

For the Quantitative Measurement of 25-hydroxyvitamin D and other hydroxylated metabolites in Human Serum and Plasma.

The concentration of 25-hydroxyvitamin D in a given specimen determined with assays from different manufacturers can vary due to differences in assay methods and reagent specificity. The results reported by the laboratory to the physician must include the identity of the 25-hydroxyvitamin D assay method used. Values obtained with different assay methods should not be used interchangeably.

**CAUTION:** United States Federal law restricts this device to sale and distribution by or on the order of a physician, or to a clinical laboratory; and use is restricted to, by or on the order of a physician.

In Canada, use of this product is restricted to laboratories only.

### INTENDED USE

The FastPack® IP Vitamin D Immunoassay Kit Complete is intended for the quantitative determination of total 25-hydroxyvitamin D and other hydroxylated metabolites in human serum and plasma. The assay is to be used as an aid in the assessment of vitamin D sufficiency in adults. The FastPack® IP Vitamin D Immunoassay Kit Complete is intended for use with the FastPack® IP System analyzer.

### SUMMARY

Vitamin D is a commonly used term for a family of closely related seco-steroids. It is a fat-soluble steroid prohormone mainly produced photochemically in the skin from 7-dehydrocholesterol.<sup>1,2</sup> Upon exposure to sunlight, 7-dehydrocholesterol, located deep in the actively growing layers of the epidermis, undergoes photolytic cleavage of the "B" ring to yield pre-vitamin D<sub>3</sub> which is isomerized to vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol).<sup>3</sup> Two forms of vitamin D are biologically relevant – vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) and vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol). Both vitamins D<sub>3</sub> and D<sub>2</sub> can be absorbed from food, with vitamin D<sub>2</sub> being an artificial source, but only an estimated 10-20% of vitamin D is supplied through nutritional intake.<sup>1</sup> Vitamins D<sub>3</sub> and D<sub>2</sub> can be found in vitamin supplements. Vitamin D is converted to the active hormone 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D (Calcitriol) through two hydroxylation reactions. The first hydroxylation converts vitamin D into 25-OH vitamin D and occurs in the liver. The second hydroxylation converts 25-OH vitamin D into the biologically active 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D and occurs in the kidneys as well as in many other cells of the body. Most cells express the vitamin D receptor and about 3% of the human genome is directly or indirectly regulated by the vitamin D endocrine system.<sup>1</sup>

Vitamin D is stored in adipose tissue and enters the circulation bound to vitamin D binding protein (VDBP) and albumin. The major storage form of vitamin D is 25-OH vitamin D and is present in the blood at up to 1,000 fold higher concentration compared to the active 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D. 25-OH vitamin D has a half-life of 2-3 weeks versus 4 hours for 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D. Therefore, 25-OH vitamin D is the analyte of choice for determination of the vitamin D status.<sup>4,5</sup> Serum concentration of 25-OH vitamin D is considered to be the most reliable measure of overall vitamin D status and thus can be used to determine if a patient is vitamin D sufficient.<sup>2</sup> Assessment of vitamin D status may also be required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients.

Epidemiological studies have shown a high global prevalence of vitamin D insufficiency and deficiency.<sup>8</sup> The measurement of vitamin D status provides opportunities for preventive and therapeutic interventions.<sup>7,8,9</sup> Vitamin D deficiency is a cause of secondary hyperparathyroidism and diseases resulting in impaired bone metabolism (like rickets, osteoporosis, osteomalacia).<sup>4,10,11</sup> Reduced 25-OH vitamin D concentrations in blood (vitamin D insufficiency) have been associated with an increasing risk of many chronic diseases, including common cancers, autoimmune or infectious diseases or cardiovascular problems.<sup>1,4,8,10,12-14</sup>

### TEST PRINCIPLE

The FastPack® IP Vitamin D Immunoassay is a paramagnetic particle chemiluminescence immunoassay based on the "competitive" principle.

- Endogenous Vitamin D in the sample will be mixed with pretreatment buffer then added into the pack
- Primary incubation: A monoclonal (mouse) anti-vitamin D antibody labeled with alkaline phosphatase [100 µL] reacts with vitamin D from the pre-treated patient sample, control or calibrator [100 µL].
- Secondary incubation: Vitamin D covalently coupled to biotin and pre-bound to streptavidin-coated paramagnetic particles [150 µL] is combined with the immunoreactant complex. Conjugate not reacted with the sample will bind to the unoccupied binding sites of the vitamin D-biotin-streptavidin coated paramagnetic particles.
- Removal of unbound materials: The paramagnetic particles are repeatedly washed with wash buffer [0.2 mL/wash] to remove unbound materials.
- Substrate addition and detection: Chemiluminogenic substrate [140 µL] is added to the solid-phase bound complex and results in "glow" chemiluminescence, which is measured using the FastPack® System analyzer.
- The amount of bound labeled-antibody is inversely proportional to the concentration of vitamin D in the sample.

## KIT – Content and Concentration

### Each FastPack<sup>®</sup> IP Vitamin D Immunoassay Kit Complete contains:

- 30 FastPacks (IP Pipette Format)
- 1 Vial FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Calibrator
- 1 Vial FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Control 1
- 1 Vial FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Control 2
- 32 Vials FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Pretreatment Buffer
- 1 Calibration Card
- 1 Control Range Card

### Each FastPack<sup>®</sup> IP Vitamin D Reagent Pack contains:

- Paramagnetic Particles, 150  $\mu$ L  
Biotin-25-OH vitamin D bound to streptavidin-coated paramagnetic particles in buffer containing 0.1% ProClin<sup>®</sup> 300 as a preservative.
- Vitamin D Antibody Solution, 100  $\mu$ L  
Antibody solution containing a mouse monoclonal anti 25-OH vitamin D antibody labeled with alkaline phosphatase in a protein matrix.
- Wash Buffer, 2.0 mL  
Tris buffer containing surfactants.
- Substrate, 140  $\mu$ L  
ImmuGlow<sup>™</sup> Plus: Indoxyl-3-phosphate and lucigenin in buffer containing preservatives.

### Each FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Calibrator Vial contains:

- Tris buffer solution with protein stabilizers. Does not contain any analyte, 3mL.  
*See the FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Calibrator direction insert for more information.*

### Each FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Control Vial contains:

- Components of human origin prepared in a HEPES buffer solution with vitamin D to yield predetermined concentrations of vitamin D.  
*See the FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Control direction insert for more information.*

### Each FastPack<sup>®</sup> Vitamin D Pretreatment Vial contains:

- Vitamin D Pretreatment Buffer, 200  $\mu$ L  
Perfluorooctanoic acid (PFOA) in purified water containing 0.1% ProClin<sup>®</sup> 300 as a preservative.

### Materials required but not provided

- FastPack<sup>®</sup> IP System

## WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in-vitro* diagnostic use only.
- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink or smoke in designated work areas.
- Wash hands thoroughly after handling specimen.
- HAMA Interference: some individuals have antibodies to mouse protein (HAMA), which can cause interference in immunoassays that employ antibodies derived from mice<sup>6</sup>.
- FastPack<sup>®</sup> IP reagents are stable until the expiration date on the label when stored and handled as directed. Do not use FastPack<sup>®</sup> IP reagents beyond the expiration date.
- Discard used FastPacks into a Biohazard container.
- ProClin<sup>®</sup> 300 is an irritant. The following are appropriate Risk (R) and Safety (S) phrases for ProClin<sup>®</sup> 300:  
R43 May cause sensitization by skin contact  
S28-37 After contact with skin, wash immediately with plenty of soap and water. Wear suitable gloves.

## STORAGE INSTRUCTIONS

Store at 2 – 8 °C.

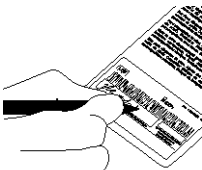
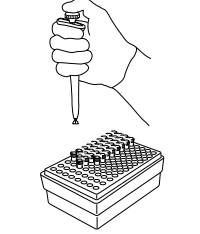
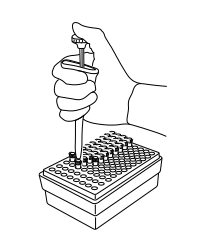
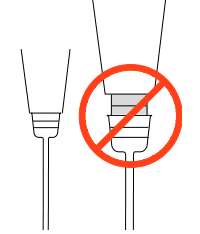
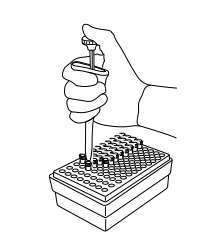
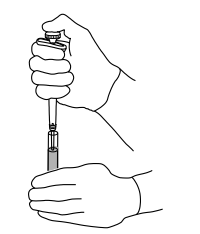
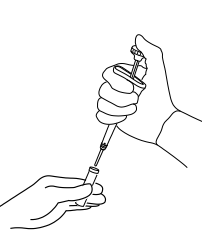
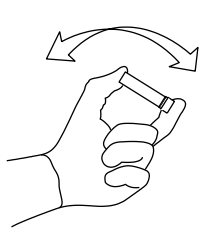

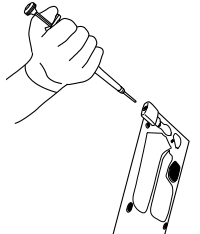
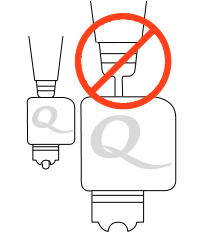
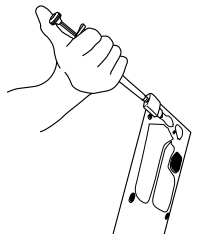
## SPECIMEN COLLECTION/PREPARATION

1. Serum, EDTA or lithium-heparin plasma samples can be used for the FastPack<sup>®</sup> IP Vitamin D Immunoassay.
2. The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) provides the following recommendations for handling, processing and storing blood.<sup>7,8,15</sup>
  - A. Collect all blood samples observing routine precautions for venipuncture.

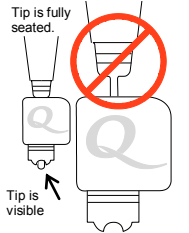
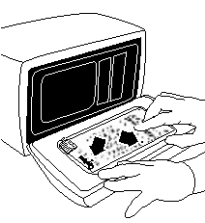

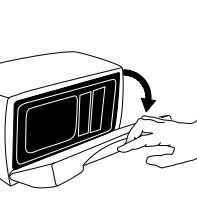
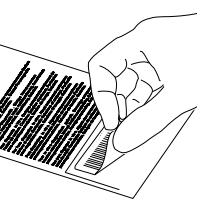
- B. For serum samples:
  - a. Serum should be separated from the cells by centrifugation within 3 hours from time of collection and stored at 2-8 °C. Transfer the serum from the original tube for storage.
  - b. If not tested within 24 hours, the sample should be frozen at -20 °C or colder.<sup>15</sup>
- C. For plasma samples:
  - a. Collect samples in an EDTA (lavender top) or heparinized (green top) tube.
  - b. Mix the tube immediately after collection by gently inverting it several times.
  - c. Plasma should be separated from the cells by centrifugation within 3 hours from time of collection and stored at 2-8 °C. Transfer the plasma from the original tube for storage.
  - d. If not tested within 24 hours, the sample should be frozen at -20 °C or colder.<sup>15</sup>
- D. Samples should be free of red blood cells, or other particulate material for optimal results.
- E. Samples showing particulate matter should be centrifuged prior to use.
- F. Samples showing turbidity (high lipid content) should not be used.
- G. Ensure the samples are free of bubbles.
- H. All calibrators, controls, and serum samples need to be pre-treated by diluting 1:3 with the Vitamin D Pretreatment Buffer (1 part sample, 2 parts pretreatment buffer), per the ASSAY PROCEDURE below.

### ASSAY PROCEDURE

See the QA Manual or the FastPack® System Procedure Manual for detailed instructions for running FastPack® assays.

 <p><b>1.</b> Write the Patient's Name/ID # and the operator's initials on the FastPack® label.</p>	 <p><b>2.</b> Press and hold the pipette plunger down completely so that the metal grippers are extended and open.</p>	 <p><b>3.</b> While holding the pipette plunger down, firmly press the pipette into the pipette tip until it snaps in place, then release the plunger.</p>	 <p><b>4.</b> Be sure the pipette tip is seated properly on the end of the pipette.</p>	 <p><b>5.</b> Verify that the pipette tip is properly seated by gently pressing the plunger down to the first stop and releasing. An audible "Click" may occur if the piston is not seated properly.</p>	 <p><b>6.</b> Gently press the pipette plunger down to the first stop and hold. Place the pipette tip into the sample tube; withdraw sample by slowly releasing the plunger. Inspect the pipette tip to confirm there are no air bubbles in the sample.</p>
 <p><b>7.</b> All samples must be pretreated by diluting 1:3 with FastPack® Vitamin D Pretreatment Buffer (1 part sample, 2 parts pretreatment buffer). Eject sample into the tube (pre-loaded with 200 µL Pretreatment Buffer) by pressing down on the pipette plunger to the first stop. Replace the screw cap tightly onto the buffer tube.</p>	 <p><b>8.</b> Invert the buffer tube at least 3 times to thoroughly mix together the sample and buffer. The act of mixing the sample and buffer releases the vitamin D present, therefore making it available for the assay.</p>	 <p><b>9.</b> Withdraw the sample from the pretreatment buffer tube using the same pipette tip as before and following the same technique as in <b>Step 6</b> above.</p>	 <p><b>10.</b> With your finger off the pipette plunger, fully insert the filled pipette tip into the FastPack® Injection Port. It should fit tightly.</p>	 <p><b>11.</b> Be sure the pipette tip is seated properly into the injection port.</p>	 <p><b>12.</b> In one continuous motion, quickly press the pipette plunger all the way down. This action will simultaneously inject the sample into the FastPack® and automatically eject the pipette tip.</p>

## ASSAY PROCEDURE (cont.)

 <p>Tip is fully seated.</p> <p>Tip is visible</p> <p><b>13.</b> Be certain not to unseat the pipette tip from the injection port. The tip acts as a plug to seal the sample in the FastPack®. If you observe a leak, properly dispose of the pack and begin the procedure with a new FastPack®.</p>	 <p><b>14.</b> Place the FastPack® on the door of the analyzer. Align the pins on the door with the holes in the FastPack®. Close the analyzer door.</p>	 <p><b>15.</b> Press the blue Start button on the analyzer.</p>	 <p><b>16.</b> Open the analyzer door when the test is complete. Remove the FastPack® and print the results on the attached label.</p>	 <p><b>17.</b> Peel off the label and place it in the patient record.</p>	<p><b>Qualigen, Inc.</b> Carlsbad, CA 92011 USA</p> <p><b>Qualigen</b></p>
---	---	--	--	--	--

## INSTRUMENTATION

FastPack® IP System

### DETAILS OF CALIBRATION

During the FastPack® IP production process, Qualigen generates a master standard curve and places this information in the barcode of each FastPack® IP label, where it can be read by the FastPack® IP System analyzer during the testing sequence. The FastPack® IP System analyzer must be calibrated by the user to ensure that it is properly adjusted for the particular lot of FastPacks that are being used. Separate calibrations must be run for each type of test, i.e. Total PSA, Testosterone, Vitamin D, TSH, free T4, etc. The frequency of calibration varies for each test type. For the FastPack® IP Vitamin D Immunoassay, the FastPack® IP System analyzer must be calibrated once every 30 days or whenever a new lot of Vitamin D FastPacks are to be used.

Whenever the user performs an initial calibration for a particular lot of FastPacks or uses a new lot of calibrator, 3 FastPacks must be run for calibration (triplicates). Whenever recalibration is performed with the same lot of FastPacks and calibrator, 3 FastPacks must be run for calibration. See FastPack® IP System Procedure Manual for "Running a Calibration".

### RESULTS

The FastPack® IP System analyzer uses the information from the barcode to construct a lookup table of x,y values that represent the standard curve and estimates the concentration of unknown samples by linear interpolation.

### QUALITY CONTROL

Quality control materials simulate real specimens and are essential for monitoring the system performance of assays. Good Laboratory Practices (GLP) include the use of control specimens to ensure that all reagents and protocols are performing properly. See FastPack® IP System Procedure Manual for "Control Testing". At least two levels of quality control materials should be used.

Users should follow the appropriate federal, state and local guidelines concerning the running of external quality controls.

### LIMITATION OF PROCEDURE

- Plasma samples to be collected using lithium-heparin or EDTA as the anticoagulants.
- Do not use lipemic samples because lipemic samples will generate a falsely low result.
- Specimens can be measured within the reportable range of the limit of quantitation (12.9 ng/mL) and the upper end of the calibration range, 150 ng/mL.
- Samples >150 ng/mL should be reported as such or re-run using another method.
- Specimen from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA). Such specimens may show either falsely elevated or depressed values when tested with assay kits employing mouse monoclonal antibodies.
- Heterophilic antibodies in a sample have the potential to cause interference in immunoassay systems.
- Infrequently, vitamin D levels may appear depressed due to heterophilic antibodies present in the patient's sample or to nonspecific protein binding. If the vitamin D level is inconsistent with clinical evidence, additional vitamin D testing is suggested to confirm the result.

- For diagnostic purposes, the FastPack® IP Vitamin D Immunoassay should always be assessed in conjunction with the patient's medical history, clinical examination and other findings.
- The FastPack® IP Vitamin D Immunoassay has not been evaluated in Point of Care settings.

### EXPECTED VALUES/REFERENCE INTERVALS

Each laboratory should determine ranges for their local population. There is no universal agreement on the optimal concentration of Vitamin D. Ranges should be based on clinical decision values that apply to both sexes rather than population based reference ranges. A reference interval study employing serum samples from 367 subjects representing 5 different geographic regions of the United States with sampling taking place in Winter, Spring, and early Summer months yielded the results in the table below. The non-parametric 2.5<sup>th</sup> - 97.5<sup>th</sup> percentile of 13.7 - 57.3 ng/mL provides the reference interval determined from this study.

