites de liaison d'un anticorps monoclonal spécifique. Après le premier cycle de lavage, une quantité fixe de 25-OH-vitamine D biotinylée mise en présence de peroxydase de raifort (HRP) entre en concurrence avec la 25-OH-vitamine D<sub>2</sub> et avec la 25-OH-vitamine D<sub>3</sub> présentes sur les sites de liaison de l'anticorps monoclonal spécifique. Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la plaque de micro-titrage est lavée pour stopper la réaction de concurrence. La solution chromogénique (TMB) est ajoutée et incubée pendant 15 minutes. La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'arrêt, et la microplaque de dosage est alors lue à la longueur d'ondes appropriée. La quantité de substrat converti est déterminée par colorimétrie en mesurant l'absorption, qui est inversement proportionnelle à la concentration en 25-OH-vitamine D totale (D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>).

Une courbe d'étalonnage est tracée, laquelle est utilisée pour calculer les concentrations en 25-OH-vitamine D totale (D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>) des échantillons par interpolation des doses.

## REACTIFS ET MATERIELS FOURNIS

Le dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D MicroVue est constitué des éléments suivants :

- |            |   |  |
|------------|---|--|
| <b>A</b>   | <b>Échantillon-étalon de 25-OH-vitamine D (échantillon-témoin 0) Partie A</b>   | <b>1 x 1 ml (étalon A)</b>                 |
|            | Lyophilisé. L'échantillon-étalon zéro est une matrice biologique (plasma humain) avec gentamycine et ProClin®. Reconstituer avec 1 ml d'eau désionisée. |  |
| <b>B-F</b> | <b>Échantillons-étalons de 25-OH-vitamine D B-F (échantillons-témoins 1-5) Partie B-F</b>   | <b>1 x 1 ml (échantillons-étalons B-F)</b> |
|            | Lyophilisé. Sérum de cheval avec gentamycine et Proclin®. Reconstituer chaque flacon avec 1 ml d'eau désionisée.  |  |
| <b>L</b>   | <b>Échantillon de contrôle de 25-OH-vitamine D (échantillon de contrôle 1) Partie 4219716</b>   | <b>1 x 1 ml</b>                            |
|            | Lyophilisé. Sérum humain avec ProClin®. Reconstituer avec 1 ml d'eau désionisée.  |  |
| <b>H</b>   | <b>Échantillon de contrôle de 25-OH-vitamine D (échantillon de contrôle 2) Partie 4219717</b>   | <b>1 x 1 ml</b>                            |
|            | Lyophilisé. Sérum humain avec ProClin®. Reconstituer avec 1 ml d'eau désionisée.  |  |
| <b>1</b>   | <b>Microplaque de dosage (plaque de micro-titrage) Partie 4219708</b>   | <b>12 x 8 puits</b>                        |
|            | Plaque de micro-titrage comportant 96 puits recouverts d'anticorps monoclonal anti-25-OH-vitamine D <sub>2</sub> et D <sub>3</sub> .                    |  |
| <b>2</b>   | <b>Solution d'arrêt Partie SS04</b>   | <b>12 ml</b>                               |
|            | Contient de l'acide chlorhydrique (HCl) 1M.   |  |
| <b>3</b>   | <b>Solution concentrée de tampon de lavage 200X (solution de lavage) Partie 4219711</b>   | <b>10 ml</b>                               |
|            | Contient du TRIS-HCl. Diluer avec de l'eau désionisée.  |  |
| <b>4</b>   | <b>Substrat de TMB (Solution chromogénique de TMB) Partie SB04</b>  | <b>12 ml</b>                               |
|            | Prêt à l'emploi. Contient du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidène (TMB).  |  |
| <b>5</b>   | <b>25-OH-vitamine D biotinylée (Concentré conjugué) Partie de 4119703</b>   | <b>0,3 ml</b>                              |
|            | Concentré conjugué de 25-OH. Diluer avec une solution de reconstitution.  |  |
| <b>6</b>   | <b>HRP concentré Partie 4119713</b>   | <b>0,2 ml</b>                              |
|            | Contient du HRP concentré.  |  |
| <b>7</b>   | <b>Solution de reconstitution (Tampon conjugué) Partie 4119705</b>  | <b>30 ml</b>                               |
|            | Prêt à l'emploi. Solution tampon conjuguée avec caséine et ProClin®.  |  |
| <b>8</b>   | <b>Solution tampon de dosage (Tampon d'incubation) Partie 4219713</b>   | <b>20 ml</b>                               |
|            | Prêt à l'emploi. Solution tampon d'incubation avec caséine et ProClin®.   |  |
- ProClin® est une marque déposée de la société Rohm and Haas.

**Remarque :** Utiliser de la 25-OH vitamine D contrôle bas : (contrôle 1), ou un échantillon de sérum précédemment quantifié comme ayant une concentration de 25-OH inférieure à (<) 25 ng/ml et supérieure à (>) 4,4 ng/ml, pour la dilution des échantillons avec des valeurs supérieures aux étalons les plus élevés.

Utilisez le contrôle 1, ou l'échantillon de sérum approprié, pour diluer les échantillons à haute concentration 2X. Utilisez la concentration calculée de contrôle 1, ou l'échantillon de sérum approprié, lors du calcul du résultat de dilution.

### Calculs pour les échantillons dilués :

Valeur de l'échantillon = (valeur mesurée – F1\*contrôle mesuré 1) / F2

Où les valeurs suivantes pour F1 et F2 sont :

- Échantillon dilué 2X, F1 = 0,5 ; F2 = 0,5
- Échantillon dilué 4X, F1 = 0,75 ; F2 = 0,25
- Échantillon dilué 8X, F1 = 0,875 ; F2 = 0,125

#### Exemple :

Un échantillon en dehors de la courbe d'étalonnage est dilué 4X avec le contrôle 1 et est mesuré à 70 ng/ml. Le contrôle 1 est mesuré dans le même cycle à 20 ng/ml.

Dilution 4X, F1 = 0,75 ; F2 = 0,25

Valeur calculée de l'échantillon =  $(70 - 0,75 * 20) / 0,25 = 220$  ng/ml

Aucun matériel de référence international n'est disponible.

## MATÉRIEL REQUIS NON FOURNI

Les éléments suivants sont requis, mais non fournis dans la trousse :

- Eau désionisée ou distillée
- Pipettes permettant de délivrer : 50 µl, 150 µl, 200 µl et 1 ml (l'utilisation de pipettes à contenance précise comportant un embout plastique jetable est recommandée)
- Vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur de plaques (400 tr/min)
- Laveur de microplaques de dosage
- Lecteur de microplaques de dosage capable de lire à 450 nm et à 650 nm ou à 630 nm (lecture bichromatique)

## AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

### Sécurité

- Pour le diagnostic *in vitro* seulement.
- Les composants du sang humain inclus dans cette trousse ont été testés selon des méthodes approuvées par l'Union européenne et/ou la FDA et ont obtenu des résultats négatifs aux tests AgHBs, anti-VHC et anti-VIH 1 et 2. Aucune méthode connue ne permet de garantir à 100 % que les dérivés du sang humain ne transmettront pas l'hépatite, le SIDA ou d'autres infections. Aussi, la manipulation des réactifs, des échantillons de sérum ou de 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 traités comme des composants potentiellement infectieux.
- Éviter tout contact des réactifs avec la peau. Solution d'arrêt contenant de l'acide chlorhydrique. En cas de contact, laver abondamment à l'eau.
- Ne pas fumer, boire, manger, ni employer des produits cosmétiques dans l'espace de travail. Ne pas pipetter en aspirant par la bouche. Utiliser des vêtements de protection et des gants jetables.
- Les tests doivent être réalisés dans une pièce suffisamment ventilée.
- Mettre les récipients et leur contenu non utilisé au rebut conformément aux réglementations locales et nationales.

- Porter des vêtements de protection, des gants et un dispositif de protection des yeux/du visage adéquats lors de la manipulation du contenu de ce kit.
- Se laver soigneusement les mains après manipulation.
- Pour en savoir plus sur les symboles de danger, la sécurité, la manipulation et l'élimination des composants de ce kit, se reporter à la fiche de données de sécurité (FDS) disponible sur [quidel.com](http://quidel.com).