Observed values	
Mean	27.6 ng/mL
Median	24.2 ng/mL
2.5 <sup>th</sup> - 97.5 <sup>th</sup> percentile	13.7 - 57.3 ng/mL

### SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### Precision

Precision was evaluated following the CLSI EP5-A2 guidance. Four samples with concentrations of ~25, ~30, ~45, and ~80 ng/mL were tested in duplicate determinations in each of two runs per day on each of two FastPack® IP System analyzers, each paired with an individual FastPack® IP Reagent lot over a period of 20 days to yield 160 replicate determinations of each sample (80 replicates on each of two analyzers). Within-run, between-run, and between-day components of variation were calculated as well as total imprecision using a fully nested 2-way random factor ANOVA model with runs nested within days. The tables below present the results by instrument/reagent combination:

Analyzer 1, Reagent Lot 1

	Average	Within-Run		Between-Run		Between-Day		Total	
		SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
Sample 1	27.3	2.8	10.2	1.3	4.9	1.9	7.1	3.7	13.4
Sample 2	31.1	3.3	10.7	0.0	0.0	1.8	5.7	3.8	12.1
Sample 3	45.5	3.9	8.5	0.0	0.0	2.0	4.3	4.3	9.5
Sample 4	84.9	4.1	4.8	0.0	0.0	3.2	3.7	5.1	6.1

Analyzer 2, Reagent Lot 2

	Average	Within-Run		Between-Run		Between-Day		Total	
		SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
Sample 1	25.9	3.9	15.1	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9	15.1
Sample 2	32.7	3.7	11.2	0.0	0.0	2.0	6.0	4.2	12.7
Sample 3	46.1	3.5	7.5	0.0	0.0	1.2	2.6	3.7	7.9
Sample 4	76.4	3.2	4.1	0.0	0.0	1.7	2.3	3.6	4.7

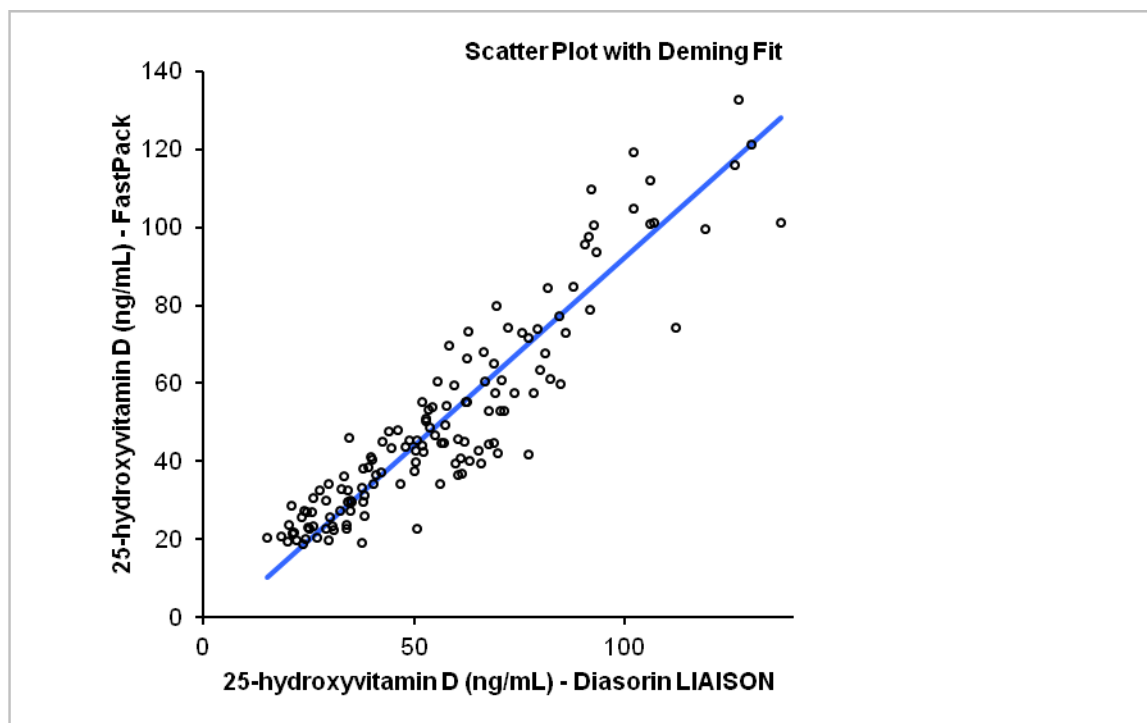
#### Range of linearity

For Vitamin D, as tested by the FastPack® IP Vitamin D Immunoassay, the method has been demonstrated to be linear from the LOQ (12.9 ng/mL) to 150 ng/mL within 5 ng/mL in the interval.

### Method Comparison

Clinical serum samples (n=137) were used to compare the values obtained using the FastPack® IP Vitamin D Immunoassay method and the values obtained using the DiaSorin LIAISON® Vitamin D TOTAL Assay method. The values were evaluated for agreement using Deming regression analysis, with the associated correlation coefficient.

n	Range of Observation (ng/mL)	Intercept (ng/mL)	Slope	R
137	18.6 – 132.6	-4.6	0.97	0.92



### Interfering Substances

The effect of interferences on quantification of vitamin D was investigated by preparation of serum samples with low and high vitamin D concentrations with known concentrations of bilirubin, biotin, cholesterol, protein, hemoglobin, and lipids. The value obtained for the sample with each interfering substance was compared to the value obtained for the sample without the interfering substance and the percentage bias in ng/mL determined. These compounds did not show interference at the levels indicated.

	Interfering Substance					
	Bilirubin (40 mg/dL)	Biotin (1 µg/mL)	Cholesterol (500 mg/dL)	Protein (10.7 g/dL)	Hemoglobin (500 mg/dL)	Lipids (250 mg/dL)
Non-spiked aliquot	59.1 ng/mL	36.0 ng/mL	38.5 ng/mL	28.2 ng/mL	49.0 ng/mL	98.2 ng/mL
Spiked aliquot	53.1 ng/mL	34.9 ng/mL	41.3 ng/mL	31.1 ng/mL	45.7 ng/mL	88.5 ng/mL
% Bias	-10.2	-3.1	7.3	10.3	-6.7	-9.9

### Cross-reactivity

Two serum samples containing low and high Vitamin D concentrations were tested without and with added concentrations of potential cross-reacting compounds including 1,25-dihydroxy Vitamin D2; 1,25-dihydroxy Vitamin D3; Vitamin D2; Vitamin D3; 25-hydroxy Vitamin D2; 25-hydroxy Vitamin D3; 24,25-dihydroxy Vitamin D2; 24,25-dihydroxy Vitamin D; 3-epi-25-hydroxy Vitamin D3, and Paricalcitol. Maximum cross-reactivity at the cross-reactant concentration indicated was determined for each compound.

Cross-reactant	Concentration tested (ng/mL)	% Cross-reactivity
Vitamin D2	500	2.0
Vitamin D3	500	1.9
1,25-(OH)2-Vitamin D2	100	4.0
1,25-(OH)2-Vitamin D3	100	9.8
3-epi-25(OH) Vitamin D3	400	7.8
25 (OH) Vitamin D2	100	93.0
25 (OH) Vitamin D3	25	106.0
Paricalcitol	200	-1.2
24, 25 (OH)2 Vitamin D2	40	-0.9
24, 25 (OH)2 Vitamin D3	20	117.4

### Limit of Blank (LOB), Limit of Detection (LOD), and Limit of Quantitation (LOQ)

The limit of blank (LOB, the highest measurement likely to be observed for a blank sample), limit of detection (LOD, the lowest amount of analyte in a sample that can be detected with type I and II error rates set to 5%), and limit of quantitation (LOQ, the lowest amount of analyte in a sample that can be reliably detected and at which the total error meets the pre-specified requirement for accuracy) were determined according to CLSI EP17-A for the FastPack<sup>®</sup> IP Vitamin D Immunoassay. In this study, the limit of blank was determined from 160 replicate determinations of a delipidated Vitamin D-free human serum on each of six different FastPack<sup>®</sup> instruments using three reagent lots. Raw RLUs from the assays were converted to apparent ng/mL based on the calibration curve for each assay. The LOB was determined as the upper 95<sup>th</sup> percentile of the distribution. This value was 2.3 ng/mL Vitamin D.

The LOD was estimated from 60 replicate determinations of four low samples. Per the CLSI EP17-A guideline, LOD was determined by the following equation:

$$\text{LOD} = \text{LOB} + (c_{\beta} * \text{SD}_S),$$

Where  $c_{\beta} = 1.645/(1-(1/(4 * f)))$ , where  $f$  is the degrees of freedom, and  $\text{SD}_S$  is the pooled standard deviation of the observations. In this study, the LOD was found to be 6.2 ng/mL Vitamin D.

For the LOQ analyses, % CV was plotted versus Vitamin D concentration and the concentration at which a 20% CV occurs based on a fit of the points was identified. LOQ was set to 12.9 ng/mL Vitamin D.

## REFERENCES

1. Pilz S, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat. Rev. Cardiol.* 2009; 6:621-30.
2. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW, The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320:981-991.
3. Holick MF, Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc. In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research. 3<sup>rd</sup> Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; 74-81.
4. Souberbielle JC, Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine* 2006; 73:249-53.
5. Cavalier E, Vitamin D: current status and perspectives. *Clin. Chem. Lab Med* 2009; 47(2):120-27.
6. Peterlik M, Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: an emerging world-wide public health problem. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009; 6:2585-607.
7. Grant WB, Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in Western Europe. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2009; 99:104-13.
8. Holick MF, Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357:266-81.
9. Autier P, Vitamin D supplementation and total mortality: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2007; 167(16):1730-7.
10. Bischoff-Ferrari HA, Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:18-28.
11. Steingrimsdottir L, Relationship between serum parathyroid hormone Levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *JAMA* 2005; 294(18):2336-41.
12. Grant WB, Current impediments to acceptance of the ultraviolet-B-vitamin D-cancer hypothesis. *Anticancer Res.* 2009; 29:3597-604.
13. Pilz S, Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke* 2008; 9:2611-13.
14. Bischoff-Ferrari HA, Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009; 339:b3692.
15. Wielders JP, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH)-Vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem* 2009;55:1584-5.



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 USA  
Technical Support  
(760) 918-9165  
(877) 709-2169



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hanover, Germany





Für die quantitative Messung von 25-Hydroxyvitamin D und anderen hydroxylierten Metaboliten in Humanserum und Plasma.

Die Konzentration von 25-Hydroxyvitamin D in einer beliebigen Probe, die durch Assays von verschiedenen Herstellern bestimmt wird, kann sich aufgrund von Unterschieden in den Assaymethoden und individuellen Eigenschaften von Reagenzien unterscheiden. Die Ergebnisse, die vom Labor an den Arzt weitergegeben werden, müssen die Identität der verwendeten 25-Hydroxyvitamin D-Assaymethode enthalten. Werte, die durch unterschiedliche Assaymethoden erlangt werden, sollten nicht synonym verwendet werden.

**ACHTUNG:** Das US-Bundesgesetz beschränkt dieses Gerät auf den Verkauf oder die Weitergabe durch oder auf Verschreibung eines Arztes oder an ein Krankenhauslabor, und der Gebrauch ist beschränkt auf Verwendung durch oder auf Verschreibung eines Arztes.

### BESTIMMUNGSGEMÄSSE VERWENDUNG

Das FastPack® IP Vitamin D-Immunoassay-Komplett-Kit ist für die quantitative Bestimmung des Gesamt-25-Hydroxyvitamin D und der anderen hydroxylierten Metaboliten in Humanserum und Plasma bestimmt. Der Assay soll als Hilfe bei der Beurteilung des Vitamin D-Status bei Erwachsenen dienen. Das FastPack® IP-Vitamin D-Immunoassay-Komplett-Kit ist für die Verwendung mit dem Analysegerät des FastPack® IP Systems bestimmt.

### ZUSAMMENFASSUNG

Vitamin D ist ein allgemein gebräuchlicher Begriff für eine Familie eng verwandter Secosteroide. Es handelt sich um ein fettlösliches Steroid-Prohormon, das hauptsächlich photochemisch in der Haut von 7-Dehydrocholesterol produziert wird.<sup>1,2</sup> Bei Exposition gegenüber Sonnenlicht wird das 7-Dehydrocholesterol, das sich tief in den aktiv wachsenden Schichten der Epidermis befindet, einer photolytischen Spaltung des „B“-Rings unterzogen, um Provitamin D<sub>3</sub> zu erzielen, das zu Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) isomerisiert wird.<sup>3</sup> Zwei Formen des Vitamin D sind biologisch relevant – Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) und Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol). Sowohl Vitamin D<sub>3</sub> als auch D<sub>2</sub> können aus der Nahrung resorbiert werden, wobei Vitamin D<sub>2</sub> eine künstliche Quelle ist, schätzungsweise werden jedoch nur 10-20 % von Vitamin D über die Nahrung aufgenommen.<sup>1</sup> Vitamin D<sub>3</sub> und D<sub>2</sub> liegen auch in Nahrungsergänzungsmitteln vor. Vitamin D wird durch zwei Hydroxylierungsreaktionen in das aktive Hormon 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D (Calcitriol) umgewandelt. Bei der ersten Hydroxylierung wird Vitamin D in 25-OH Vitamin D umgewandelt, was in der Leber vorliegt. Bei der zweiten Hydroxylierung wird 25-OH Vitamin D in das biologisch aktive 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D umgewandelt, was in den Nieren sowie in vielen anderen Zellen des Körpers vorliegt. Die meisten Zellen exprimieren den Vitamin D-Rezeptor und etwa 3 % des menschlichen Genoms wird direkt oder indirekt durch das endokrine Vitamin-D-System reguliert.<sup>1</sup>

Vitamin D ist in adipösem Gewebe gespeichert und tritt gebunden an Vitamin D-bindendes Protein (VDBP) und Albumin in den Kreislauf ein. Die Hauptspeicherform von Vitamin D ist 25-OH Vitamin D und liegt im Blut in einer bis zu 1000-fach höheren Konzentration vor im Vergleich zum aktiven 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D. 25-OH Vitamin D hat eine Halbwertszeit von 2-3 Wochen versus 4 Stunden für 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D. Deshalb ist das 25-OH Vitamin D das Analyt der Wahl für die Bestimmung des Vitamin D-Status.<sup>4,5</sup> Die Serumkonzentration von 25-OH Vitamin D gilt als die zuverlässigste Messung des Gesamt-Vitamin D-Status und kann somit zur Bestimmung des Vitamin D-Status eines Patienten herangezogen werden.<sup>2</sup> Die Beurteilung des Vitamin D-Status kann auch erforderlich sein, um die Ursache für abnormale Serumkalziumkonzentrationen in Patienten zu bestimmen.

Epidemiologische Studien zeigen eine hohe globale Prävalenz von Vitamin D-Insuffizienz und -Defizienz.<sup>8</sup> Die Bestimmung des Vitamin-D-Status bietet die Möglichkeit präventiver und therapeutischer Interventionen.<sup>7,8,9</sup> Vitamin D-Defizienz ist eine Ursache für sekundären Hyperparathyreoidismus und Erkrankungen, die aus einem gestörten Knochenstoffwechsel entstehen (wie Rachitis, Osteoporose, Osteomalazie).<sup>4,10,11</sup> Reduzierte 25-OH Vitamin D-Konzentrationen im Blut (Vitamin D-Insuffizienz) werden mit einem erhöhten Risiko für viele chronische Krankheiten assoziiert, einschließlich Karzinome, Autoimmun- oder Infektionskrankheiten oder kardiovaskulärer Probleme.<sup>1,4,8,10,12-14</sup>

### TESTPRINZIPIEN

Der FastPack® IP-Vitamin D-Immunoassay ist ein Chemolumineszenz-Immunoassay mit paramagnetischen Partikeln, der auf dem „kompetitiven“ Prinzip basiert.

- Endogenes Vitamin D in der Probe wird mit Vorbehandlungspuffer gemischt und dann dem Pack hinzugefügt
- Primäre Inkubation: Ein monoklonaler (Maus) Anti-Vitamin D-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase [100 µl] markiert ist, reagiert mit dem Vitamin D aus der vorbehandelten Patientenprobe, der Kontrolle oder dem Kalibrator [100 µl].
- Sekundäre Inkubation: Kovalent an Biotin gekoppeltes und an mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel [150 µL] gebundenes Vitamin D ist mit dem immunreaktanten Komplex kombiniert. Das nicht mit der Probe reagierende Konjugat bindet an die nicht besetzten Bindungsstellen der mit Vitamin D–Biotin-Streptavidin beschichteten paramagnetischen Partikel.
- Entfernung nicht gebundenen Materials: Die paramagnetischen Partikel werden wiederholt mit Wäschepuffer [0,2 ml/Wäsche] herausgespült, um ungebundenes Material zu entfernen.

- Substrataddition und -erkennung: Chemiluminogenes Substrat [140 µl] wird dem gebundenen Komplex der soliden Phase hinzugefügt, was in einer „Glüh“-Chemilumineszenz resultiert, was mithilfe des Analysegeräts des FastPack® Systems gemessen wird.
- Die Menge der gebundenen gekennzeichneten Antikörper ist umgekehrt proportional zur Konzentration des Vitamin D in der Probe.

#### **KIT – Inhalt und Konzentration**

##### **Jedes FastPack® IP Vitamin D-Immunoassay-Komplett-Kit enthält:**

- 30 FastPacks (IP-Pipettenformat)
- 1 Fläschchen FastPack® Vitamin D-Kalibrator
- 1 Fläschchen FastPack® Vitamin D-Kontrolle 1
- 1 Fläschchen FastPack® Vitamin D-Kontrolle 2
- 32 Fläschchen FastPack® Vitamin D-Vorbehandlungspuffer
- 1 Kalibrierungskarte
- 1 Kontrollbereichskarte

##### **Jeder FastPack® IP Vitamin D-Reagenz-Pack enthält:**

- Paramagnetische Partikel, 150 µl  
Biotin-25-OH Vitamin D gebunden an mit Streptavidin beschichtete paramagnetische Partikel in Puffer mit 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsmittel.
- Vitamin D-Antikörperlösung, 100 µl  
Antikörperlösung mit einem monoklonalen Maus-Anti 25-OH Vitamin D-Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase in einer Proteinmatrix gekennzeichnet ist.
- Waschpuffer: 2,0 ml  
Tris-Puffer enthält Tenside.
- Substrat: 140 µl  
ImmuGlow™ Plus: Indoxyl-3-phosphat und Lucigenin in Puffer mit Konservierungsmitteln.

##### **Jedes FastPack® Vitamin D-Kalibrator-Fläschchen enthält:**

- Trispufferlösung mit Protein stabilisatoren. Enthält kein Analyt, 3, ml.  
*Siehe die Anweisungen in der Packungsbeilage des FastPack® Vitamin D-Kalibrators für mehr Informationen.*

##### **Jedes FastPack® Vitamin D-Kontrollfläschchen enthält:**

- Bestandteile menschlichen Ursprungs, die in einer HEPES-Pufferlösung mit Vitamin D aufbereitet wurden, um die vorbestimmten Konzentrationen von Vitamin D zu erhalten.  
*Siehe die Anweisungen in der Packungsbeilage der FastPack® Vitamin D-Kontrolle für mehr Informationen.*

##### **Jedes FastPack® Vitamin D-Vorbehandlungsfläschchen enthält:**

- Vitamin D-Vorbehandlungspuffer, 200 µl  
Perfluorooctansäure (PFOA) in gereinigtem Wasser mit 0,1 % ProClin® 300 als Konservierungsstoff.

#### **Benötigte aber nicht mitgelieferte Materialien**

- FastPack® IP-System

#### **WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

- Nur für *in-vitro* Diagnose.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- In gekennzeichneten Arbeitsbereichen nicht essen, trinken oder rauchen.
- Nach dem Umgang mit Proben Hände gründlich waschen.
- HAMA-Interferenz: manche Menschen haben Antikörper gegen Mausprotein (HAMA), die zu Interferenzen bei Immunoassays führen können, die aus Mäusen stammende Antikörper verwenden.<sup>6</sup>
- FastPack® IP-Reagenzien sind bis zum Ablauf des Haltbarkeitsdatums auf dem Etikett stabil, wenn sie wie angewiesen gelagert und gehandhabt werden. Verwenden Sie keine FastPack® IP-Reagenzien, wenn sie schon abgelaufen sind.
- Entsorgen Sie gebrauchte FastPacks in einem Behälter für biologische Gefahrenstoffe.
- ProClin® 300 ist ein Reizstoff. Im Folgenden sind entsprechende Risiko- (R) und Sicherheits- (S) Sätze für ProClin® 300 aufgeführt:
  - R43 Kann bei Hautkontakt zu einer Sensibilisierung führen
  - S28-37 Nach Kontakt mit der Haut sofort mit viel Seife und Wasser abwaschen. Geeignete Handschuhe tragen.

## LAGERANWEISUNG

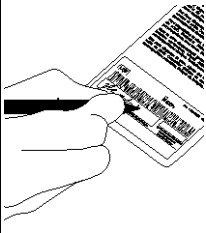
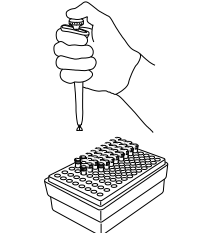
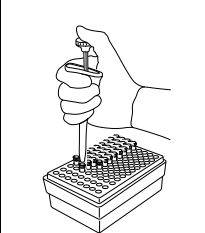
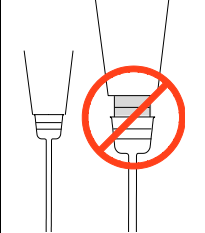
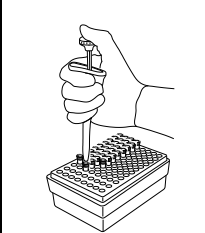
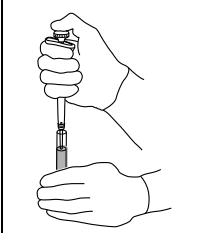
Bei 2 - 8 °C lagern.