## CONSERVATION

- Avant ouverture ou reconstitution, tous les composants de la trousse n'ayant pas atteint la date de péremption, indiquée sur l'étiquette, sont stables s'ils sont conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C.
- Après reconstitution, les échantillons-étalons et les échantillons de contrôle sont stables pendant huit semaines à une température comprise entre 2 et 8 °C. Pour des périodes de stockage plus longues, des aliquotes doivent être réalisées et conservées à une température de -20 °C pendant 4 mois maximum. Évitez les cycles de congélation-décongélation ultérieurs.
- Une solution de lavage fraîchement préparée doit être utilisée le jour même.
- Des changements de l'aspect physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer leur instabilité ou leur détérioration.

## PRÉPARATION DU RÉACTIF

### Tampon de lavage

Préparer un volume adéquat de solution de lavage par ajout de 199 volumes d'eau désionisée pour 1 volume de solution de lavage (200X). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser le tout. Jeter le reste de la solution de lavage non utilisée en fin de journée.

### Étalons A-F

Reconstituer les échantillons-étalons A-F avec 1 ml d'eau distillée.

### Échantillons de contrôle

Reconstituer les échantillons de contrôle avec 1 ml d'eau distillée.

### Solution de conjugué de HRP

**La solution de conjugué de HRP doit être préparée pendant l'incubation de 2 heures et au minimum 1 heure et 45 minutes avant utilisation.**

Préparer un volume adéquat de solution de conjugué HRP en mélangeant les trois réactifs selon la séquence indiquée ci-dessous :

1. Solution de reconstitution (tampon conjugué)
2. 25-OH-vitamine D biotinylée (concentré conjugué)
3. Mélanger au vortex
4. HRP concentré
5. Mélanger au vortex

**L'ordre d'ajout des trois (3) réactifs est critique et doit être rigoureusement respecté pour obtenir des densités optiques reproductibles.**

Préparer un volume adéquat de solution de conjugué HRP en fonction du nombre de bandelettes utilisées, comme indiqué ci-dessous :

- Par exemple, pour 6 bandelettes (48 puits) : 100 µl de conjugué concentré et 50 µl de HRP concentré dans 10 ml de solution tampon conjuguée.

- Utiliser un vortex pour homogénéiser le tout.
- Conserver le conjugué de HRP à température ambiante jusqu'à son utilisation et éviter la lumière directe du soleil ou utiliser un flacon en verre marron pour réaliser la préparation.
- La préparation de conjugué HRP n'est pas stable et doit être jetée si elle n'est pas utilisée.

Nombre de bandelettes	Volume de solution de reconstitution (ml)	Volume de 25-OH-vitamine D biotinylée (µl)	Volume de HRP concentré (µl)
1	3	30	15
2	5	50	25
3	6	60	30
4	8	80	40
5	9	90	45
6	10	100	50
7	12	120	60
8	14	140	70
9	16	160	80
10	18	180	90
11	20	200	100
12	22	220	110

## COLLECTE ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Cette trousse convient pour les échantillons de sérum.

Les échantillons de sérum doivent être conservés à une température comprise entre 2 et 8 °C.

Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, il est recommandé de stocker les échantillons à une température de -20 °C.

Évitez les cycles de congélation-décongélation ultérieurs.

## PROCEDURE DE DOSAGE

### Remarques concernant la manipulation

- Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après la date de péremption.
- Ne pas mélanger les composants de lots de trousse différents.
- Amener tous les réactifs à température ambiante avant leur utilisation.
- Bien mélanger tous les réactifs et les échantillons en les agitant ou en les remuant doucement.
- Réaliser les échantillons-étalons, les échantillons de contrôle et les échantillons en double. L'alignement vertical est recommandé.
- Utiliser un récipient en plastique propre pour préparer la solution de lavage.
- Afin d'éviter une contamination croisée, utiliser un embout jetable pour pipette propre pour ajouter chaque réactif et chaque échantillon.
- Pour délivrer le substrat de TMB et la solution d'arrêt, ne pas utiliser de pipettes métalliques.
- L'utilisation de pipettes de grande précision ou d'un système automatisé de pipetage permettra d'améliorer le dosage.
- Respectez les temps d'incubation.
  - **Afin d'éviter toute dérive, le temps entre le pipetage du premier échantillon-étalon et le pipetage du dernier échantillon ne doit pas dépasser la durée indiquée dans la section SPÉCIFICITÉ (Délai).**

- Préparer une courbe standard pour chaque série de tests ; ne pas réutiliser les données des séries de tests précédentes.
- Délivrer le substrat de TMB dans les 15 minutes suivant le lavage de la microplaque de dosage.
- Lors de l'incubation avec le substrat de TMB, éviter la lumière directe du soleil sur la microplaque de dosage.

## Procédure

1. Sélectionner le nombre requis de bandelettes pour microplaque de dosage pour effectuer le test. Les bandelettes pour microplaque de dosage non utilisées doivent être rescellées dans la pochette contenant un dessiccant et conservées à une température comprise entre 2 et 8 °C.
2. Placer les bandelettes sur le support.
3. Pipeter 50 µl de chaque échantillon-étalon, de chaque échantillon-témoin et de chaque échantillon dans les puits appropriés.
4. Pipeter 150 µl de dosage tampon de dosage dans tous les puits.
5. Incuber pendant 2 heures à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tr/min).
6. Préparer la solution conjuguée de HRP une fois l'incubation commencée (dans les 15 minutes).
7. Aspirer le liquide contenu dans chaque puits.
8. Laver 3 fois la plaque de la façon suivante :
  - délivrer 0,35 ml de solution de lavage dans chaque puits ;
  - aspirer le contenu de chaque puits.
9. Pipeter 200 µl de la solution conjuguée de HRP dans chaque puits. Incuber la microplaque de dosage pendant 30 minutes à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tr/min).
10. Aspirer le liquide contenu dans chaque puits.
11. Laver 3 fois la plaque de la façon suivante :
  - délivrer 0,35 ml de solution de lavage dans chaque puits ;
  - aspirer le contenu de chaque puits.
12. Pipeter 100 µl de substrat de TMB dans les 15 minutes qui suivent le lavage de chaque puits.
13. Incuber la microplaque de dosage pendant 15 minutes à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tr/min) ; éviter la lumière directe du soleil.
14. Pipeter 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits.
15. Lire les valeurs d'absorption à 450 nm (filtre de référence de 630 nm ou 650 nm) dans l'heure qui suit et calculer les résultats comme décrits dans la section Interprétation des résultats.

## CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour l'échantillon de contrôle L et/ou pour l'échantillon de contrôle H ne sont pas compris dans la plage de valeurs indiquée sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés, sauf si une explication satisfaisante a été donnée pour justifier la divergence.
- Chaque laboratoire peut, s'il le souhaite, préparer ses propres lots d'échantillons de contrôle, lesquels doivent être conservés à l'état congelé dans des aliquotes. Les échantillons de contrôle contenant de l'azote perturberont la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation des divergences entre les résultats en double des échantillons doivent être conformes aux bonnes pratiques de laboratoire.
- Il est recommandé de procéder régulièrement au dosage des échantillons de contrôle en aveugle, afin de mesurer la variabilité des dosages. Les performances du dosage doivent être suivies à l'aide de graphiques de contrôle de la qualité des échantillons de contrôle.
- Une bonne pratique consiste à vérifier visuellement l'ajustement de courbe sélectionné par l'ordinateur.

## INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

### Calcul des résultats

1. Lire la plaque à 450 nm par comparaison avec un filtre de référence à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne des déterminations.
3. En utilisant du papier quadrillé ou semi-logarithmique, placer sur la courbe les valeurs DO pour chaque point de l'échantillon-étalon comme fonction de la concentration en 25-OH-vitamine D de chaque point de l'échantillon-étalon. Rejeter les valeurs manifestement aberrantes.
4. Des méthodes assistées par ordinateur peuvent également être utilisées pour construire la courbe d'étalonnage. Si un traitement automatisé des résultats est utilisé, un ajustement de courbe de fonction logistique à 4 paramètres est recommandé.
5. Par interpolation des valeur DO de l'échantillon, déterminer les concentrations en 25-OH-vitamine D des échantillons en se servant de la courbe d'étalonnage.

### DONNÉES TYPIQUES

Les données suivantes ne sont indiquées qu'aux fins d'illustration et ne doivent en aucun cas être utilisées à la place de la courbe d'étalonnage en temps réel.