## PROBENSAMMLUNG/-VORBEREITUNG


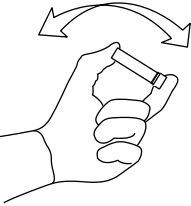

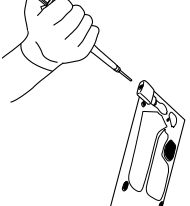
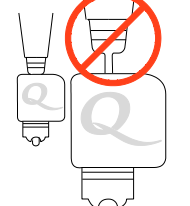
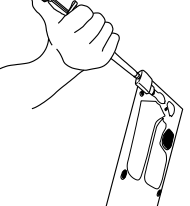
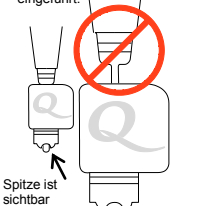
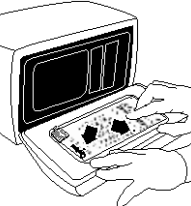

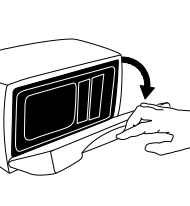
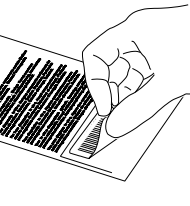
1. Serum, EDTA oder Lithiumheparin-Plasmaproben können für den FastPack® IP Vitamin D-Immunoassay verwendet werden.
2. Das National Committee for Clinical Laboratory Standards (Nationale Komitee für klinische Laborstandards) (NCCLS) gibt die folgenden Empfehlungen für die Handhabung, Verarbeitung und Lagerung von Blut.<sup>7,8,15</sup>
  - A. Nehmen Sie alle Blutproben unter Berücksichtigung von Routinevorsichtsmaßnahmen bei der Venenpunktion.
  - B. Für Serumproben:
    - a. Serum sollte innerhalb von 3 Stunden nach der Blutentnahme durch Zentrifugieren von den Zellen getrennt und bei 2-8 °C gelagert werden. Nehmen Sie das Serum zur Lagerung aus dem Originalröhrchen.
    - b. Wenn die Probe nicht innerhalb von 24 Stunden getestet wird, sollte sie bei -20 °C oder kälter eingefroren werden.<sup>15</sup>
  - C. Für Plasmaproben:
    - a. Sammeln Sie die Proben in EDTA- (lavendelfarbener Verschluss) oder heparinisierten (grüner Verschluss) Röhrchen.
    - b. Mischen Sie das Röhrchen sofort nach der Entnahme, indem Sie es mehrere Male umdrehen.
    - c. Plasma sollte innerhalb von 3 Stunden nach der Blutentnahme durch Zentrifugieren von den Zellen getrennt und bei 2-8 °C gelagert werden. Nehmen Sie das Plasma zur Lagerung aus dem Originalröhrchen.
    - d. Wenn die Probe nicht innerhalb von 24 Stunden getestet wird, sollte sie bei -20 °C oder kälter eingefroren werden.<sup>15</sup>
  - D. Proben dürfen keine roten Blutzellen oder anderen Partikel enthalten, um optimale Ergebnisse zu erlangen.
  - E. Proben, die Partikel zeigen, sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden.
  - F. Proben, die Trübung (hohen Lipidgehalt) aufweisen, sollten nicht verwendet werden.
  - G. Stellen Sie sicher, dass die Proben blasenfrei sind.
  - H. Alle Kalibratoren, Kontrollen und Serumproben müssen vorbehandelt werden, indem sie gemäß dem nachstehenden ASSAYVERFAHREN 1:3 mit dem Vitamin D-Vorbehandlungspuffer (1 Teil Probe, 2 Teile Vorbehandlungspuffer) verdünnt werden.

## ASSAYVERFAHREN

Genaue Anweisungen zum Durchführen von FastPack® Assays finden Sie im QA-Handbuch oder im Verfahrenshandbuch des FastPack® Systems.

					
<p><b>1.</b> Schreiben Sie den Namen/die ID-Nr. des Patienten sowie die Initialen des Bedieners auf das Abziehetikett des FastPack®.</p>	<p><b>2.</b> Drücken und halten Sie den Pipettenkolben vollständig nach unten gedrückt, so dass die Metallgriffe frei liegen und geöffnet sind.</p>	<p><b>3.</b> Während Sie den Kolben nach unten gedrückt halten, drücken Sie die Pipette fest in die Pipettenspitze, bis sie einrastet, und lassen Sie den Kolben dann los.</p>	<p><b>4.</b> Vergewissern Sie sich, dass die Pipettenspitze richtig auf der Pipette sitzt.</p>	<p><b>5.</b> Stellen Sie sicher, dass die Pipettenspitze ordnungsgemäß sitzt, indem Sie den Kolben vorsichtig nach unten bis zum ersten „Stopp“ drücken und dann loslassen. Es kann ein „Klicken“ zu hören sein, wenn der Kolben nicht ordnungsgemäß sitzt.</p>	<p><b>6.</b> Drücken Sie den Pipettenkolben vorsichtig nach unten bis zum ersten „Stopp“ und halten Sie ihn dort. Führen Sie die Pipettenspitze in das Probenröhrchen ein und entnehmen Sie Probenmaterial, indem Sie den Druckknopf langsam loslassen. Prüfen Sie die Pipettenspitze, und vergewissern Sie sich, dass das Probenmaterial keine Luftblasen enthält.</p>

## ASSAYVERFAHREN (Forts.)

 <p><b>7.</b> Alle Proben müssen vorbehandelt werden, indem sie 1:3 mit FastPack® Vitamin D-Vorbehandlungspuffer (1 Teil Probe, 2 Teile Vorbehandlungspuffer) verdünnt werden. Entleeren Sie die Probe in das (mit 200 µL Vorbehandlungspuffer vorgefüllte) Röhrchen, indem Sie den Pipettenkolben bis zum ersten Stopp nach unten drücken. Setzen Sie die Schraubkappe wieder fest auf das Pufferröhrchen.</p>	 <p><b>8.</b> Drehen Sie das Pufferröhrchen mindestens drei Mal um, so dass Probe und Puffer vollständig miteinander vermischt werden. Durch die Vermischung von Probe und Puffer wird Vitamin D freigesetzt, das so für die Untersuchung zur Verfügung steht.</p>	 <p><b>9.</b> Ziehen Sie die Probe aus dem Vorbehandlungspuffer-Röhrchen. Benutzen Sie hierfür dieselbe Pipettenspitze wie zuvor und wenden Sie diese Technik wie in Schritt 6 an.</p>	 <p><b>10.</b> Führen Sie, ohne den Pipettenkolben zu berühren, die gefüllte Pipettenspitze ganz in den Injektionsanschluss des FastPack® ein. Sie sollte fest sitzen.</p>	 <p><b>11.</b> Vergewissern Sie sich, dass die Pipettenspitze richtig in den Injektionsanschluss eingeführt ist.</p>	 <p><b>12.</b> Drücken Sie mit einer einzigen, ununterbrochenen Bewegung den Pipettenkolben schnell und ganz nach unten. Dadurch wird die Probe in den FastPack® injiziert. Gleichzeitig wird die Pipettenspitze automatisch abgeworfen.</p>
 <p>Spitze ist richtig eingeführt. Spitze ist sichtbar</p> <p><b>13.</b> Achten Sie darauf, die Pipettenspitze im Injektionsanschluss nicht zu lockern. Die Spitze dient als Stöpsel, der die Probe im FastPack® einschließt. Wenn Sie eine Undichtigkeit beobachten, entsorgen Sie den Pack ordnungsgemäß und wiederholen Sie den Arbeitsgang mit einem frischen FastPack®.</p>	 <p><b>14.</b> Legen Sie den FastPack® auf die Tür des Analysegeräts. Richten Sie dabei die Stifte an der Tür mit den Löchern im FastPack® aus. Schließen Sie die Tür des Analysegeräts.</p>	 <p><b>15.</b> Drücken Sie den blauen Start-Knopf am Analysegerät.</p>	 <p><b>16.</b> Öffnen Sie die Tür des Analysegeräts, wenn der Test abgeschlossen ist. Entfernen Sie den FastPack® und drucken Sie die Ergebnisse auf dem beigelegten Etikett aus.</p>	 <p><b>17.</b> Ziehen Sie das Etikett ab und kleben Sie es auf die Krankenakte.</p>	<p><b>Qualigen, Inc.</b> Carlsbad, CA 92011, USA</p> <p><b>Qualigen®</b></p>

## INSTRUMENTIERUNG

### FastPack® IP System

### DETAILS DER KALIBRIERUNG

Während des FastPack® IP Produktionsprozesses erzeugt Qualigen eine Master-Normkurve und speichert diese Informationen im Strichcode auf dem Etikett jedes FastPack® IP, wo sie vom Analysegerät des FastPack® IP-Systems während der Testsequenz gelesen werden kann. Das Analysegerät des FastPack® IP-Systems muss vom Anwender kalibriert werden, um sicherzustellen, dass es ordnungsgemäß auf die jeweils verwendete Charge FastPacks geeicht ist. Für jede Art von Test müssen eigene Kalibrierungen durchgeführt werden, z.B. Gesamt-PSA, Testosteron, Vitamin D, freier T4. Die Häufigkeit der Kalibrierung hängt von jedem Testtyp ab. Für den FastPack® IP Vitamin D-Immunoassay muss das Analysegerät des FastPack® IP-Systems einmal alle 30 Tage oder dann kalibriert werden, wenn ein neues Los von Vitamin D-FastPacks verwendet wird.

Immer wenn der Benutzer eine erste Kalibrierung für ein bestimmtes Los von FastPacks durchführt oder ein neues Los von Kalibratoren verwendet, müssen 3 FastPacks zur Kalibrierung (Triplikate) verwendet werden. Immer wenn eine Rekalibrierung mit dem gleichen Los von FastPacks und Kalibrator durchgeführt wird, müssen 3 FastPacks für die Kalibrierung verwendet werden. Siehe das FastPack® IP System-Verfahrenshandbuch zum „Durchführen einer Kalibrierung“.

## ERGEBNISSE

Das Analysegerät des FastPack® IP-Systems verwendet die Informationen aus dem Strichcode, um eine Lookup-Tabelle mit x-/y-Werten zu erstellen, die die Normkurve darstellen, und bestimmt die Konzentration unbekannter Proben durch lineare Interpolation.

## QUALITÄTSSICHERUNG

Qualitätssicherungsmaterialien simulieren echte Proben und sind unerlässlich für die Überwachung der Systemleistung von Assays. Gute Laborpraxis umfasst den Einsatz von Kontrollproben, um sicherzustellen, dass alle Reagenzien und Protokolle korrekt durchgeführt werden. Siehe Verfahrenshandbuch des FastPack® IP-Systems zu „Kontrolltest“. Es sollten mindestens zwei Stufen von Qualitätssicherungsmaterialien verwendet werden.

Anwender sollten immer Bundes-, Landes- und örtliche Richtlinien bezüglich der Durchführung externer Qualitätssicherungen befolgen.

## GRENZEN DES VERFAHRENS

- Plasmaproben werden mit Lithium-Heparin oder EDTA als Antikoagulantien entnommen.
- Verwenden Sie keine lipämischen Proben, da lipämische Proben einen falsch niedrigen Wert erzeugen.
- Die Proben können innerhalb des anzeigebaren Bereichs der Bestimmungsgrenze (12,9 ng/ml) und der oberen Grenze des Kalibrierungsbereichs, 150 ng/ml gemessen werden.
- Proben von >150 ng/ml sollten als solche berichtet oder mit einer anderen Methode nochmals getestet werden.
- Proben von Patienten, die Präparate mit monoklonalen Maus-Antikörpern zur Diagnose oder Therapie erhalten haben, können humane Anti-Maus-Antikörper (HAMA) enthalten. Solche Proben können entweder falsch erhöhte oder erniedrigte Werte aufweisen, wenn sie mit Assay-Kits getestet werden, die Maus-monoklonale Antikörper einsetzen.
- Heterophile Antikörper in einer Probe können Interferenzen in Immunoassay-Systemen verursachen.
- Ab und zu erscheinen Vitamin D-Werte gesenkt, da heterophile Antikörper in der Probe des Patienten vorhanden sind oder aufgrund von nichtspezifischer Proteinbindung. Ist der Vitamin D-Wert konsistent mit klinischen Beweisen, sollten weitere Vitamin D-Tests durchgeführt werden, um das Ergebnis zu bestätigen.
- Zu Diagnosezwecken sollte der Fastpack® IP Vitamin D Immunoassay stets zusammen mit der Anamnese des Patienten, klinischen Untersuchungen und anderen Befunden beurteilt werden.
- Der FastPack® IP Vitamin D-Immunoassay wurde nicht in patientennahen Situationen evaluiert.

## ERWARTETE WERTE/REFERENZINTERVALLE

Jedes Labor sollte seine eigenen Bereiche für seine lokalen Populationen bestimmen. Es besteht kein allgemeiner Konsens über die optimale Vitamin D-Konzentration. Die Bereiche sollten eher auf klinischen Entscheidungswerten beruhen, die auf beide Geschlechter zutreffen, als auf populationsbasierten Referenzbereichen. Eine Referenzintervallstudie mit Serumproben von 367 Probanden aus 5 verschiedenen geographischen Regionen der Vereinigten Staaten und Probenentnahmen im Winter, Frühling und in den frühen Sommermonaten erzielte die folgenden in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Ergebnisse. Das nicht parametrische 2,5 - 97,5 Perzentil von 13,7 - 57,3 ng/ml stellt das in dieser Studie bestimmte Referenzintervall dar.

Beobachtete Werte	
Mittelwert	27,6 ng/ml
Median	24,2 ng/ml
2,5 - 97,5 Perzentil	13,7 - 57,3 ng/ml

## SPEZIFISCHE LEISTUNGSEIGENSCHAFTEN

### Präzision

Die Präzision wurde gemäß der CLSI EP5-A2 Richtlinie evaluiert. Es wurden vier Proben mit Konzentrationen von ~25, ~30, ~45 und ~80 ng/ml im Duplikat in zwei Durchläufen pro Tag auf jedem der beiden Analysegeräte des FastPack® IP-Systems getestet, jedes mit einer individuellen FastPack® IP-Reagenzcharge über einen Zeitraum von 20 Tagen, um 160 Wiederholungsbestimmungen für jede Probe zu erzielen (80 Replikate auf jedem der beiden Analysegeräte). Es wurden Abweichungen innerhalb des Durchlaufs, zwischen den Durchläufen und zwischen den Tagen sowie die Gesamtungenauigkeit berechnet mithilfe eines hierarchischen zweifaktoriellen ANOVA-Modells mit hierarchischen Durchläufen innerhalb des Tages. In den folgenden Tabellen sind die Ergebnisse nach Instrument-/Reagenz-Kombination aufgelistet:

Analysegerät 1, Reagenzcharge 1

	Durchschnitt	Innerhalb des Durchlaufs		Zwischen den Durchläufen		Zwischen den Tagen		Gesamt	
		SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK
Probe 1	27,3	2,8	10,2	1,3	4,9	1,9	7,1	3,7	13,4
Probe 2	31,1	3,3	10,7	0,0	0,0	1,8	5,7	3,8	12,1
Probe 3	45,5	3,9	8,5	0,0	0,0	2,0	4,3	4,3	9,5
Probe 4	84,9	4,1	4,8	0,0	0,0	3,2	3,7	5,1	6,1

Analysegerät 2, Reagenzcharge 2

	Durchschnitt	Innerhalb des Durchlaufs		Zwischen den Durchläufen		Zwischen den Tagen		Gesamt	
		SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK	SA	% VK
Probe 1	25,9	3,9	15,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,9	15,1
Probe 2	32,7	3,7	11,2	0,0	0,0	2,0	6,0	4,2	12,7
Probe 3	46,1	3,5	7,5	0,0	0,0	1,2	2,6	3,7	7,9
Probe 4	76,4	3,2	4,1	0,0	0,0	1,7	2,3	3,6	4,7

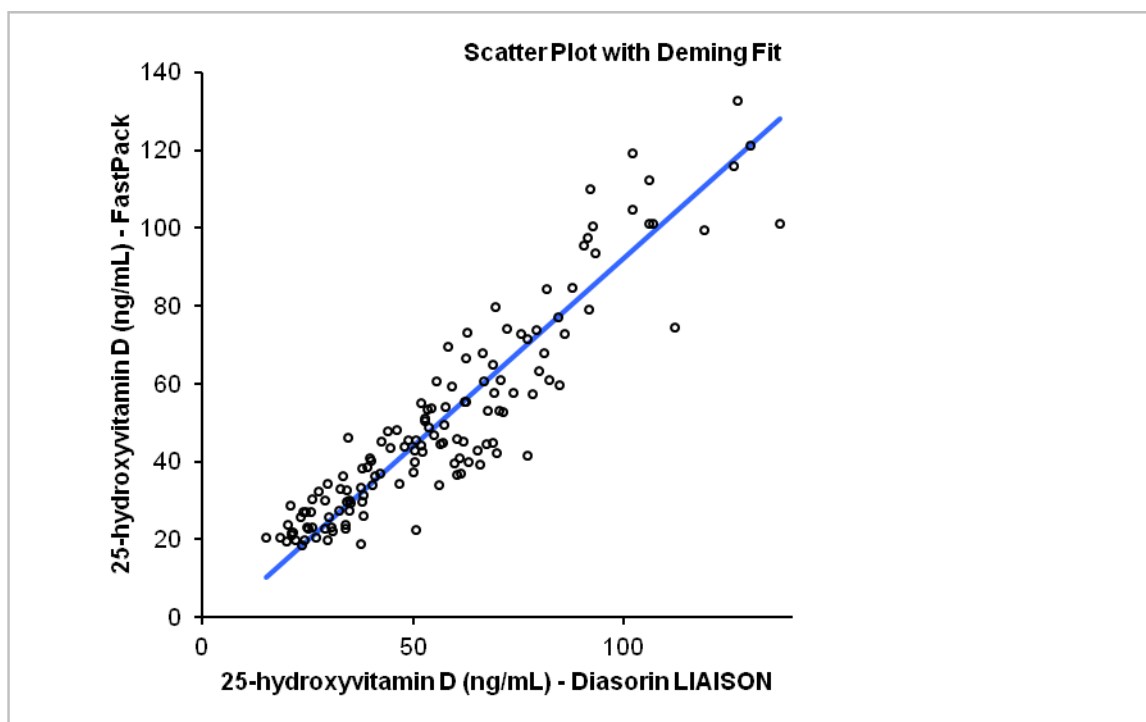
**Bereich der Linearität**

Für Vitamin D, wie es mit dem FastPack® IP-Vitamin D-Immunoassay getestet wurde, erwies sich die Methode als linear von der LOQ (Bestimmungsgrenze) (12,9 ng/ml) bis 150 ng/ml innerhalb von 5 ng/ml im Intervall.

**Methodenvergleich**

Es wurden klinische Serumproben (n=137) verwendet, um die mit dem FastPack® IP-Vitamin D-Immunoassay erzielten Werte mit den mit dem DiaSorin LIAISON® Vitamin D TOTAL Assay erzielten Werten zu vergleichen. Die Werte wurden mithilfe des Deming-Regressionstests mit dem verbundenen Korrelationskoeffizienten auf Übereinstimmung hin beurteilt.

n	Beobachtungsbereich (ng/ml)	Schnittpunkt (ng/ml)	Steigung	R
137	18,6 – 132,6	-4,6	0,97	0,92



### Störende Substanzen

Die Auswirkung von Störsubstanzen auf die Mengenbestimmung von Vitamin D wurde durch die Aufbereitung von Serumproben mit niedrigen und hohen Vitamin D-Konzentrationen mit bekannten Konzentrationen von Bilirubin, Biotin, Cholesterin, Protein, Hämoglobin und Lipiden untersucht. Der mit jeder Störsubstanz für die Probe erzielte Wert wurde mit dem Wert verglichen, der für die Probe ohne die Störsubstanz erzielt wurde und der Prozentanteil wurde in ng/ml bestimmt. Diese Substanzen zeigten keine Interferenzen bei den angegebenen Werten.