Échantillon-étalon	Valeur d'absorption (DO)	Résultat (ng/ml)
A	2,66	0
B	2,39	5,3
C	1,83	15
D	1,46	25,7
E	0,81	54,3
F	0,21	133

### VALEURS ATTENDUES

Le régime alimentaire, l'origine ethnique, la saison et l'âge sont des facteurs connus pour affecter les taux normaux de 25-OH-vitamine D<sub>3</sub>. Chaque laboratoire doit fixer ses propres plages de valeurs acceptables en fonction de la population locale. Des articles récents suggèrent les plages de valeurs suivantes pour la classification du taux de 25-OH-vitamine D :

Taux	ng/ml
Déficient	< 10
Insuffisant	10-29
Suffisant	30-100
Toxicité potentielle	> 100

### PLAGES DE RÉFÉRENCE

Des plages de référence ont été établies à partir des résultats obtenus sur 150 individus apparemment sains. Les échantillons de sérum de chaque patient ont été obtenus auprès d'une source commerciale certifiée et ont été prélevés dans un centre de dons agréé par la FDA sur des individus ayant fourni leur consentement éclairé. 50 échantillons provenaient du nord des États-Unis (Pennsylvanie), 50 autres du centre des États-Unis (Tennessee) et les 50 derniers du sud des États-Unis (Floride). Les échantillons prélevés durant la période hivernale (de janvier à mars) provenaient d'individus âgés de 21 à 92 ans appartenant à des populations à peau claire et à peau sombre. Les individus sur lesquels ont été prélevés les échantillons ne prenaient pas de

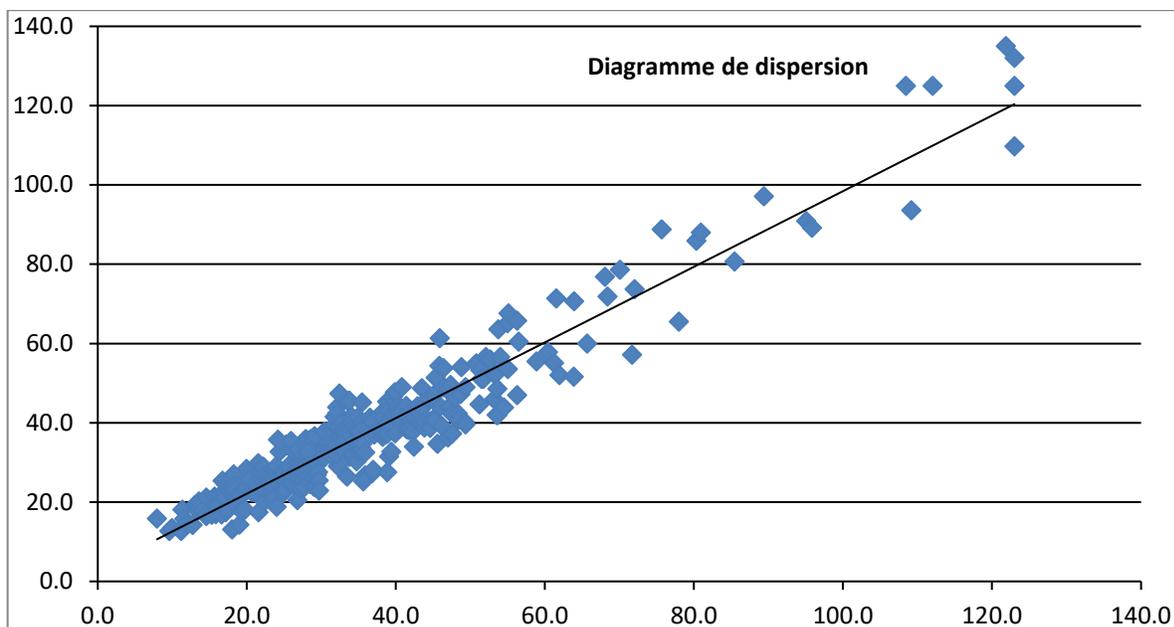
supplément en vitamine D, ne présentaient pas d'antécédents familiaux de pathologie parathyroïdienne ou liée à des troubles de la régulation de la calcémie, n'avaient jamais souffert de maladie rénale, hépatique, parathyroïdienne ou liée à des troubles de la calcémie, ni subi d'opération de chirurgie bariatrique, et ne prenaient aucun médicament connu pour affecter l'absorption ou le catabolisme de la vitamine D. Le tableau suivant résume les résultats obtenus :

Concentration	Floride	Tennessee	Pennsylvanie	Total
Conc. la plus élevée (ng/ml)	88,6	71,7	54,6	88,6
Conc. la plus faible (ng/ml)	6,1	4,9	5,9	4,9
Conc. médiane (ng/ml)	20,8	17,2	14,3	17,3

Seuls les 95 % centraux (2,5-97,5 %) des résultats observés ont été utilisés.