	Störende Substanz					
	Bilirubin (40 mg/dl)	Biotin (1 µg/ml)	Cholesterin (500 mg/dl)	Protein (10,7 g/dl)	Hämoglobin (500 mg/dl)	Lipide (250 mg/dl)
Nicht versetztes Aliquot	59,1 ng/ml	36,0 ng/ml	38,5 ng/ml	28,2 ng/ml	49,0 ng/ml	98,2 ng/ml
Versetztes Aliquot	53,1 ng/ml	34,9 ng/ml	41,3 ng/ml	31,1 ng/ml	45,7 ng/ml	88,5 ng/ml
% Bias	-10,2	-3,1	7,3	10,3	-6,7	-9,9

### Kreuzreaktivität

Es wurden zwei Serumproben mit niedrigen und hohen Vitamin D-Konzentrationen ohne und mit hinzugefügten Konzentrationen potenziell kreuzreagierender Gemische getestet, einschließlich 1,25-Dihydroxy Vitamin D<sub>2</sub>; 1,25-Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub>; Vitamin D<sub>2</sub>; Vitamin D<sub>3</sub>; 25-Hydroxy Vitamin D<sub>2</sub>; 25-Hydroxy Vitamin D<sub>3</sub>; 24,25-Dihydroxy Vitamin D<sub>2</sub>; 24,25-Dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub>; 3-epi-25-Hydroxy Vitamin D<sub>3</sub> und Paricalcitol. Es wurde die maximale Kreuzreaktivität bei der angegebenen Konzentration der kreuzreagierenden Substanz für jede Mischung bestimmt.

Kreuzreaktionsmittel	Getestete Konzentration (ng/ml)	% Kreuzreaktivität
Vitamin D <sub>2</sub>	500	2,0
Vitamin D <sub>3</sub>	500	1,9
1,25-(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D <sub>2</sub>	100	4,0
1,25-(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D <sub>3</sub>	100	9,8
3-epi-25(OH) Vitamin D <sub>3</sub>	400	7,8
25 (OH) Vitamin D <sub>2</sub>	100	93,0
25 (OH) Vitamin D <sub>3</sub>	25	106,0
Paricalcitol	200	-1,2
24, 25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>2</sub>	40	-0,9
24, 25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub>	20	117,4

### Erfassungsgrenze (LOB), Nachweisgrenze (LOD) und Bestimmungsgrenze (LOQ)

Die Erfassungsgrenze (LOB, der höchste Messwert, der für eine Blindprobe wahrscheinlich ermittelt wird), die Nachweisgrenze (LOD, die kleinste Analytmenge in einer Probe, die mit Typ I- und II-Fehlerraten bei 5 % erkannt werden kann) und die Bestimmungsgrenze (LOQ, die kleinste Analytmenge in einer Probe, die zuverlässig erkannt werden kann und bei der der Gesamtfehler der vorbestimmten Anforderung für Genauigkeit entspricht) wurden gemäß CLSI EP17-A für den FastPack<sup>®</sup> IP-Vitamin D-Immunoassay bestimmt. In dieser Studie wurde die Erfassungsgrenze aus 160 Wiederholungsbestimmungen von entlipidisiertem Vitamin D-freiem Humanserum auf jedem von sechs FastPack<sup>®</sup> Instrumenten unter Verwendung von drei Reagenzchargen ermittelt. Rohe RLUs aus den Assays wurden in sichtbare ng/ml basierend auf der Kalibrierungskurve für jeden Assay umgewandelt. Die Erfassungsgrenze wurde als das oberste 95. Dieser Wert betrug 2,3 ng/ml Vitamin D.

Die Nachweisgrenze wurde basierend auf 60 Wiederholungsbestimmungen von vier niedrigen Proben geschätzt. Gemäß der CLSI EP17-A-Richtlinie wurde die Nachweisgrenze durch die folgende Gleichung ermittelt:

$$\text{LOD} = \text{LOB} + (c_{\beta} * \text{SD}_s),$$

Wo  $c_{\beta} = 1,645 / (1 - (1 / (4 * f)))$ , wo  $f$  der Freiheitsgrad und  $\text{SD}_s$  die gepoolte Standardabweichung der Beobachtungen ist. In dieser Studie lag die gefundene Nachweisgrenze bei 6,2 ng/ml Vitamin D.

Für die Analyse der Bestimmungsgrenze wurde % VK gegen die Vitamin D-Konzentration dargestellt und die Konzentration wurde identifiziert, bei der ein VK von 20 % auftritt basierend auf einem Punkte-Fit. Die Bestimmungsgrenze wurde auf 12,9 ng/ml Vitamin D festgelegt.

## REFERENZEN

1. Pilz S, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat. Rev. Cardiol.* 2009; 6:621-30.
2. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW, The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320:981-991.
3. Holick MF, Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc. In „Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism“, American Society for Bone and Mineral Research. 3<sup>rd</sup> Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; 74-81.
4. Souberbielle JC, Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine* 2006; 73:249-53.
5. Cavalier E, Vitamin D: current status and perspectives. *Clin. Chem. Lab Med* 2009; 47(2):120-27.
6. Peterlik M, Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: an emerging world-wide public health problem. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009; 6:2585-607.
7. Grant WB, Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in Western Europe. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2009; 99:104-13.
8. Holick MF, Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357:266-81.
9. Autier P, Vitamin D supplementation and total mortality: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2007; 167(16):1730-7.
10. Bischoff-Ferrari HA, Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:18-28.
11. Steingrimsdottir L, Relationship between serum parathyroid hormone Levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *JAMA* 2005; 294(18):2336-41.
12. Grant WB, Current impediments to acceptance of the ultraviolet-B-vitamin D-cancer hypothesis. *Anticancer Res.* 2009; 29:3597-604.
13. Pilz S, Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke* 2008; 9:2611-13.
14. Bischoff-Ferrari HA, Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009; 339:b3692.
15. Wielders JP, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH)-Vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem* 2009;55:1584-5.



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 USA  
Technischer Support  
+1 (760) 918-9165  
(877) 709-2169



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hannover, Deutschland





Pour la mesure quantitative de la 25-hydroxyvitamine D et autres métabolites hydroxylés dans le sérum et le plasma humain.

La concentration de 25-hydroxyvitamine D d'un échantillon donné déterminée à l'aide de dosages immunologiques provenant de fabricants différents peut varier en raison des différences entre les méthodes de dosage et la spécificité des réactifs. Les résultats rapportés au médecin par le laboratoire doivent identifier la méthode de dosage de la 25-hydroxyvitamine D utilisée. En effet, les valeurs obtenues par des méthodes de dosage différentes ne doivent pas être utilisées de manière interchangeable.

**ATTENTION :** en vertu de la loi fédérale des États-Unis, ce produit ne peut être vendu qu'à un médecin ou à un laboratoire clinique, et ne doit être utilisé que par un médecin ou sur son ordre.

**Au Canada, l'utilisation de ce produit est exclusivement restreinte aux laboratoires.**

### UTILISATION PRÉVUE

Le kit de dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D est conçu pour déterminer la quantité totale de 25-hydroxyvitamine D et autres métabolites hydroxylés dans le sérum et le plasma humain. Le dosage doit être utilisé comme une aide dans l'évaluation de l'insuffisance en vitamine D chez les adultes. Le kit complet de dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D est conçu pour être utilisé avec l'analyseur du système FastPack® IP.

### RÉSUMÉ

La vitamine D est un terme communément utilisé pour désigner une famille de sécostéroïdes en relation étroite les uns avec les autres. Il s'agit d'une prohormone stéroïde liposoluble produite principalement par photochimie dans la peau à partir du 7-déhydrocholestérol.<sup>1,2</sup> Avec l'exposition aux rayons du soleil, le 7-déhydrocholestérol, situé en profondeur dans les couches de l'épiderme à croissance active, subit un clivage protéolytique de l'anneau « B » qui est isomérisé sous forme de vitamine D<sub>3</sub> (Cholécalciférol).<sup>3</sup> Les vitamines D<sub>3</sub> et D<sub>2</sub> peuvent toutes deux être absorbées par la nourriture, la vitamine D<sub>2</sub> provenant d'une source artificielle, mais seuls 10-20 % environ des quantités de vitamine D sont fournies par le biais des apports nutritionnels.<sup>1</sup> Les vitamines D<sub>3</sub> et D<sub>2</sub> peuvent se trouver sous la forme de suppléments vitaminiques. La vitamine D est transformée en hormone active 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamine D (Calcitriol) à travers deux réactions d'hydroxylation. La première réaction d'hydroxylation convertit la vitamine D en 25-OH vitamine D et se produit dans le foie. La seconde réaction d'hydroxylation convertit le 25-OH vitamine D en 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamine D biologiquement actif et se produit dans le foie ainsi que dans d'autres cellules du corps. Plusieurs cellules expriment le récepteur de la vitamine D et environ 3 % du génome humain est directement ou indirectement régulé par le système endocrinien de la vitamine D.<sup>1</sup>

La vitamine D est stockée dans les tissus adipeux et pénètre dans le système circulatoire en se liant à la protéine de liaison à la vitamine D (VDBP) et à l'albumine. La principale forme de stockage de la vitamine D est le 25-OH vitamine D, présente dans le sang à une concentration 1 000 fois plus élevée par rapport à la forme active 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamine D. 25-OH vitamine D a une demi-vie de 2 à 3 semaines contre 4 heures pour 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamine D. Par conséquent, 25-OH vitamine D est l'analyte de choix pour la détermination de l'état de la vitamine D.<sup>4,5</sup> La concentration de 25-OH vitamine D dans le sérum est considérée comme la mesure la plus fiable en ce qui concerne l'état général de la vitamine D et peut ainsi être utilisée pour déterminer si le patient présente une insuffisance en vitamine D.<sup>2</sup> L'évaluation de l'état de la vitamine D peut également nécessiter la détermination de la cause des concentrations anormales de calcium dans le sérum des patients.

Les études épidémiologiques ont montré une forte prévalence mondiale en termes d'insuffisance et de carence en vitamine D.<sup>8</sup> La mesure du statut en vitamine D fournit des opportunités d'intervention thérapeutique ou préventive.<sup>7,8,9</sup> La carence en vitamine D est une cause d'hyperparathyroïdie secondaire et de maladies à l'origine de métabolisme osseux déficient (comme le rachitisme, l'ostéoporose, l'ostéomalacie).<sup>4,10,11</sup> Des concentrations réduites en 25-OH vitamine D dans le sang (insuffisance en vitamine D) ont été associées avec une augmentation du risque de nombreuses maladies chroniques, y compris les cancers les plus courants, certaines maladies auto-immunes ou infectieuses, ou encore des troubles cardiovasculaires.<sup>1,4,8,10,12-14</sup>

### PRINCIPE DU TEST

Le dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D est un dosage par chimioluminescence de particules paramagnétiques, basé sur le principe de « compétition ».

- La vitamine D endogène dans l'échantillon sera mélangée avec un tampon avant le traitement puis sera ajoutée au lot.
- Incubation primaire : un anticorps monoclonal (souris) anti-vitamine D, marqué à la phosphatase alcaline [100 µl], réagit avec la vitamine D issue de l'échantillon du patient traité au préalable, d'un échantillon de contrôle ou d'étalonnage [100 µl].
- Incubation secondaire : la vitamine D, liée de manière covalente à la biotine et pré-liée aux particules paramagnétiques revêtues de streptavidine [150 µl], est combinée au complexe immunoréactif. Le conjugué qui n'a pas réagi avec l'échantillon se liera aux sites de liaison non-occupés des particules paramagnétiques revêtues de streptavidine-biotine-vitamine D.

- Élimination des produits non liés : les particules paramagnétiques sont lavées plusieurs fois avec un tampon de lavage [solution/0,2 ml] pour éliminer les produits non liés.
- Addition du substrat et détection : un substrat chimioluminescent [140 µl] est ajouté au complexe lié à la phase solide, et résulte en chimioluminescence mesurée à l'aide de l'analyseur du système FastPack®.
- La quantité d'anticorps marqués liés est inversement proportionnelle à la concentration en vitamine D dans l'échantillon.

#### **Kit – Contenu et concentration**

##### **Chaque kit complet de dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D contient :**

- 30 FastPacks (Format pipette IP)
- 1 flacon d'étalonnage FastPack® Vitamine D
- 1 flacon de contrôle 1 FastPack® Vitamine D
- 1 flacon de contrôle 2 FastPack® Vitamine D
- 32 flacons de tampon de prétraitement FastPack® Vitamine D
- 1 fiche d'étalonnage
- 1 fiche de plage de contrôle

##### **Chaque lot de réactif FastPack® IP Vitamine D contient :**

- Particules paramagnétiques, 150 µl  
Biotine-25-OH vitamine D liée à des particules paramagnétiques revêtues de streptavidine en solution tampon contenant 0,1 % de ProClin® 300 en tant qu'agent de conservation.
- Solution d'anticorps de vitamine D, 100 µl  
Une solution d'anticorps contenant un anticorps monoclonal de souris anti 25-OH vitamine D marqué de phosphatase alcaline (ALP) dans une matrice protéinique.
- Tampon de lavage, 2,0 ml  
Tampon Tris contenant des surfactants.
- Substrat, 140 µl  
ImmuGlow™ Plus : indoxyle-3-phosphate et lucigénine en solution tampon contenant des agents de conservation.

##### **Chaque flacon d'étalonnage FastPack® Vitamine D contient :**

- Contient une solution tampon Tris avec des stabilisateurs de protéines. Ne contient pas d'analyte, 3 ml.  
*Voir la notice d'instructions du kit d'étalonnage FastPack® Vitamine D, pour de plus amples informations.*

##### **Chaque flacon de contrôle FastPack® Vitamine D contient :**

- Contient des composants d'origine humaine préparés dans une solution tampon HEPES avec de la vitamine D pour produire des concentrations prédéterminées de vitamine D.  
*Voir la notice d'instructions du contrôle FastPack® Vitamine D, pour de plus amples informations.*

##### **Chaque flacon de prétraitement FastPack® Vitamine D contient :**

- Tampon de prétraitement à la vitamine D, 200 µl  
Acide perfluorooctanoïque (APFO) dans de l'eau purifiée contenant 0,1 % de ProClin® 300 comme agent conservateur.

#### **Produits nécessaires mais non fournis**

- Système FastPack® IP

#### **AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS**

- Pour une utilisation de diagnostic *in vitro* uniquement.
- Ne pas aspirer à la bouche.
- Ne pas manger, boire ou fumer dans les zones de travail désignées.
- Se laver soigneusement les mains après avoir manipulé les échantillons.
- Interférence HAMA : certaines personnes ont des anticorps réagissant avec les protéines murines (HAMA), ce qui peut causer une interférence dans les dosages immunologiques utilisant des anticorps dérivés des souris.<sup>6</sup>
- Les réactifs FastPack® IP sont stables jusqu'à la date d'expiration sur l'étiquette quand ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les réactifs FastPack® IP après la date d'expiration.
- Jeter les FastPacks usagés dans un récipient pour produits biologiques dangereux.
- ProClin® 300 est un produit irritant. Les identifications suivantes (risque, R, et sécurité, S) s'appliquent au ProClin® 300 :

R43 Peut provoquer une sensibilisation en cas de contact cutané

S28-37 Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et du savon. Porter des gants appropriés.

## CONSERVATION

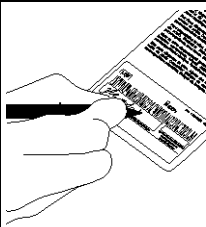
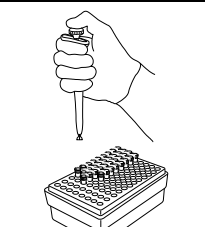
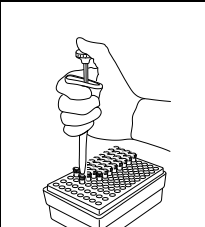
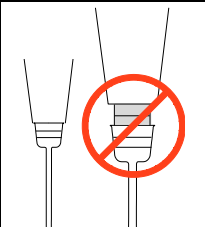
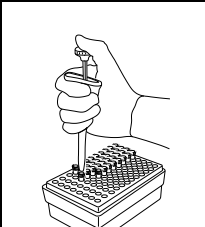
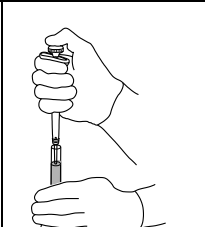
Stocker entre 2 et 8 °C.

## PRÉLÈVEMENT/PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON


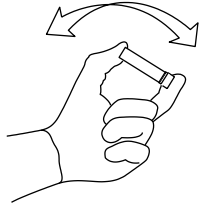

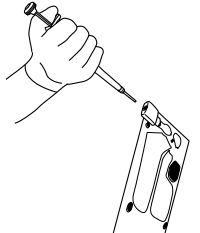
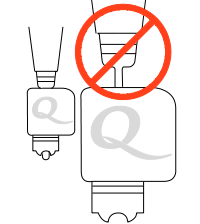
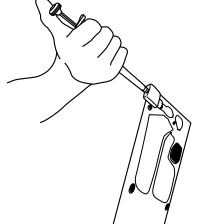
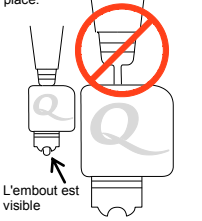
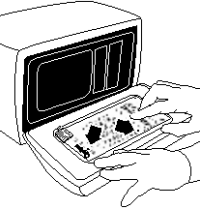

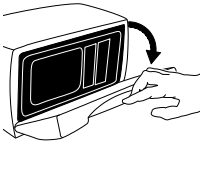

1. Des échantillons de sérum, d'EDTA ou de plasma à l'héparine de lithium peuvent être utilisés pour le dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D.
2. Le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, Comité national pour les normes de laboratoires cliniques) fournit les recommandations suivantes pour la manipulation, le traitement et la conservation du sang.<sup>7,8,15</sup>
  - A. Prélever tous les échantillons de sang en observant les précautions habituelles en rapport avec la ponction veineuse.
  - B. Pour les échantillons de sérum :
    - a. Le sérum doit être séparé des cellules par centrifugation dans les 3 heures après le prélèvement et stocké entre 2 et 8 °C. Transférer le sérum depuis le tube d'origine pour la conservation.
    - b. Un échantillon non testé dans les 24 heures doit être congelé à une température de -20 °C ou inférieure.<sup>15</sup>
  - C. Pour les échantillons de plasma :
    - a. Prélever les échantillons dans un tube EDTA (capuchon lavande) ou hépariné (capuchon vert).
    - b. Mélanger le tube immédiatement après le prélèvement en le retournant doucement plusieurs fois.
    - c. Le plasma doit être séparé des cellules par centrifugation dans les 3 heures après le prélèvement et stocké entre 2 et 8 °C. Transférer le plasma depuis le tube d'origine pour la conservation.
    - d. Un échantillon non testé dans les 24 heures doit être congelé à une température de -20 °C ou inférieure.<sup>15</sup>
  - D. Afin d'obtenir des résultats optimaux, les échantillons ne doivent pas contenir de globules rouges ni de particules.
  - E. Les échantillons contenant des particules doivent être centrifugés avant leur utilisation.
  - F. Les échantillons troubles (à haute teneur en lipides) ne doivent pas être utilisés.
  - G. Veiller à ce que les échantillons soient exempts de bulles d'air.
  - H. Tous les échantillons d'étalonnage, de contrôle et de sérum doivent être prétraités en les diluant au 1:3 avec le tampon de prétraitement à la Vitamine D (1 volume d'échantillon, 2 volume de tampon de prétraitement), conformément à la PROCÉDURE DE DOSAGE décrite ci-dessous.

## PROCÉDURE DE DOSAGE

Pour tout renseignement sur le fonctionnement des dosages FastPack®, consulter le manuel de procédures du système FastPack® ou le manuel d'assurance qualité.

					
<b>1.</b> Inscrire le nom/code du patient, ainsi que les initiales de l'opérateur, sur l'étiquette du FastPack®.	<b>2.</b> Appuyer sur le piston de la pipette et le maintenir complètement enfoncé afin que les pinces métalliques soient allongées et ouvertes.	<b>3.</b> Tout en maintenant le piston enfoncé, pousser fermement la pipette dans son embout jusqu'à ce qu'elle se mette en place avec un clic, puis relâcher le piston.	<b>4.</b> Vérifier que l'embout de la pipette est correctement posé sur cette dernière.	<b>5.</b> Vérifier que l'embout de la pipette est correctement inséré en poussant doucement le piston jusqu'au premier cran et en le relâchant. Un « clic » sonore peut se produire si le piston n'est pas bien inséré.	<b>6.</b> Pousser doucement le piston jusqu'au premier cran et maintenir. Placer l'embout de la pipette dans le tube échantillon et prélever l'échantillon en relâchant doucement le piston. Examiner l'embout de la pipette pour s'assurer que l'échantillon ne contient aucune bulle d'air.