## COMPARAISON DES MÉTHODES

Les performances du test MicroVue pour le dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D ont été déterminées en procédant à une corrélation menée sur trois sites différents sur un total de 356 échantillons. Les échantillons ont été testés au moyen du test MicroVue pour le dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D et d'un autre test pour le dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D disponible dans le commerce. Les résultats obtenus étaient compris entre 8,0 et 123,0 ng/ml. Le coefficient de corrélation entre les deux méthodes était de 0,917 avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre 87,6 et 93,6 %, une pente de 0,954 et un point d'intersection avec l'axe Y de 3,05. Les résultats sont résumés dans les courbes suivantes :



## PERFORMANCE DU TEST

### Limites du test

- 1 Ce test constitue une aide au diagnostic et doit être utilisé conjointement avec les résultats cliniques.
- 2 Les performances de ce dosage n'ont pas été évaluées chez les patients pédiatriques.
- 3 Les échantillons que l'on suspecte de contenir des concentrations supérieures à l'échantillon témoin le plus élevé doivent être testés après dilution.
- 4 Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés.

### Limites de détection

La limite du blanc (LOB), la limite de détection (LOD) et la limite de dosage (LOQ) ont été déterminées conformément à la directive EP17-A du CLSI.

- La LOB a été calculée en mesurant le blanc plusieurs fois et en calculant le 95e percentile de la distribution des valeurs obtenues lors des tests. Le calcul de la LOB a indiqué une valeur de 1,69 ng/ml.
- La LOD a été calculée conformément aux instructions de la directive. Le calcul de la LOD a indiqué une valeur de 2,81 ng/ml.
- La LOQ a été calculée en testant quatorze fois 5 échantillons de faible valeur dans un test différent.
- Le calcul de la LOQ a indiqué une valeur de 4,39 ng/ml avec un CV de 20 %.

## SPÉCIFICITÉ

### Réactivité croisée

La réactivité croisée du dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D MicroVue a été déterminée en testant des échantillons de sérum au moyen de réactifs croisés dopés et non dopés. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Composé et concentration	Pourcentage de réaction croisée
25 OH-Vitamine D <sub>3</sub> à 10 ng/ml	100
25 OH-Vitamine D <sub>2</sub> à 10 ng/ml	86
1, 25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine D <sub>3</sub> à 200 ng/ml	20
1, 25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine D <sub>2</sub> à 690 ng/ml	1,9
Vitamine D <sub>3</sub> à 200 ng/ml	2,9
Vitamine D <sub>2</sub> à 200 ng/ml	1,3
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine D <sub>3</sub> à 20 ng/ml	> 100
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamine D <sub>3</sub> à 4 ng/ml	> 100
3-épi-25-OH-Vitamine D <sub>3</sub> à 20 µg/ml	0,1

### Substances interférentes

L'effet des substances interférentes potentielles sur les échantillons lors de l'utilisation du test MicroVue pour le dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D a été évalué. Différents niveaux d'hémoglobine, de bilirubine, de triglycérides, de vitamine C, de bilirubine conjuguée et non conjuguée et de Zemplar ont été testés dans des échantillons de sérum à différentes concentrations de 25-OH-vitamine D. Selon les critères que nous avons définis, le test était satisfaisant lorsque les interférences étaient inférieures à 10 %. Les substances testées n'ont pas altéré les performances du test MicroVue pour le dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D.

Substance	25-OH-vitamine D (ng/ml)	Concentration en substances interférentes (mg/dl)	Variation moyenne (en %)
Hémoglobine	7,6	250	-0,6 %
		500	
	29,3	250	
		500	
	42,5	250	
		500	
Bilirubine conjuguée	6,0	50	-3,4 %
		100	
	21,5	50	
		100	
	38,6	50	
		100	
Bilirubine non conjuguée	7,6	50	2,5 %
		100	
	29,3	50	
		100	
	42,5	50	
		100	
Triglycérides	7,6	7,5	-4,3 %
		125	
		250	
		500	
	29,3	7,5	
		125	
		250	
		500	
	42,5	7,5	
		125	
		250	
		500	
Vitamine C	6,0	1	2,5 %
		10	
		100	
	21,5	1	
		10	
		100	
	38,6	1	
		10	
		100	
Biotine	8,7	0,2	4,7 %
		2	
		4	
	19,8	0,2	
		2	
		4	
	36,1	0,2	