## PROCÉDURE DE DOSAGE (suite)

 <p><b>7.</b> Tous les échantillons doivent être prétraités en diluant à 1:3 avec le tampon de prétraitement FastPack® Vitamine D (1 volume d'échantillon, 2 volume de tampon de prétraitement). Éjecter l'échantillon dans le tube (préalablement rempli de 200 µl de tampon de prétraitement) en appuyant sur le piston jusqu'au premier cran. Replacer le bouchon à vis et bien le serrer sur le tube tampon.</p>	 <p><b>8.</b> Retourner le tube tampon au moins 3 fois pour bien mélanger les échantillons et le tampon. Le fait de mélanger l'échantillon et le tampon libère la vitamine D présente afin de la rendre disponible pour le dosage.</p>	 <p><b>9.</b> Prélever l'échantillon du tube tampon de prétraitement en utilisant le même embout de pipette qu'auparavant et suivre la même technique que celle détaillée à l'étape 6 ci-dessus.</p>	 <p><b>10.</b> En laissant libre le piston de la pipette, insérer complètement l'embout de la pipette pleine dans l'orifice d'injection du FastPack®. Il doit parfaitement s'insérer.</p>	 <p><b>11.</b> Vérifier que l'embout de la pipette est correctement inséré dans l'orifice d'injection.</p>	 <p><b>12.</b> D'un seul mouvement, enfoncer rapidement le piston de la pipette jusqu'au bout. Ceci injecte l'échantillon dans le FastPack® tout en éjectant automatiquement l'embout de pipette.</p>
 <p>L'embout est bien en place. L'embout est visible</p> <p><b>13.</b> Faire attention à ne pas dégager l'embout de pipette de l'orifice d'injection. L'embout sert de bouchon et ferme hermétiquement l'échantillon dans le FastPack®. Si une fuite est constatée, mettre l'ensemble au rebut de manière adéquate et recommencer la procédure avec un nouveau FastPack®.</p>	 <p><b>14.</b> Placer le FastPack® sur la porte de l'analyseur. Centrer les trous du FastPack® sur les ergots de la porte. Fermer la porte de l'analyseur.</p>	 <p><b>15.</b> Appuyer sur le bouton bleu Démarrer de l'analyseur.</p>	 <p><b>16.</b> Ouvrir la porte de l'analyseur lorsque le test est terminé. Enlever le FastPack® et inscrire les résultats sur l'étiquette jointe.</p>	 <p><b>17.</b> Décoller l'étiquette et la coller dans le dossier du patient.</p>	<p><b>Qualigen, Inc.</b> Carlsbad, CA 92011 États-Unis</p> <p><b>Qualigen®</b></p>

## INSTRUMENTATION

### Système FastPack® IP

### DÉTAILS DE L'ÉTALONNAGE

Au cours du processus de fabrication des FastPack® IP, Qualigen génère une courbe de référence puis transfère les informations correspondantes sur le code barre de chaque étiquette FastPack® IP, où elles sont lues par l'analyseur du système FastPack® IP pendant la séquence de test. L'analyseur du système FastPack® IP doit être étalonné par l'utilisateur pour assurer qu'il est correctement réglé pour le lot particulier de FastPacks utilisé. Des étalonnages séparés doivent être effectués pour chaque type de dosage (PSA total, testostérone, vitamine D, TSH, T4 libre, etc.). La fréquence d'étalonnage varie selon le type de dosage. Pour le dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D,

l'analyseur du système FastPack® IP doit être étalonné tous les 30 jours ou à chaque fois qu'un nouveau lot de FastPacks Vitamine D est utilisé.

Lors de l'étalonnage initial pour un lot de FastPacks particulier ou de l'utilisation d'un nouveau lot d'étalonneurs, 3 FastPacks sont requis pour l'étalonnage (triplicat). Lorsqu'un réétalonnage est effectué avec le même lot de FastPacks et d'étalonneur, 3 FastPacks sont nécessaires. Voir le manuel de procédures du système FastPack® IP pour connaître la marche à suivre pour l'étalonnage.

## RÉSULTATS

L'analyseur du système FastPack® IP utilise les informations contenues dans le code à barres pour établir une table de consultation des valeurs de x et y représentant la courbe de référence et estime les concentrations d'échantillons inconnus par interpolation linéaire.

## CONTRÔLE QUALITÉ

Les produits de contrôle de la qualité simulent des échantillons véritables et sont essentiels pour surveiller la performance des dosages du système. Les bonnes pratiques de travail en laboratoire (GLP) comprennent l'utilisation d'échantillons de contrôle pour s'assurer que tous les réactifs et protocoles se comportent correctement. Voir le manuel de procédures du système FastPack® IP pour connaître la marche à suivre pour les tests de contrôle. Utiliser au moins deux niveaux de produits de contrôle de la qualité.

Respecter les recommandations applicables au niveau fédéral, étatique et local pour l'exécution de contrôles externes de la qualité.

## LIMITES DE LA PROCÉDURE

- Échantillons de plasma à prélever en utilisant de l'EDTA ou de l'héparine de lithium comme anticoagulants.
- Ne pas utiliser d'échantillons lipémiques car ceux-ci généreront un résultat trop faible.
- Les échantillons peuvent être mesurés dans la plage de la limite de quantification (12,9 ng/ml) et jusqu'à la partie supérieure de la plage d'étalonnage, 150 ng/ml.
- Les échantillons supérieurs à 150 ng/ml doivent être signalés ou remesurés en utilisant une autre méthode.
- Les échantillons provenant de patients ayant reçu des préparations d'anticorps monoclonaux d'origine murine à des fins de diagnostic ou de traitement peuvent contenir des anticorps anti-souris humains (HAMA). Ils peuvent indiquer des valeurs faussement élevées ou faussement basses lorsqu'ils sont testés avec des kits de dosage utilisant des anticorps monoclonaux d'origine murine.
- Les anticorps hétérophiles d'un échantillon peuvent causer des interférences dans les systèmes de dosages immunologiques.
- Il arrive parfois que les niveaux de vitamine D paraissent diminués ou élevés à cause d'anticorps hétérophiles présents dans l'échantillon du patient ou à cause d'une liaison non spécifique à des protéines. Si le niveau de vitamine D est en contradiction avec les constatations cliniques, il est conseillé d'effectuer d'autres tests de vitamine D pour confirmer le résultat.
- À des fins de diagnostic, le dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D doit toujours être évalué en conjonction avec les antécédents médicaux du patient, les examens cliniques et les autres résultats.
- Le dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D n'a pas été évalué dans des paramètres de lieux de soin.

## VALEURS ATTENDUES / INTERVALLES DE RÉFÉRENCE

Chaque laboratoire doit déterminer les plages pour leur population locale. Il n'existe aucun accord universel concernant la concentration optimale de vitamine D. Les plages doivent se baser sur des valeurs établies cliniquement, s'appliquant aux deux sexes plutôt que sur des plages de référence basées sur des populations. Les résultats fournis dans le tableau ci-dessous sont issus d'une étude d'intervalles de référence utilisant des échantillons de sérum issus de 367 sujets, représentant 5 régions géographiques différentes des États-Unis, l'échantillonnage ayant eu lieu en hiver, au printemps et pendant les premiers mois de l'été. Les 2,5èmes - 97,5èmes percentiles non-paramétriques des concentrations de 13,7 - 57,3 ng/ml fournissent l'intervalle de référence déterminé à partir de cette étude.

Valeurs observées	
Moyenne	27,6 ng/ml
Médiane	24,2 ng/ml
2,5 - 97,5èmes percentiles	13,7 - 57,3 ng/ml

## CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE PERFORMANCE

### Précision

La précision a été évaluée en suivant la directive CLSI EP5-A2. Quatre échantillons de concentration approximative de 25, 30, 45 et 80 ng/ml ont été testés lors de doubles déterminations de chacune des deux mesures quotidiennes pour chacun des deux analyseurs de système FastPack® IP, chacun étant couplé avec un lot de réactif FastPack® IP individuel, sur une période de 20 jours pour fournir 160 déterminations répétées de chaque échantillon (80 répétitions pour chacun des deux analyseurs). Au cours des mesures, entre chaque mesure, et d'un jour à l'autre, les composants de variation ont été calculés, ainsi que l'imprécision totale en utilisant un modèle ANOVA à 2 facteurs aléatoires entièrement emboîtés, avec des mesures à quelques jours d'intervalle. Les tableaux ci-dessous présentent les résultats en fonction de la combinaison instrument/réactif :

Analyseur 1, lot de réactif 1

	Moyenne	Au cours des mesures		Entre chaque mesure		D'un jour à l'autre		Total	
		ET	% de CV	ET	% de CV	ET	% de CV	ET	% de CV
Échantillon 1	27,3	2,8	10,2	1,3	4,9	1,9	7,1	3,7	13,4
Échantillon 2	31,1	3,3	10,7	0,0	0,0	1,8	5,7	3,8	12,1
Échantillon 3	45,5	3,9	8,5	0,0	0,0	2,0	4,3	4,3	9,5
Échantillon 4	84,9	4,1	4,8	0,0	0,0	3,2	3,7	5,1	6,1

Analyseur 2, lot de réactif 2

	Moyenne	Au cours des mesures		Entre chaque mesure		D'un jour à l'autre		Total	
		ET	% de CV	ET	% de CV	ET	% de CV	ET	% de CV
Échantillon 1	25,9	3,9	15,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,9	15,1
Échantillon 2	32,7	3,7	11,2	0,0	0,0	2,0	6,0	4,2	12,7
Échantillon 3	46,1	3,5	7,5	0,0	0,0	1,2	2,6	3,7	7,9
Échantillon 4	76,4	3,2	4,1	0,0	0,0	1,7	2,3	3,6	4,7

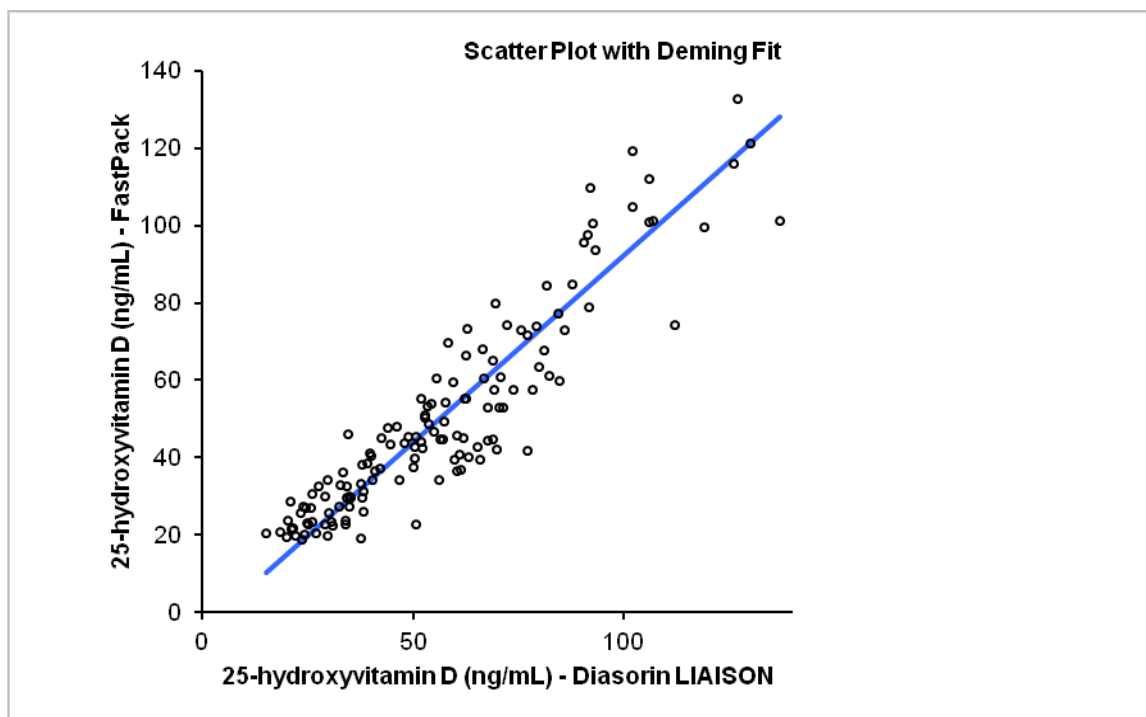
### Plage de linéarité

En ce qui concerne la vitamine D, telle qu'analysée par dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D, il a été démontré que cette méthode était linéaire par rapport à la LOQ (12,9 ng/ml) à 150 ng/ml à plus ou moins 5 ng/ml de l'intervalle.

### Comparaison des méthodes

Les échantillons cliniques de sérum (n=137) ont été utilisés pour comparer les valeurs obtenues en utilisant la méthode de dosage immunologique FastPack® IP Vitamine D et les valeurs obtenues en utilisant la méthode DiaSorin LIAISON® Vitamin D TOTAL Assay. La concordance des valeurs a été calculée en utilisant l'analyse de régression de Deming, avec le coefficient de corrélation associé.

n	Plage d'observation (ng/ml)	Intersection (ng/ml)	Pente	R
137	18,6 – 132,6	-4,6	0,97	0,92



### Substances interférentes

L'effet des interférences sur la quantification de la vitamine D a été étudiée en préparant des échantillons de sérum avec des concentrations faibles et élevées de vitamine D, avec des concentrations connues de bilirubine, de biotine, de cholestérol, de protéines, d'hémoglobine et de lipides. La valeur obtenue pour l'échantillon avec chaque substance interférente a été comparée à la valeur obtenue pour l'échantillon sans la substance interférente, et le pourcentage de pondération pour la valeur ng/ml a été déterminé. Ces composés n'ont pas présenté d'interférence avec les niveaux indiqués.

	Substance interférente					
	Bilirubine (40 mg/dl)	Biotine (1 µg/ml)	Cholestérol (500 mg/dl)	Protéines (10,7 g/dl)	Hémoglobine (500 mg/dl)	Lipides (250 mg/dl)
Aliquote non enrichie	59,1 ng/ml	36,0 ng/ml	38,5 ng/ml	28,2 ng/ml	49,0 ng/ml	98,2 ng/ml
Aliquote enrichie	53,1 ng/ml	34,9 ng/ml	41,3 ng/ml	31,1 ng/ml	45,7 ng/ml	88,5 ng/ml
% de pondération	-10,2	-3,1	7,3	10,3	-6,7	-9,9

### Réactivité croisée

Deux échantillons de sérum contenant des concentrations faible et élevée de vitamine D ont été testés avec et sans concentrations ajoutées de composés à réactions croisées potentielles dont le 1,25-dihydroxy Vitamine D2 ; le 1,25-dihydroxy Vitamine D3 ; la Vitamine D2 ; la Vitamine D3 ; le 25-hydroxy Vitamine D2 ; le 25-hydroxy Vitamine D3 ; le 24,25-dihydroxy Vitamine D2 ; le 24,25-dihydroxy Vitamine D ; le 3-epi-25-hydroxy Vitamine D3, et le Paricalcitol. La réaction croisée maximale à la concentration de réactif pour réaction croisée indiquée a été déterminée pour chaque composé.

Réactif pour réaction croisée	Concentration testée (ng/ml)	% de réactivité croisée
Vitamine D2	500	2,0
Vitamine D3	500	1,9
1,25 (OH)2 Vitamine D2	100	4,0
1,25 (OH)2 Vitamine D3	100	9,8
3-epi-25(OH) Vitamine D3	400	7,8
25 (OH) Vitamine D2	100	93,0
25 (OH) Vitamine D3	25	106,0
Paricalcitol	200	-1,2
24, 25 (OH)2 Vitamine D2	40	-0,9
24, 25 (OH)2 Vitamine D3	20	117,4

### Limite de blanc (LOB), Limite de détection (LOD) et limite de quantification (LOQ)

La limite de blanc (LOB, mesure la plus haute supposée être observée pour un échantillon à blanc), limite de détection (LOD, quantité la plus basse d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée avec des taux d'erreur de type I et II réglés à 5 %), et la limite de quantification (LOQ, quantité la plus basse d'analyte dans un échantillon pouvant être détectée de manière fiable et à laquelle l'erreur totale répond à l'exigence de précision prédéfinie) ont été déterminées conformément à CLSI EP17-A pour le dosage immunologique FastPack<sup>®</sup> IP Vitamine D. Dans cette étude, la limite de blanc a été fixée à partir de 160 mesures répétées de sérum humain délipidé et exempt de vitamine D sur chacun des six instruments FastPack<sup>®</sup> avec trois lots de réactifs différents. Les RLU bruts des dosages ont été convertis en ng/ml correspondants sur la base de la courbe d'étalonnage pour chaque dosage. La limite de blanc a été déterminée pour le 95ème percentile supérieur de la distribution. Cette valeur était équivalente à 2,3 ng/ml de vitamine D.

La limite de détection LOD a été estimée à partir de 60 mesures répétées de quatre échantillons à concentration faible. Conformément à la directive CLSI EP17-A, la LOD a été déterminée selon l'équation suivante :

$$LOD = LOB + (c_B * ET_S)$$

Où  $c_B = 1,645/(1-(1/(4 * f)))$ , où f représente les degrés de liberté et  $ET_S$  l'écart-type cumulé des observations. Dans cette étude, la LOD était de 6,2 ng/ml de vitamine D.

Pour les analyses de limites de quantification LOQ, le % du coefficient de variation et la concentration à laquelle un CV de 20 % se produit en se basant sur un alignement de points ont été identifiés. La LOQ a été établie à 12,9 ng/ml de vitamine D.



## RÉFÉRENCES

1. Pilz S, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat. Rev. Cardiol.* 2009; 6:621-30.
2. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW, The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320:981-991.
3. Holick MF, Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc. In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research. 3<sup>rd</sup> Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; 74-81.
4. Souberbielle JC, Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine* 2006; 73:249-53.
5. Cavalier E, Vitamin D: current status and perspectives. *Clin. Chem. Lab Med* 2009; 47(2):120-27.
6. Peterlik M, Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: an emerging world-wide public health problem. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009; 6:2585-607.
7. Grant WB, Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in Western Europe. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2009; 99:104-13.
8. Holick MF, Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357:266-81.
9. Autier P, Vitamin D supplementation and total mortality: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2007; 167(16):1730-7.
10. Bischoff-Ferrari HA, Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:18-28.
11. Steingrimsdottir L, Relationship between serum parathyroid hormone Levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *JAMA* 2005; 294(18):2336-41.
12. Grant WB, Current impediments to acceptance of the ultraviolet-Bvitamin D-cancer hypothesis. *Anticancer Res.* 2009; 29:3597-604.
13. Pilz S, Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke* 2008; 9:2611-13.
14. Bischoff-Ferrari HA, Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009; 339:b3692.
15. Wielders JP, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH)-Vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem* 2009;55:1584-5.



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 États-Unis  
Assistance technique  
+1 (760) 918-9165  
(877) 709-2169



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hanover, Allemagne



© 2013 Qualigen, Inc. Tous droits réservés. Qualigen et FastPack sont des marques commerciales ou des marques déposées de Qualigen, Inc. Toutes les autres marques commerciales appartiennent à leurs propriétaires respectifs.

Para la Medición Cuantitativa de 25-hydroxyvitamina D y otros metabolitos hidroxilados en Suero y Plasma Humano

**La concentración de 25-hydroxyvitamina D en una determinada muestra mediante los análisis de distintos fabricantes puede variar debido a las diferencias en los métodos de análisis y en la especificidad de los reactivos. Los resultados reportados por el laboratorio al médico deben identificar el método de análisis de 25-hydroxyvitamina D utilizado. Los valores obtenidos con distintos métodos de análisis no se pueden usar de forma intercambiable.**

**ATENCIÓN:** Las leyes federales de los Estados Unidos restringen la venta y la distribución de este dispositivo a médicos o a laboratorios clínicos y en cuanto al uso del mismo, a médicos o bajo orden médica.

**En Canadá, este producto está restringido para uso de laboratorios únicamente.**

### USO PREVISTO

El Kit Completo de FastPack® IP Vitamina D es un Inmunoensayo destinado a la determinación cuantitativa in vitro de 25-hydroxyvitamina D total y otros metabolitos hidroxilados en el suero y el plasma humanos. Este Inmunoensayo está destinado como elemento de ayuda para la evaluación de Vitamina D en adultos. El Kit Completo de Inmunoensayo FastPack® IP Vitamina D está diseñado para uso con el Sistema FastPack® IP.