Substance	25-OH-vitamine D (ng/ml)	Concentration en substances interférentes (mg/dl)	Variation moyenne (en %)
Zemplar	17,6	2	-4,4 %
		4	
		0,0013	
		0,0025	
	33,5	0,0050	
		0,0013	
		0,0025	
		0,0050	

## Précision

La précision du dosage a été calculée en testant des échantillons sur une période d'au moins 20 jours en utilisant des trousse d'essai provenant de trois lots différents. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Intra-essai				Inter-essai			
Échantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Échantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	5,5 ± 0,4	7,8	A	39	17,7 ± 1,3	7,4
B	35	27,4 ± 1,5	5,7	B	10	26,3 ± 1,2	4,7
C	35	43,0 ± 1,2	2,7	C	10	42,1 ± 1,8	4,3
D	24	81,2 ± 2,0	2,5	D	21	85,4 ± 7,8	9,2

Écart-type : Écart-type, CV : Coefficient de variation

## Reproductibilité

La reproductibilité de l'essai a été évaluée en testant trois échantillons en double pendant cinq jours, à raison de deux fois par jour, sur trois sites comportant chacun deux techniciens. Les résultats moyens sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Échantillon	n	ng/ml		À l'intérieur d'une série	D'une série à l'autre	D'un jour à l'autre	D'un technicien à l'autre	D'un site à l'autre	Total
1	57	25,5	Écart-type	0,22	0,61	0,98	1,54	2,21	2,59
			CV	0,3 %	0,9 %	3,8 %	6,0 %	8,7 %	10,2 %
2	57	52,9	Écart-type	0,64	1,57	1,11	2,28	4,29	5,19
			CV	0,9 %	2,3 %	2,1 %	4,3 %	8,1 %	9,8 %
3	57	124,9	Écart-type	1,00	1,74	1,84	3,39	4,98	6,25
			CV	1,4 %	2,5 %	1,5 %	2,7 %	4,0 %	5,0 %

## Récupération

La récupération a été évaluée en ajoutant différentes concentrations de 25-OH-vitamine D aux échantillons. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Test de récupération	
25-OH-vit. D <sub>3</sub> ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
0	100
25	96
50	92
25-OH-vit. D <sub>2</sub> ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
0	100
25	105
50	95

## Linéarité

Un échantillon présentant une concentration connue à répartir sur la plage mesurable a été testé à des dilutions équidistantes, selon le protocole de dilution de l'échantillon, afin de déterminer la plage de linéarité du dosage. Une analyse de régression linéaire a été réalisée. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Dilution de l'échantillon		Concentration théorique (ng/ml)	Concentration mesurée (ng/ml)	Pente	Point d'intersection avec l'axe y	R <sup>2</sup>	Récupération (%)
1/1		101,8	101,8	1,02	-1,91	> 0,98	100
1/2	Avec le contrôle 1 mesuré à 27,1 ng/ml	64,4	62,9				98
1/4		45,7	52,0				114
1/8		36,4	34,8				96
1/16		31,7	33,6				106

La détermination de la plage de linéarité du dosage a indiqué une plage de valeurs comprises entre 33,6 et 101,8 ng/ml.

## Délai

Le test du délai entre le dernier échantillon étalon et les résultats après ajout de l'échantillon est illustré dans le tableau suivant.

Délai			
	0 min (ng/ml)	10 min (ng/ml)	20 min (ng/ml)
Échantillon 1	27,9	30,5	30,2
Échantillon 2	49,5	47,5	49,0

Les résultats de l'essai restent exacts, et ce, même lorsque la solution tampon est ajoutée 10 et 20 minutes après avoir introduit l'échantillon étalon dans les puits recouverts d'un anticorps monoclonal.

## ASSISTANCE

Pour commander ou obtenir une assistance technique, veuillez contacter un représentant Quidel au 800-874-1517 (aux États-Unis) ou au +1-858-552-1100 (en dehors des États-Unis), du lundi au vendredi, de 8 h à 17 h, heure de la côte est de l'Amérique du Nord. Les commandes peuvent également être passées par fax au +1-740-592-9820. Pour obtenir de l'aide par e-mail, veuillez écrire à [customerservice@quidel.com](mailto:customerservice@quidel.com) ou à [technicalsupport@quidel.com](mailto:technicalsupport@quidel.com).