### RESUMEN

La Vitamina D es un término comúnmente utilizado para una familia de derivados de esteroides estrechamente relacionados. La Vitamina D, es una prohormona esteroide soluble en grasa, producida principalmente por vía fotoquímica en la piel a partir del 7-deshidrocolesterol.<sup>1,2</sup> Tras la exposición a la luz solar, el 7-deshidrocolesterol, localizado en las capas profundas de crecimiento activo de la epidermis, sufre escisión fotolítica del anillo "B" para producir la pre-Vitamina D<sub>3</sub> que se isomeriza a la Vitamina D<sub>3</sub> (Colecalciferol)<sup>3</sup>. Dos formas de Vitamina D son biológicamente relevantes: la Vitamina D<sub>3</sub> (Colecalciferol) y la Vitamina D<sub>2</sub> (Ergocalciferol). Tanto las vitaminas D<sub>3</sub> como D<sub>2</sub> pueden ser absorbidas por los alimentos, siendo la Vitamina D<sub>2</sub> de una fuente artificial, sólo un 10-20% de la Vitamina D se suministra a través de la ingesta nutricional.<sup>1</sup> Las vitaminas D<sub>3</sub> y D<sub>2</sub> pueden encontrarse en suplementos vitamínicos. La Vitamina D se convierte en la hormona activa 1,25- (OH) 2-Vitamina D (Calcitriol) a través de dos reacciones de hidroxilación. La primera hidroxilación convierte la Vitamina D en 25-OH Vitamina D y se produce en el hígado. La segunda hidroxilación convierte la Vitamina D 25-OH en la 1,25- (OH) 2-Vitamina D biológicamente activa y se produce en los riñones, así como en muchas otras células del cuerpo. La mayoría de las células expresan el receptor de la Vitamina D y aproximadamente el 3% del genoma humano está regulado directa o indirectamente por el sistema endocrino de la Vitamina D.

La Vitamina D se almacena en el tejido adiposo y entra en la circulación ligada a la proteína de unión; la Vitamina D (VDBP) y a la albúmina. La principal forma de almacenamiento de la Vitamina D es la Vitamina D 25-OH y está presente en la sangre a una concentración de hasta 1,000 veces mayor que la activa 1,25- (OH) 2-Vitamina D. La Vitamina D 25-OH tiene una vida media de 2 a 3 semanas frente a 4 horas para la 1,25- (OH) 2-Vitamina D. Por lo tanto, la Vitamina D-25 es el analito de elección para la determinación de Vitamina D.<sup>4,5</sup> La concentración sérica de 25 -OH Vitamina D se considera que es la medida más fiable en la evaluación de Vitamina D y por lo tanto puede usarse para determinar si un paciente muestra Vitamina D en cantidades suficientes.<sup>2</sup> La evaluación del de Vitamina D también puede ser necesaria para determinar la causa de concentraciones anormales de calcio sérico en pacientes.

Estudios epidemiológicos han demostrado una elevada prevalencia mundial de insuficiencia y deficiencia de Vitamina D<sup>6</sup>. El análisis de la Vitamina D ofrece oportunidades para cuidados preventivos y terapéuticos.<sup>7,8,9</sup> La deficiencia de Vitamina D es una causa de hiperparatiroidismo secundario y enfermedades que dan lugar a trastornos metabólicos óseos (como raquitismo, osteoporosis, osteomalacia)<sup>4,10,11</sup>. Las concentraciones reducidas de Vitamina D en la sangre (insuficiencia de Vitamina D) se han asociado con un riesgo creciente de muchas enfermedades crónicas, incluyendo cánceres comunes, enfermedades autoinmunes o infecciosas o problemas cardiovasculares<sup>1,4,8,10,12-14</sup>

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El FastPack® IP Vitamina D es un Inmunoensayo de quimioluminiscencia que utiliza partículas paramagnéticas basado en el principio "competitivo".

- La Vitamina D endógena en la muestra es mezclada con solución tampón de pretratamiento, luego es depositada en el FastPack.
- Incubación primaria: Un anticuerpo monoclonal (murino) anti-Vitamina D marcado con alcalina fosfatasa [100 µL] reacciona con la vitamina D de la muestra de paciente pretratada, control o calibrador [100 µL].
- Incubación secundaria: La Vitamina D covalentemente acoplada a biotina y preacoplada a estreptavidina

que cubre a las partículas paramagnéticas [150 µL], es combinada con el complejo inmunoreactante. El conjugado no reactante con la muestra se liga a los sitios de enlace de las partículas paramagnéticas recubiertas de Vitamina D-biotina-estreptavidina.

- Eliminación de los materiales no ligados: Las partículas paramagnéticas se lavan con una solución tampón de lavado [0,2 mL/lavado] para eliminar los materiales no ligados.
- Adición y detección del sustrato: El sustrato quimioluminogénico [140 µL] se añade al complejo ligado a la fase sólida, obteniéndose una quimioluminiscencia de “resplandor” que se mide por medio del Analizador FastPack® IP.
- La cantidad de anticuerpo marcado ligado es indirectamente proporcional a la concentración de Vitamina D en la muestra.

## KIT – Contenido y Concentración

### Cada Kit Completo de Inmunoensayo de FastPack® IP Vitamina D contiene:

- 30 FastPacks (Formato de Pipeteador IP)
- 1 Frasco de Calibrador FastPack® Vitamina D
- 1 Frasco de Control 1 FastPack® Vitamina D
- 1 Frasco de Control 2 FastPack® Vitamina D
- 32 Frascos de Solución Tampón de Pretratamiento FastPack® Vitamina D
- 1 Tarjeta de Calibración
- 1 Tarjeta de Control de Rango

### Cada FastPack® IP Vitamina D contiene los reactivos:

- Partículas Paramagnéticas, 150 µL  
Biotina-25-OH Vitamina D ligada a partículas paramagnéticas cubiertas de estreptavidina en solución tampón que contiene 0,1% ProClin® 300 como conservante.
- Solución de anticuerpo que contiene un anticuerpo monoclonal anti 25-OH de Vitamina D marcado con fosfatasa alcalina en una matriz de proteína.
- Solución de lavado, 2,0 mL  
Solución tampón que contiene tensoactivos.
- Sustrato, 140 µL  
ImmuGlow™ Plus: Indoxyl-3-phosphato y lucigenina en solución tampón que contiene conservadores.

### Cada Frasco de Calibrador FastPack® Vitamina D contiene:

- Solución tampón TRIS con estabilizadores de proteína. No contiene analito, 3 mL.  
*Vea el instructivo de Calibrador FastPack® Vitamina D para mayor información*

### Cada Frasco de Control FastPack® Vitamina D contiene:

- Componentes de origen humano preparados en una solución tampón HEPES con Vitamina D que rinde concentraciones predeterminadas de Vitamina D.  
*Vea el instructivo de Control de FastPack® Vitamina D para mayor información.*

### Cada Frasco de Pretratamiento FastPack® Vitamina D contiene:

- Solución tampón de Pretratamiento, 200 µL  
Ácido Perfluorooctanoico (PFOA) en agua purificada que contiene 0,1% ProClin® 300 como conservante.

### **Materiales requeridos pero no provistos**

- Sistema FastPack® IP

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Sólo para uso en el diagnóstico *in vitro*.
- No administrar oralmente con pipeta.
- No comer, beber o fumar en las áreas de trabajo designadas.
- Lavarse muy bien las manos tras manipular la muestra.
- Interferencia de HAMA: algunas personas muestran anticuerpos a las proteínas murinas (HAMA), lo cual puede causar interferencias en los Inmunoensayos que emplean anticuerpos de origen murino. En particular, se ha reportado que las muestras de suero o de plasma de pacientes que han sido sometidos a terapias o procedimientos de diagnóstico que incluyen la infusión de anticuerpo monoclonal murino pueden generar resultados erróneos en dichos análisis.
- Los reactivos de FastPack® IP y FastPack® son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, siempre y cuando se conserven y se manipulen de conformidad con las instrucciones. No use los reactivos de FastPack® IP y FastPack® más allá de la fecha de caducidad.
- Deseche los FastPacks usados en un recipiente para productos biológicos peligrosos.
- ProClin® 300 es un irritante. Las siguientes son indicaciones pertinentes para ProClin® 300 sobre el riesgo (R) y la seguridad (S):

R43 Puede causar sensibilización al contacto con la piel.  
S28/37 Después de contacto con la piel, lavarse inmediatamente con mucha agua y jabón. Use guantes protectores adecuados.

## INSTRUCCIONES DE CONSERVACIÓN


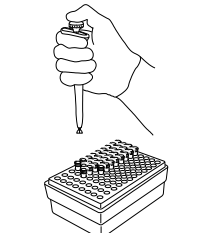
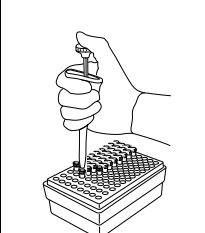
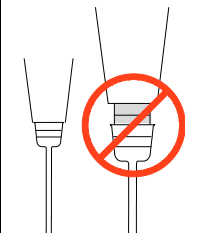
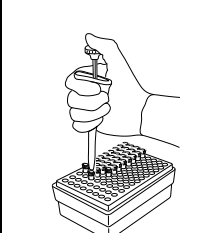
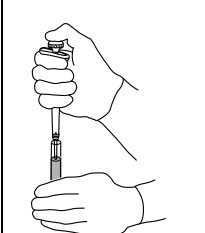
Conservarlo a una temperatura de entre 2 y 8° C.

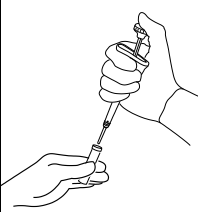

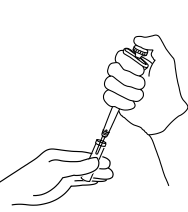
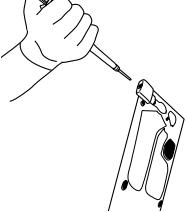
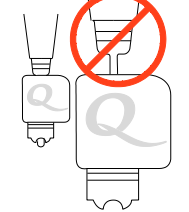
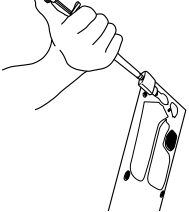
## RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1. El Inmunoensayo de FastPack<sup>®</sup> IP Vitamina D puede usarse para analizar muestras de suero, plasma EDTA o plasma Litio-Heparina
2. El National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) emite recomendaciones para la manipulación, el procesamiento y la conservación de sangre.<sup>7,8, 15</sup>
3. Recolecte todas las muestras de sangre de acuerdo a las precauciones rutinarias de venopunción
  - A. Para las muestras de suero:
    - a. El suero debe centrifugarse y separarse del coágulo dentro de las 3 horas de su recolección y conservarse a 2-8° C. Transferir el suero de el tubo original antes de conservarse.
    - b. Si no se analiza dentro de las 24 horas, la muestra debe congelarse a una temperatura de -20° C o inferior.<sup>15</sup>
  - B. Para las muestras de plasma:
    - a. Recolecte las muestras en tubo con EDTA (tapa color lavanda) o tubo con heparina (tapa color verde).
    - b. Después de la recolección, inmediatamente mezclar el tubo suavemente invirtiéndolo varias veces.
    - c. El plasma debe separarse de las células por centrifugación dentro de 3 horas después de recolección y conservación a 2-8° C. Transferir el plasma de su tubo original antes de conservarse.
    - d. Si no se analiza dentro de las 24 horas, la muestra debe congelarse a una temperatura de -20° C o inferior.
  - C. Para obtener resultados óptimos, las muestras no deben contener fibrina, glóbulos rojos, u otros materiales particulados.
  - D. Las muestras que exhiban material particulado deben centrifugarse antes de usarlas.
  - E. Las muestras que exhiban turbidez (alto contenido de lípidos) no deben de usarse.
  - F. Asegurarse de que las muestras no tengan burbujas.
  - G. Todos los calibradores, controles, y especímenes de suero deberán ser pretratados diluyendo 1:3 con la solución tampón de pretratamiento de Vitamina D (1 parte de muestra, 2 partes de solución tampón de pretratamiento), según el PROCEDIMIENTO de la PRUEBA a continuación,


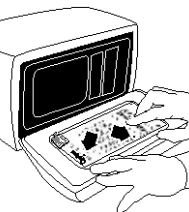

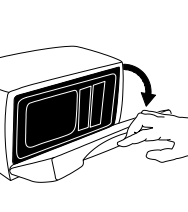

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Vea el Manual de QA o el Manual de Procedimientos de Sistema FastPack IP para instrucciones detalladas de "Como correr pruebas."

 <p><b>1.</b> Escriba el nombre del paciente/número de identificación y las iniciales del operador en la etiqueta FastPack<sup>®</sup></p>	 <p><b>2.</b> Presione y sostenga el pistón de la pipeta hacia abajo completamente para que las pinzas metálicas estén extendidas y abiertas.</p>	 <p><b>3.</b> Mientras mantiene el pistón hacia abajo, presione firmemente la pipeta en la cabeza de el tip hasta que encaje en su lugar, luego suelte el pistón.</p>	 <p><b>4.</b> Asegúrese de que la cabeza de el tip esté colocado correctamente en el extremo de la pipeta.</p>	 <p><b>5.</b> Verifique que el tip quede correctamente asentado presionando suavemente el pistón hasta la primera parada y soltándolo. Un "clic" audible puede ocurrir si el pistón no está sentado correctamente.</p>	 <p><b>6.</b> Presione suavemente el pistón de la pipeta hasta la primera parada y manténgala. Coloque el tip en tubo de muestra; tomar la muestra soltando lentamente el pistón. Inspeccione el tip para confirmar que no hay burbujas de aire en la muestra.</p>
---	--	--	--	---	---

 <p><b>7.</b> Todas las muestras deben ser pretratadas diluyendo 1: 3 con la solución tampón de pretratamiento FastPack® Vitamina D (1 parte de muestra, 2 partes de solución tampón de pretratamiento). Depositar la muestra en el tubo (que contiene 200 µl de solución tampón de pretratamiento) presionando el pistón de la pipeta hasta la primer parada. Vuelva a colocar la tapa de rosca firmemente en el tubo de solución tampón.</p>	 <p><b>8.</b> Invertir el tubo al menos 3 veces para mezclar bien la muestra y la solución tampón. El acto de mezclar la muestra y el tampón libera la Vitamina D presente, haciéndola disponible para el ensayo.</p>	 <p><b>9.</b> Tomar la muestra del tubo de pretratamiento usando el mismo tip que antes y siguiendo la misma técnica que en el paso 6 anterior.</p>	 <p><b>10.</b> Con el dedo alejado del pistón de la pipeta, introduzca completamente el tip con la muestra en el puerto de inyección FastPack®. Debe ajustarse firmemente.</p>	 <p><b>11.</b> Asegúrese que el tip esté colocado correctamente en el orificio de inyección.</p>	 <p><b>12.</b> En un movimiento continuo, presione rápidamente el pistón de la pipeta completamente hacia abajo. Esta acción inyectará simultáneamente la muestra en el FastPack® y expulsará automáticamente el tip.</p>
---	--	--	--	---	--

### PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA(cont.)

 <p>El tip está completamente asentado.</p> <p>El tip es visible</p> <p><b>13.</b> Asegúrese de no desmontar el tip del puerto de inyección. El tip actúa como un tapón para sellar la muestra en el FastPack®. Si observa una fuga, deseche adecuadamente el FastPack® e inicie el procedimiento con un nuevo FastPack®.</p>	 <p><b>14.</b> Coloque el FastPack® en la puerta del analizador. Alinear los pasadores de la puerta con los orificios del FastPack®. Cierre la puerta del analizador.</p>	 <p><b>15.</b> Presione el botón azul de inicio en el analizador.</p>	 <p><b>16.</b> Cuando finalice la prueba, abra la puerta del analizador. Remueva el FastPack® e imprima los resultados en la etiqueta adjunta.</p>	 <p><b>17.</b> Retire la etiqueta y colóquela en el registro del paciente.</p>	<p><b>Qualigen, Inc.</b> Carlsbad, CA 92011 USA</p> <p><b>Qualigen®</b></p>
---	---	---	---	--	---

### INSTRUMENTACIÓN

Sistema FastPack® IP

### DETALLES DE CALIBRACIÓN

Durante el proceso de producción de FastPack® IP, Qualigen genera una curva maestra estándar y coloca esta información, en forma de código de barras, en cada etiqueta de FastPack® IP, donde puede ser leída por el analizador FastPack® IP durante la secuencia de análisis. El usuario debe calibrar el analizador FastPack® IP para asegurarse de que esté bien ajustado para el lote concreto de FastPacks que está utilizando. Se deben llevar a cabo calibraciones separadas para cada tipo de análisis, es decir, PSA Total, Testosterona, Vitamina D, TSH, T<sub>4</sub> libre, etc. La frecuencia de calibración varía para cada tipo de análisis. Para el Inmunoensayo de FastPack® IP Vitamina D, el analizador FastPack® IP, debe calibrarse una vez cada 30 días, o cada vez que se va a utilizar un nuevo lote de FastPacks de Vitamina D.

Cada vez que el usuario lleva a cabo una calibración inicial para un lote determinado de FastPacks o utiliza un nuevo lote de calibrador, se deben procesar 3 FastPacks para la calibración (triplicados). Cuando se realiza la recalibración con el mismo lote de FastPacks y calibrador, tiene que usar 3 FastPacks. Vea "Cómo realizar una calibración" en el Manual de procedimientos del Sistema FastPack® IP.

## RESULTADOS

El analizador FastPack® IP utiliza la información del código de barras para construir una tabla de búsqueda de valores (x, y) que representan la curva estándar, y estima la concentración de muestras desconocidas mediante la interpolación lineal.

## CONTROL DE CALIDAD

Los materiales de control de calidad simulan muestras reales y son esenciales para monitorear el desempeño sistemático de los análisis. Las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) incluyen el uso de muestras de control para asegurar que todos los reactivos y protocolos estén funcionando correctamente. Vea “Cómo ejecutar los controles” en el Manual de procedimientos del Sistema FastPack® IP. Por lo menos dos niveles de control de calidad deben ser utilizados.

Los usuarios deben seguir las normas federales, estatales y locales apropiadas sobre el funcionamiento de los controles externos de calidad.

## LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Las muestras de plasma que se recolecten deben utilizar Litio-Heparina o EDTA como anticoagulantes.
- No utilizar muestras lipémicas pues estas resultarán en valores bajos falsos.
- Los especímenes se pueden medir dentro del rango reportable de límite de cuantificación (12,9 ng/mL) y el extremo superior del rango de calibración, 150 ng/mL.
- Las muestras > 150 ng/mL deben ser reportadas como tal o volverse a analizar utilizando otro método.
- Las muestras de pacientes que han recibido infusiones de anticuerpos monoclonales murinos con fines diagnósticos o terapéuticos pueden contener anticuerpos humanos antimurinos (HAMA). Dichas muestras pueden indicar valores falsamente elevados o falsamente bajos cuando se analizan con kits de análisis que emplean anticuerpos monoclonales murinos.
- Los anticuerpos heterofílicos presentes en una muestra pueden causar interferencia en los sistemas de Inmunoensayo.
- Infrecuentemente, los niveles de vitamina D pueden aparecer suprimidos debido a la presencia de anticuerpos heterofílicos en el suero o el plasma del paciente, o a la ligazón de proteínas no específicas. Si el nivel de Vitamina D es incoherente con la evidencia clínica, se sugiere realizar pruebas adicionales de vitamina D para confirmar el resultado.
- Para propósitos de diagnóstico, el Inmunoensayo de FastPack® IP Vitamina D deberá siempre ser evaluado en conjunto con la historia médica del paciente, exámenes clínicos y cualquier otra información relevante.
- El Inmunoensayo FastPack® IP Vitamina D no ha sido evaluado en entornos de Punto de Cuidado.