Pour des services en dehors des États-Unis, veuillez contacter votre distributeur local. De plus amples informations sur Quidel, nos produits et nos distributeurs sont disponibles sur notre site Internet [quidel.com](http://quidel.com).

## RÉFÉRENCES

1. Zerwekh, J.E. Blood biomarkers of Vitamin D status. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87(suppl):1087S-1091S.
2. Holick, M.F. Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.* 2006; 116:2062-2072.
3. Heaney, R.P. VitaminD: how much do we need and how much is too much. *Osteoporos. Int.* 2000; 11(7) 553-555.
4. Dawson-Hughes B., Heaney R.P., Holick M.F., Lips P., Meunier P.J. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos. Int.*, 1997; 7:439-443.
5. Bischoff-Ferrari, H.A., Giovannucci, E., Willett, W.C., Dietrich, T., Dawson-Hughes, B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84(1):18-28.
6. Holick, M.F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 80(6 suppl):1678S-1688S.
7. Heaney, R.P. Defining deficiency of vitamin D. In: *Clinical Laboratory International*. 2010; 34:16-19.
8. Holick, M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(3):266-281.
9. Taha, N.M., Vieth, R. The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status. In: *Clinical Laboratory International*. 2010; 34:28-30.
10. Holick M.F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann. Epidemiol.*, 2009;19:73-78.
11. National Osteoporosis Foundation Prevention – Vitamin D.  
<http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitaminD>
12. EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.

REF

8046 – Trousse de dosage immuno-enzymatique de la 25-OH-vitamine D MicroVue

IVD



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover,  
Allemagne



### Quidel Corporation

2005 East State Street, Suite 100  
Athens, OH 45701 États-Unis  
[quidel.com](http://quidel.com)

PI8046002FR00 (11/19)

Historique des révisions :	Élément
PI8046000FR00	Version initiale de Quidel Corporation.
PI8046001FR00	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Ajout de texte pour clarifier les étapes procédurales de la préparation de la « solution de conjugué HRP ».</li><li>2. Ajout du volume utilisé de la solution de reconstitution (tampon conjugué, partie n° 411913) au tableau pour la préparation de la solution de conjugué HPR.</li><li>3. Mise à jour de la section « Avertissements et précautions ».</li></ol>
PI8046002FR00	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Optimisation de la formulation zéro Standard A (CAL A).</li><li>2. Remplacement de la dilution des échantillons par l'utilisation de l'étalon A (CAL A) par le contrôle 1 (partie n° 4219716) ou un autre échantillon de sérum à concentration connue.</li><li>3. La plage de performance linéaire est passée de 7,7 à 122,9 ng/ml à 33,6 à 101,8 ng/ml.</li><li>4. Concentration de conjugué optimisée entraînant un changement de volume de 0,4 ml à 0,3 ml.</li><li>5. L'agitation des plaques passe de 300 à 700 tr min à 400 tr/min, toutes les étapes d'agitation des plaques.</li><li>6. Le volume de « lavage » des plaques passe de 0,4 ml à 0,35 ml, pour toutes les étapes de lavage.</li><li>7. Mise à jour de l'étiquetage des composants pour correspondre aux changements de volume pour les éléments suivants :<ol style="list-style-type: none"><li>a. CAL A-F (étalon A-F), reconstitution (RCNS) 1-ml</li><li>b. Partie 4119703 - 25-OH-vitamine D biotinylée (concentré conjugué), 0,3 ml</li><li>c. Partie 4219716 - solution contrôle 1, reconstituée (RCNS) 1-ml</li><li>d. Partie 4219717 - solution contrôle 2, reconstituée (RCNS) 1-ml</li></ol></li></ol>

## GLOSSAIRE

---

**REF**

Numéro de catalogue



Marque de conformité CE

---

**EC REP**

Représentant agréé dans l'Union européenne

**LOT**

Code du lot

---



Date de péremption



Fabricant

---



Limite de température



Utilisation prévue

---

**Rx ONLY**

Utilisation sur ordonnance exclusivement



Consulter le mode d'emploi de l'étiquetage électronique

---

**IVD**

Pour diagnostic *in vitro*



Quantité suffisante pour 96 déterminations

---

**CONT**

Compositions/Contient

**CONTROL**

Contrôle

---