## VALORES ESPERADOS/INTERVALOS DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe determinar rangos para su población local. No existe un acuerdo universal sobre la concentración óptima de Vitamina D. Los rangos deberán basarse en los valores de decisión clínica que se aplican a ambos sexos en lugar de los rangos de referencia basados en la población. Un estudio de intervalo de referencia que empleó muestras de suero de 367 sujetos representando 5 regiones geográficas diferentes de los Estados Unidos con muestreo que tuvo lugar en los meses de invierno, primavera y principios de verano, produjo los resultados en la tabla siguiente. El percentil no paramétrico de 2,5 - 97,5 de 13,7- 57,3 ng/ml proporciona el intervalo de referencia determinado en este estudio.

Valores Observados	
Media	27,6 ng/mL
Mediana	24,2 ng/mL
2,5 – 97,5 percentil	13,7 – 57,3 ng/mL

## CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE FUNCIONAMIENTO

### Precisión

La precisión se evaluó siguiendo la guía CLSI EP5-A2. Se analizaron cuatro muestras con concentraciones de ~25, ~30, ~45 y ~80 ng/mL por duplicado, dos pruebas por día en dos analizadores de Sistema IP FastPack®, en conjunción con un lote de reactivo FastPack® IP durante un periodo de 20 días para producir 160 réplicas de cada muestra (80 réplicas en cada uno de dos analizadores). Se calcularon los componentes de variación intra series, entre series y entre días, así como la Imprecisión Total usando el modelo ANOVA de factor aleatorio bidireccional anidado con series anidadas entre días. Las tablas a continuación representan los resultados para la combinación de instrumentos y reactivos:

Analizador 1, Lote de Reactivo 1

	Promedio	Intra serie		Entre series		Entre días		Total	
		SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
Muestra 1	27,3	2,8	10,2	1,3	4,9	1,9	7,1	3,7	13,4
Muestra 2	31,1	3,3	10,7	0,0	0,0	1,8	5,7	3,8	12,1
Muestra 3	45,5	3,9	8,5	0,0	0,0	2,0	4,3	4,3	9,5
Muestra 4	84,9	4,1	4,8	0,0	0,0	3,2	3,7	5,1	6,1

Analizador 2, Lote de Reactivo 2

	Promedio	Intra serie		Entre series		Entre días		Total	
		SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV	SD	% CV
Muestra 1	25,9	3,9	15,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,9	15,1
Muestra 2	32,7	3,7	11,2	0,0	0,0	2,0	6,0	4,2	12,7
Muestra 3	46,1	3,5	7,5	0,0	0,0	1,2	2,6	3,7	7,9
Muestra 4	76,4	3,2	4,1	0,0	0,0	1,7	2,3	3,6	4,7

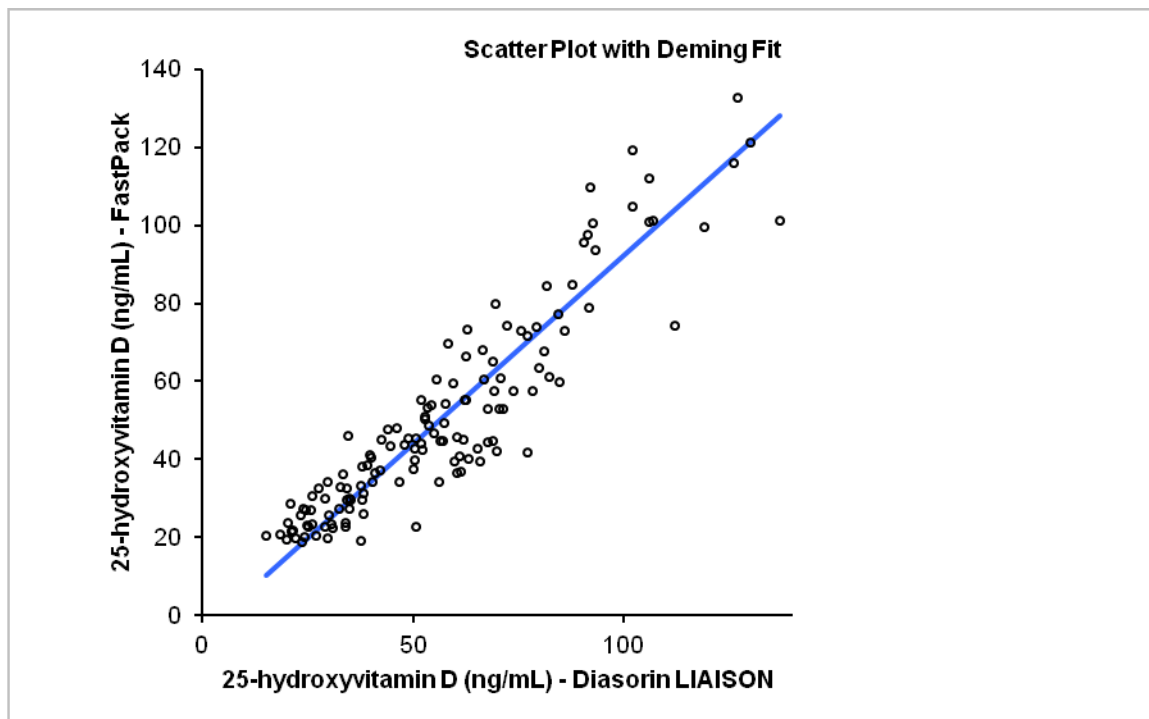
**Rango de Linealidad**

Mediante el Inmunoensayo FastPack® IP Vitamina D, se ha demostrado que para la Vitamina D el método es lineal desde la LOQ (12,9 ng/mL) hasta 150 ng/mL dentro de 5 ng/mL en el intervalo.

**Método de Comparación**

Se utilizaron muestras clínicas de suero (n = 137) para comparar los valores obtenidos utilizando el método de Inmunoensayo FastPack® IP Vitamina D contra los valores obtenidos usando el método de ensayo de Diasorin LIAISON® Vitamina D TOTAL. Los valores fueron evaluados por concordancia mediante el análisis de regresión Deming, con el coeficiente de correlación asociado.

n	Rango de Observación (ng/mL)	Intersección (ng/mL)	Pendiente	R
137	18,6 – 132,6	-4,6	0,97	0,92



## SUSTANCIAS INTERFERENTES

En la cuantificación de la Vitamina D, se investigó el efecto de sustancias interferentes mediante la preparación de muestras de suero con concentraciones bajas y altas de Vitamina D y con concentraciones conocidas de bilirrubina, biotina, colesterol, proteína, hemoglobina y lípidos. El valor obtenido para la muestra con cada sustancia interferente se comparó con el valor obtenido para la muestra sin la sustancia interferente y se determinó el sesgo porcentual en ng/ml. Estos compuestos no mostraron interferencia en los niveles indicados.

	Sustancias Interferentes					
	Bilirrubina (40 mg/dL)	Biotina (1 µg/mL)	Colesterol (500 mg/dL)	Proteína (10.7 g/dL)	Hemoglobina (500 mg/dL)	Lípidos (250 mg/dL)
Alícuota sin la adición	59,1 ng/mL	36,0 ng/mL	38,5 ng/mL	28,2 ng/mL	49,0 ng/mL	98,2 ng/mL
Alícuota tras la adición	53,1 ng/mL	34,9 ng/mL	41,3 ng/mL	31,1 ng/mL	45,7 ng/mL	88,5 ng/mL
% Sesgo	-10,2	-3,1	7,3	10,3	-6,7	-9,9

## Reactividad Cruzada

Se analizaron dos muestras de suero que contenían concentraciones bajas y altas de Vitamina D, sin y con concentraciones añadidas de compuestos presumiblemente de reactividad cruzada, incluyendo 1,25-dihidroxi Vitamina D2; 1,25 - dihidroxi Vitamina D3; Vitamina D2; Vitamina D3; 25 - hidroxivitamina D2; 25 - hidroxivitamina D3; 24,25 - dihidroxivitamina D2; 24,25 - dihidroxi Vitamina D; 3-epi-25-hidroxivitamina D3, y Paricalcitol. Se determinó la máxima reactividad cruzada a la concentración de reactivo cruzado indicada para cada compuesto,

Reactivo cruzado	Concentración analizada (ng/mL)	% Reactividad Cruzada
Vitamina D2	500	2,0
Vitamina D3	500	1,9
1,25-(OH)2-Vitamina D2	100	4,0
1,25-(OH)2-Vitamina D3	100	9,8
3-epi-25(OH) Vitamina D3	400	7,8
25 (OH) Vitamina D2	100	93,0
25 (OH) Vitamina D3	25	106,0
Paricalcitol	200	-1,2
24, 25 (OH)2 Vitamina D2	40	-0,9
24, 25 (OH)2 Vitamina D3	20	117,4

## Límite de Blanco (LOB), Límite de Detección (LOD) y Límite Cuantitativo (LOQ)

El límite de blanco (LOB, la cantidad más alta que puede observarse para una muestra blanco), el límite de detección (LOD, la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectada con tasas de error de tipo I y II fijadas en 5%), el límite de cuantificación (LOQ, la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede detectar de forma fiable y en la que el error total cumple el requisito de precisión preestablecido), se determinaron para el Inmunoensayo FastPack® IP Vitamina D según CLSI EP17-A. En este estudio, el límite del blanco se determinó a partir de 160 réplicas de suero humano delipidado y libre de Vitamina D en seis diferentes instrumentos FastPack® y utilizando tres lotes de reactivos. Los valores primarios de los ensayos se convirtieron en ng/mL aparente basándose en la curva de calibración para cada ensayo. El LOB se determinó como el percentil 95 superior de la distribución. Este valor fue de 2,3 ng/ml de Vitamina D.

La LOD se estimó a partir de 60 réplicas de cuatro muestras bajo nivel. Según la directriz CLSI EP17-A, LOD se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$LOD = LOB + (c\beta * SD_s),$$

Donde  $c = 1,645 / (1 - (1 / (4 * f)))$ ,  $f$  es el grado de libertad, y  $SD_s$  es la desviación estándar agrupada de las observaciones. En este estudio, se encontró que el LOD era 6,2 ng/mL de Vitamina D.

Para los análisis de LOQ, el %CV se graficó frente a la concentración de Vitamina D identificándose así la concentración a la que se produce un 20% de CV sobre una serie de puntos ajustados. LOQ se estableció en 12,9 ng/ml de Vitamina D.



## REFERENCIAS

1. Pilz S, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat. Rev. Cardiol.* 2009; 6:621-30.
2. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW, The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320:981-991.
3. Holick MF, Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc. In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research. 3<sup>rd</sup> Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; 74-81.
4. Souberbielle JC, Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine* 2006; 73:249-53.
5. Cavalier E, Vitamin D: current status and perspectives. *Clin. Chem. Lab Med* 2009; 47(2):120-27.
6. Peterlik M, Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: an emerging world-wide public health problem. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009; 6:2585-607.
7. Grant WB, Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in Western Europe. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2009; 99:104-13.
8. Holick MF, Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357:266-81.
9. Autier P, Vitamin D supplementation and total mortality: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2007; 167(16):1730-7.
10. Bischoff-Ferrari HA, Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:18-28.
11. Steingrimsdottir L, Relationship between serum parathyroid hormone Levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *JAMA* 2005; 294(18):2336-41.
12. Grant WB, Current impediments to acceptance of the ultraviolet-Bvitamin D-cancer hypothesis. *Anticancer Res.* 2009; 29:3597-604.
13. Pilz S, Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke* 2008; 9:2611-13.
14. Bischoff-Ferrari HA, Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009; 339:b3692.
15. Wielders JP, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH)-Vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem* 2009;55:1584-5.



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 EE.UU.  
Soporte Técnico  
+1(760) 918-9165  
+1(877) 709-2169



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hanover  
Alemania



İnsan Serum ve Plazmasındaki 25-hidroksivitamin D ve diğer hidroksile metabolitlerin Kantitatif Ölçümü için kullanılır.

**Belirli bir numunede, farklı üreticilerin testleriyle tespit edilen 25 hidroksivitamin D konsantrasyonu, test metotları ve reaktif özgülüğündeki farklılıklardan dolayı değişiklik gösterebilmektedir. Laboratuvar tarafından hekime bildirilen sonuçlarda, kullanılan 25 hidroksivitamin D test metodunun kimliği yer almak zorundadır. Farklı test metotlarıyla elde edilen değerler alternatifli olarak kullanılmamalıdır.**

**DİKKAT: Amerika Birleşik Devletleri Federal yasaları, bu cihazın yalnızca bir hekim tarafından veya bir hekimin siparişiyle veya bir klinik laboratuvarına satılmasına ve dağıtılmasına izin verir ve kullanımı hekim tarafından veya bir hekimin siparişiyle yapılmak zorundadır.**

### KULLANIM AMACI

FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Test Seti Tam, insan serum ve plazmasındaki 25-hidroksivitamin D ve diğer hidroksile metabolitlerin kantitatif olarak belirlenmesi için geliştirilmiştir. Test, yetişkinlerde D vitamini yeterliliğinin değerlendirilmesinde bir yardımcı olarak kullanılmalıdır. FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Test Seti Tam, FastPack® IP Sistemi analizörü ile birlikte kullanılmak üzere geliştirilmiştir.

### ÖZET

D Vitamini, birbiriyle yakından ilişkili seko-steroidlerden oluşan bir grup için yaygın olarak kullanılan bir terimdir. Daha çok deride 7-dehidrokolesterolden fotokimyasal olarak üretilen, yağda çözünen bir steroid prohormondur.<sup>1,2</sup> Epiderminin aktif olarak büyüyen katmanlarının derinlerinde bulunan 7-dehidrokolesterol, güneş ışığına maruz kaldığında, "B" halkasının fotolitik bölünmesi sonucunda, izomerleşerek vitamin D<sub>3</sub>'e (kolekalsiferol) dönüşen pre-vitamin D<sub>3</sub>'ü açığa çıkarır.<sup>3</sup> D vitamininin iki formu biyolojik olarak önemlidir – vitamin D<sub>3</sub> (Kolekalsiferol) ve vitamin D<sub>2</sub> (Ergokalsiferol). Gerek vitamin D<sub>3</sub> gerekse D<sub>2</sub> yiyeceklerden absorbe edilebilir ve vitamin D<sub>2</sub> yapay bir kaynaktır, ancak D vitamininin tahminen yalnızca %10-20'si beslenme yoluyla alınır.<sup>1</sup> Vitamin D<sub>3</sub> ve D<sub>2</sub> vitamin desteklerinde bulunabilmektedir. D Vitamini, iki hidroksilasyon reaksiyonu yoluyla 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D (Kalsitriol) adlı etkin hormona dönüştürülür. İlk hidroksilasyon, D vitaminini 25-OH vitamin D'ye dönüştürür ve karaciğerde meydana gelir. İkinci hidroksilasyon, 25-OH vitamin D'yi biyolojik olarak aktif 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D'ye dönüştürür ve karaciğerde ve vücudun pek çok diğer hücresinde meydana gelir. Hücrelerin çoğu D vitamini reseptörünü eksprese eder ve insan genomunun yaklaşık %3'ü doğrudan veya dolaylı olarak D vitamini endokrin sistemi tarafından regüle edilir.<sup>1</sup>

D vitamini yağdokuda depolanır ve dolaşıma D vitamini bağlayıcı protein (DVBP) ve albümine bağlanmış olarak girer. D vitamininin temel depolanma şekli 25-OH vitamin D olup aktif 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D'ye kıyasla kanda 1000 kata varan oranlarda daha yüksek konsantrasyonda bulunur. 25-OH vitamin D'nin yarı ömrü 2-3 hafta iken, 1,25-(OH)<sub>2</sub>-vitamin D'nin yarı ömrü 4 saattir. Bu nedenle, 25-OH vitamin D, D vitamini durumunun belirlenmesinde tercih edilen analittir.<sup>4,5</sup> 25-OH vitamin D'nin serum konsantrasyonu genel D vitamini durumunun en güvenilir ölçüsü olarak kabul edilir ve dolayısıyla hastaların yeterli D vitaminine sahip olup olmadıklarını belirlemek amacıyla kullanılabilir.<sup>2</sup> D vitamini durumunun değerlendirilmesi, hastalardaki anormal serum kalsiyum konsantrasyonlarının sebebinin belirlenmesi için de gerekli olabilir.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, D vitamini yetersizliğinin ve eksikliğinin yaygın olarak görüldüğünü göstermiştir.<sup>8</sup> D vitamini durumunun ölçümü, önleyici ve tedavi amaçlı müdahaleler için fırsat sağlar.<sup>7,8,9</sup> D vitamini eksikliği sekonder hiperparatiroidizmin ve kemik metabolizmasının bozulmasına neden olan hastalıkların (raşitizm, osteoporoz, osteomalazi gibi) sebeplerinden biridir.<sup>4,10,11</sup> Kandaki düşük 25-OH vitamin D konsantrasyonları (D vitamini yetersizliği), yaygın kanser türleri, otoimmün veya bulaşıcı hastalıklar veya kardiyovasküler problemler gibi pek çok kronik hastalık için risk artışı ile ilişkilendirilmektedir.<sup>1,4,8,10,12-14</sup>

### TEST PRENSİBİ

FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Testi, "rekabet" prensibini esas alan bir paramanyetik partikül kemiluminesans immünokimyasal testidir.

- Örnekteki endojen D Vitamini ön işlem tampon solüsyonu ile karıştırılıp daha sonra pakete ilave edilir.
- Primer inkübasyon: Alkali fosfataz ile etiketlenmiş bir monoklonal (fare) anti-vitamin D antikoru [100 µl], ön işlemden geçirilmiş hasta örneği, kontrol veya kalibratör [100 µl] ile reaksiyona girer.
- Sekonder inkübasyon: Biotine kovalent bağla bağlanan ve streptavidin kaplı paramanyetik partiküllere önceden bağlanmış D vitamini [150 µl], immünoreaktan kompleks ile kombine edilir. Örnekle reaksiyona sokulmayan konjuge, D vitamini-biotin-streptavidin kaplı paramanyetik partiküllerin boş bağlayıcı bölgelerine bağlanır.
- Bağlanmayan materyallerin çıkarılması: Bağlanmayan materyalleri çıkarmak için, paramanyetik partiküller bir yıkama tampon solüsyonu ile tekrar tekrar yıkanır [0,2 ml/yıkama].
- Substrat ilave etme ve algılama: Kemiluminojenik substrat [140 µl] katı fazdaki bağlı komplekse ilave edilir ve FastPack® Sistem analizörü kullanılarak ölçülen "parlama" kemiluminesansına neden olur.
- Bağlanan etiketli antikor miktarı, örnekteki D vitamini konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

## SET – İçerik ve Konsantrasyon

### Her FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Test Seti Tam içerisinde Őunlar bulunur:

- 30 FastPack (IP Pipet Biçiminde)
- 1 Viyal FastPack® D Vitamini Kalibratörü
- 1 Viyal FastPack® D Vitamini Kontrolü 1
- 1 Viyal FastPack® D Vitamini Kontrolü 2
- 32 Viyal FastPack® D Vitamini n İŐlem Tamponu
- 1 Kalibrasyon Kartı
- 1 Kontrol AralıĐı Kartı

### Her FastPack® IP D Vitamini Paketinde Őunlar bulunur:

- Paramanyetik Partiküller, 150 µl  
Koruyucu olarak %0,1 ProClin® 300 içeren tampon solüsyon içinde streptavidin kaplı paramanyetik partiküllere baĐlanmıŐ biotin-25-OH vitamin D.
- D Vitamini Antikor Solüsyonu, 100 µl  
Bir protein matrisi içinde alkali fosfataz ile etiketlenmiŐ bir fare monoklonal anti 25-OH vitamin D antikoruna içeren antikor solüsyonu.
- Yıkama Tampon Solüsyonu, 2,0 ml  
Sürfaktanlar içeren Tris tampon solüsyonu.
- Substrat, 140 µl  
ImmuGlow™ Plus: Koruyucular içeren tampon solüsyon içinde indoksil-3-fosfat ve lusigenin.

### Her FastPack® D Vitamini Kalibratörü Viyalinde Őunlar bulunur:

- Protein stabilizatörleri içeren Tris tampon solüsyonu. Herhangi bir analiz içermez, 3 ml.  
*Daha fazla bilgi için FastPack® D Vitamini Kalibratörü prospektüsüne bakın.*

### Her FastPack® D Vitamini Kontrolü Viyalinde Őunlar bulunur:

- Önceden belirlenmiŐ D vitamini konsantrasyonları saĐlamak amacıyla D vitamini içeren HEPES tampon solüsyonunda hazırlanmıŐ insan kaynaklı bileŐenler.  
*Daha fazla bilgi için FastPack® D Vitamini Kontrolü prospektüsüne bakın.*

### Her FastPack® D Vitamini n İŐlem Viyalinde Őunlar bulunur:

- D Vitamini n İŐlem Tampon Solüsyonu, 200 µl  
Koruyucu olarak %0,1 oranında ProClin® 300 içeren saf su içinde perflorooktanoik asit (PFOA).

### Gereken ancak saĐlanmayan materyaller

- FastPack® IP Sistemi

## UYARILAR VE ÖNLEMLER

- Sadece *in vitro* tanısals kullanım içindir.
- AĐızla pipetlemeyin.
- Özel alıŐma alanlarında yemek yemeyin, içecek veya sigara içmeyin.
- Numuneyle iŐlem yaptıktan sonra ellerinizi iyice yıkayın.
- HAMA EtkileŐimi: bazı kiŐilerde, farelerden elde edilen antikorların kullanıldıĐı immünokimyasal testlerde etkileŐime neden olabilen fare proteini antikorları (HAMA-İnsan Anti-Fare Antikoru) bulunur<sup>6</sup>.
- FastPack® IP reaktifleri, talimatlara uygun olarak saklandıĐında ve iŐlendiĐinde etiketteki son kullanma tarihine kadar stabil kalır. FastPack® IP reaktiflerini son kullanma tarihinden sonra kullanmayın.
- KullanılmıŐ FastPack'leri bir biyolojik olarak tehlikeli madde kutusuna atın.
- ProClin® 300 tahriŐ edicidir. AŐaĐıdakiler ProClin® 300 için uygun Risk (R) ve Güvenlik (S) ibareleridir:  
R43 Ciltle teması hassasiyete neden olabilir  
S28-37 Ciltle temasından sonra, derhal bol sabunlu suyla yıkayın. Uygun eldivenler giyin.

## DEPOLAMA TALİMATLARI

2 – 8 °C'de saklayın.




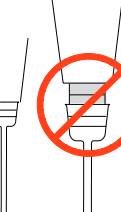

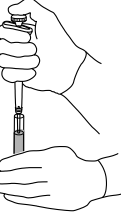






## NUMUNE ALMA/HAZIRLAMA

1. FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Testi için serum, EDTA veya lityum-heparin plazma örnekleri kullanılabilir.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards (Ulusal Klinik Laboratuvarı Standartları Komitesi) (NCCLS), kanın kullanılması, iŐlenmesi ve saklanması için aŐaĐıdaki tavsiyelerde bulunmaktadır.<sup>7,8,15</sup>
  - A. Tüm kan örneklerini, rutin venipunktr önlemlerine uygun olarak alın.

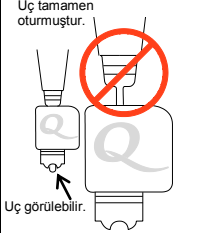
- B. Serum örnekleri için:
- Serum alındıktan sonraki 3 saat içinde santrifüjlenerek hücreden ayrılmalı ve 2-8 °C'de saklanmalıdır. Serum, saklanması için orijinal tüpünden aktarın.
  - 24 saat içinde test edilmediği takdirde, örnek -20 °C veya daha düşük derecelerde dondurulmalıdır.<sup>15</sup>
- C. Plazma örnekleri için:
- Örnekleri EDTA tüpüne (eflatun kapaklı) veya heparinli (yeşil kapaklı) tüpe alın.
  - Örnek alma işleminden sonra tüpü birkaç kez nazikçe ters çevirerek hemen karıştırın.
  - Plazma alındıktan sonraki 3 saat içinde santrifüjlenerek hücreden ayrılmalı ve 2-8 °C'de saklanmalıdır. Plazmayı, saklanması için orijinal tüpünden aktarın.
  - 24 saat içinde test edilmediği takdirde, örnek -20 °C veya daha düşük derecelerde dondurulmalıdır.<sup>15</sup>
- D. Optimum sonuçlar için, örneklerde eritrosit veya başka partiküllü materyal bulunmamalıdır.
- E. Partiküllü madde görülen örnekler kullanılmadan önce santrifüjlenmelidir.
- F. Türbidite (yüksek yağ içeriği) görülen örnekler kullanılmamalıdır.
- G. Örneklerde baloncuk olmadığından emin olun.
- H. Tüm kalibratörler, kontroller ve serum örnekleri, aşağıdaki TEST PROSEDÜRÜNE uygun olarak, D Vitamini Ön İşlem Tampon Solüsyonu (1 birim örnek, 2 birim ön işlem tampon solüsyonu) ile 1:3 oranında seyreltilerek ön işlemden geçirilmek zorundadır.

## TEST PROSEDÜRÜ

FastPack® testlerinin yapılmasıyla ilgili ayrıntılı talimatlar için, KG Kılavuzuna veya FastPack® Sistemi Prosedür Kılavuzuna bakın.

					
<p><b>1.</b> Hastanın Adını/Kimlik Numarasını ve operatörün isminin baş harflerini FastPack® etiketine yazın.</p>	<p><b>2.</b> Metal kısıqların uzayıp açılmasını sağlayacak şekilde pipet pistonuna sonuna kadar basın ve pistonu basılı tutun.</p>	<p><b>3.</b> Pistonu basılı tutarak, yerine yerleşene kadar pipeti pipet ucunun içine sağlamca bastırın ve ardından pistonu serbest bırakın.</p>	<p><b>4.</b> Pipet ucunun pipetin uç kısmına düzgün şekilde oturduğundan emin olun.</p>	<p><b>5.</b> Pistonu ilk durma noktasına kadar hafifçe bastırıp serbest bırakarak pipet ucunun düzgün şekilde oturduğunu doğrulayın. Pistonun düzgün şekilde oturmamış olması durumunda, bir "Tık" sesi duyulabilir.</p>	<p><b>6.</b> Pipet pistonunu ilk durma noktasına kadar hafifçe bastırıp basılı tutun. Pipet ucunu örnek tüpünün içine yerleştirin ve pistonu yavaşça serbest bırakarak örnek çekin. Örnekte hava baloncucu olmadığını doğrulamak için pipet ucunu kontrol edin.</p>
					
<p><b>7.</b> Tüm örnekler, FastPack® D Vitamini Ön İşlem Tampon Solüsyonu (1 birim örnek, 2 birim ön işlem tampon solüsyonu) ile 1:3 oranında seyreltilerek ön işlemden geçirilmelidir. Pipet pistonunu ilk durma noktasına kadar bastırarak örneği, tüpün (200 µl Ön İşlem Tampon Solüsyonu ile önceden doldurulmuştur) içine çıkartın. Çevirmeli kapağı sıkıca tampon solüsyon tüpüne geri yerleştirin.</p>	<p><b>8.</b> Örnek ve tampon solüsyonu birbirine karıştırmak için tampon solüsyon tüpünü en az 3 kez ters çevirin. Örnek ile tampon solüsyonun karıştırılması, mevcut D vitamini açığa çıkararak test için kullanılabilir hale getirir.</p>	<p><b>9.</b> Daha öncekiyle aynı pipeti kullanarak ve <b>Adım 6</b>'dakiyle aynı tekniği kullanarak, örneği ön işlem solüsyonu tüpünden çekin.</p>	<p><b>10.</b> Parmağınız pipet pistonuna temas etmeden, doldurulmuş pipet ucunu tamamen FastPack® Enjeksiyon Portuna sokun. Sıkıca yerleşmelidir.</p>	<p><b>11.</b> Pipet ucunun enjeksiyon portuna düzgün şekilde oturduğundan emin olun.</p>	<p><b>12.</b> Aralıksız tek bir hareketle, pipet pistonunu hızlıca bastırın. Bu işlem aynı anda örneği FastPack®'e enjekte edecek ve pipet ucunu otomatik olarak çıkartacaktır.</p>

## TEST PROSEDÜRÜ (devamı)

 <p>Uç tamamen oturmuştur. Uç görülebilir.</p>					<p><b>Qualigen, Inc.</b> Carlsbad, CA 92011 ABD</p> <p><b>Qualigen®</b></p>
---	---	---	--	---	---

## ENSTRÜMANTASYON

FastPack® IP Sistemi

### KALİBRASYON DETAYLARI

FastPack® IP üretim sürecinde, Qualigen bir ana standart grafik oluşturur ve bu bilgiyi her FastPack® IP etiketindeki barkoda yerleştirir; bu bilgi, test işlemi sırasında FastPack® IP Sistemi analizörü tarafından okunabilir. FastPack® IP Sistemi analizörü, kullanılmakta olan ilgili FastPack lotu için uygun şekilde ayarlanmasını sağlamak amacıyla, kullanıcı tarafından kalibre edilmelidir. Her test tipi (Total PSA, Testosteron, D Vitamini, TSH, serbest T4 vb.) için ayrı kalibrasyonların yapılması gerekir. Kalibrasyonun sıklığı her test tipi için değişiklik gösterir. FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Testi için, FastPack® IP Sistemi analizörü 30 günde bir kez veya yeni bir D Vitamini FastPack lotu kullanılacağına kalibre edilmelidir.

Kullanıcı belli bir FastPack lotu için başlangıç kalibrasyonu yaptığında veya yeni bir kalibratör lotu kullandığında, kalibrasyon için 3 FastPack kullanılmalıdır (üç kopya). Aynı FastPack ve kalibratör lotuyla yeniden kalibrasyon yapıldığında, kalibrasyon için 3 FastPack kullanılmalıdır. "Kalibrasyonun Yapılması" için FastPack® IP Sistemi Prosedür Kılavuzu'na bakın.

### SONUÇLAR

FastPack® IP Sistemi analizörü, standart grafiği temsil eden x,y değerlerinden oluşan bir başvuru tablosu oluşturmak için barkoddan aldığı bilgileri kullanır ve bilinmeyen örneklerin konsantrasyonunu doğrusal interpolasyon yoluyla hesaplar.

### KALİTE KONTROL

Kalite kontrol malzemeleri, gerçek numuneleri simüle eder ve testlerin sistem performansının takibi için gereklidir. İyi Laboratuvar Uygulamaları (İLU) arasında, tüm reaktif ve protokollerin uygun performans göstermesini sağlamak için kontrol numunelerinin kullanılması yer alır. "Kontrol Testleri" için FastPack® IP Sistemi Prosedür Kılavuzu'na bakın. En az iki kalite kontrol malzemesi seviyesi kullanılmalıdır.

Kullanıcılar, harici kalite kontrollerin yapılmasıyla ilgili federal, eyalet düzeyindeki ve yerel düzenlemelere riayet etmelidir.

### PROSEDÜRÜN SINIRLAMALARI

- Plazma örnekleri, antikoagülanlar olarak lityum-heparin veya EDTA kullanılarak alınmalıdır.
- Lipemik örnekler hatalı düşük sonuç vereceğinden, lipemik örnekleri kullanmayın.
- Numuneler ölçüm limitinin (12,9 ng/ml) bildirim aralığı içinde ve kalibrasyon aralığının üst ucunda (150 ng/ml) ölçülebilir.
- >150 ng/ml örnekler bu şekilde bildirilmeli veya başka bir metotla yeniden analiz edilmelidir.
- Tanı veya tedavi amacıyla fare monoklonal antikor preparatları alan hastalardan alınan numuneler, insan anti-fare antikorları (HAMA) içerebilir. Bu numuneler, fare monoklonal antikorlarının kullanıldığı test setleriyle test edildiğinde hatalı yüksek ya da düşük değerler gösterebilir.
- Örnekteki heterofil antikorlar, immünokimyasal test sistemlerinde etkileşime neden olma potansiyeline sahiptir.
- Nadiren, hasta örneğinde bulunan antikorlar veya non-spesifik protein bağlanması nedeniyle D vitamini seviyeleri düşük görülebilir. D vitamini seviyesinin klinik bulgularla tutarsız olması durumunda, sonucun doğrulanması için ek D vitamini testlerinin yapılması önerilir.

- Tanı amacıyla, FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Testi mutlaka hastanın tıbbi geçmişi, klinik muayeneleri ve diğer bulguları ile birlikte değerlendirilmelidir.
- FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Testi Hasta Başı ortamlarında değerlendirilmemiştir.

### BEKLENEN DEĞERLER/REFERANS ARALIKLAR

Her laboratuvar kendi lokal popülasyonu için aralıklar belirlemelidir. D Vitamini'nin optimum konsantrasyonu üzerinden genel bir uzlaşma söz konusu değildir. Aralıklar, popülasyon bazlı referans aralıklara değil, her iki cinsiyet için de geçerli olan klinik karar değerlerine dayandırılmalıdır. Örnek alımları Kış, İlkbahar ve erken Yaz aylarında yapılan, Amerika Birleşik Devletleri'nin 5 farklı coğrafi bölgesini temsil eden 367 denekten alınan serum örneklerinin kullanıldığı bir referans aralık çalışmasında, aşağıdaki tabloda sunulan sonuçlar elde edilmiştir. 13,7 - 57,3 ng/ml'ye ait parametrik olmayan 2,5'inci - 97,5'inci persentil, bu çalışmada belirlenen referans aralığı sağlamaktadır.

Gözlemlenen değerler	
Ortalama	27,6 ng/ml
Medyan	24,2 ng/ml
2,5'inci - 97,5'inci persentil	13,7 - 57,3 ng/ml

### SPESİFİK PERFORMANS KARAKTERİSTİKLERİ

#### Kesinlik

Kesinlik değerlendirmesi CLSI EP5-A2 kılavuzluğunda gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon değerleri ~25, ~30, ~45 ve ~80 ng/ml olan dört örnek, 20 günlük süre içinde her örnek için 160 kopya belirleme (iki analizörün her birinde 80 kopya) sağlayacak şekilde, her biri ayrı bir FastPack® IP Reaktifi ile eşleştirilen iki FastPack® IP Sistemi analizörünün her biri üzerinde yapılan günlük iki analiz her birinde kopya belirlemeler alınacak şekilde test edilmiştir. Çalışma içi, çalışmalar arası ve günler arası değişim bileşenleri ve buna ek olarak çalışmaların günlerin içine yerleştirildiği tamamen iç-içe 2 yönlü rastgele faktörlü ANOVA modeli kullanılarak toplam imprecizyon hesaplanmıştır. Aşağıdaki tablolarda, cihaz/reaktif kombinasyonuna göre sonuçlar sunulmaktadır:

Analizör 1, Reaktif Lotu 1

	Ortalama	Çalışma İçi		Çalışmalar Arası		Günler Arası		Toplam	
		SS	% DK	SS	% DK	SS	% DK	SS	% DK
Örnek 1	27,3	2,8	10,2	1,3	4,9	1,9	7,1	3,7	13,4
Örnek 2	31,1	3,3	10,7	0,0	0,0	1,8	5,7	3,8	12,1
Örnek 3	45,5	3,9	8,5	0,0	0,0	2,0	4,3	4,3	9,5
Örnek 4	84,9	4,1	4,8	0,0	0,0	3,2	3,7	5,1	6,1

Analizör 2, Reaktif Lotu 2

	Ortalama	Çalışma İçi		Çalışmalar Arası		Günler Arası		Toplam	
		SS	% DK	SS	% DK	SS	% DK	SS	% DK
Örnek 1	25,9	3,9	15,1	0,0	0,0	0,0	0,0	3,9	15,1
Örnek 2	32,7	3,7	11,2	0,0	0,0	2,0	6,0	4,2	12,7
Örnek 3	46,1	3,5	7,5	0,0	0,0	1,2	2,6	3,7	7,9
Örnek 4	76,4	3,2	4,1	0,0	0,0	1,7	2,3	3,6	4,7

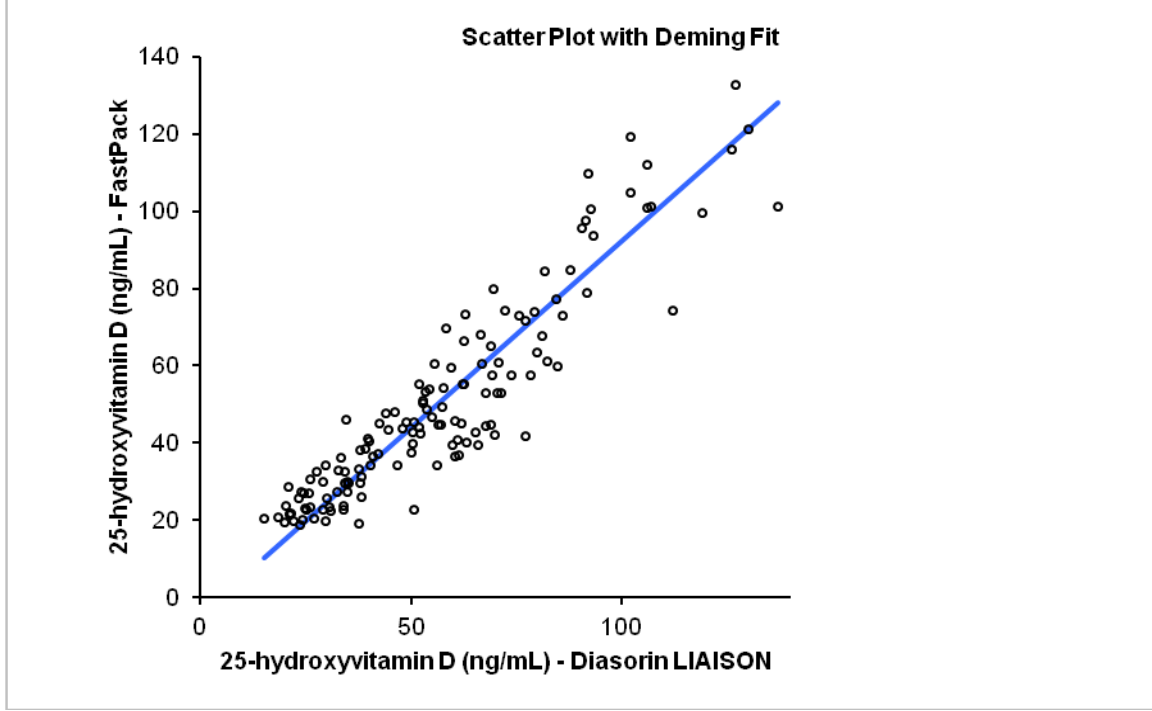
#### Doğrusallık aralığı

FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Testi ile test edilen D Vitamini için, metodun aralıkta 5 ng/ml içinde Ölçüm Limitinden (12,9 ng/ml) itibaren 150 ng/ml'ye kadar doğrusal olduğu kanıtlanmıştır.

### Yöntem Karşılaştırması

FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Test metodu kullanılarak elde edilen değerler ile DiaSorin LIAISON® D Vitamini TOTAL Test metodu kullanılarak elde edilen değerleri karşılaştırmak için klinik serum örnekleri (n=137) kullanılmıştır. Değerler, Deming regresyon analizi kullanılarak bağlantılı korelasyon katsayısıyla uyuma bakımından değerlendirilmiştir.

n	Gözlem Aralığı (ng/ml)	Kesme noktası (ng/ml)	Eğim	R
137	18,6 – 132,6	-4,6	0,97	0,92



### Etkileşen Maddeler

D vitamini miktarının belirlenmesinde etkileşimlerin etkisi, bilinen konsantrasyonlarda bilirubin, biotin, kolesterol, protein, hemoglobin ve lipit içeren, düşük ve yüksek D vitamini konsantrasyonlarına sahip serum örnekleri hazırlanarak araştırılmıştır. Her etkileşimde bulunan madde içeren örnek için elde edilen değer, etkileşimde bulunan madde içermeyen örnek için elde edilen değerle karşılaştırılmış ve etki ng/ml cinsinden belirlenmiştir. Bu bileşikler, belirtilen değerlerde etkileşim göstermemiştir.

	Etkileşimde Bulunan Madde					
	Bilirubin (40 mg/dl)	Biotin (1 µg/ml)	Kolesterol (500 mg/dl)	Protein (10,7 g/dl)	Hemoglobin (500 mg/dl)	Lipitler (250 mg/dl)
Katkısız bölüntü	59,1 ng/ml	36,0 ng/ml	38,5 ng/ml	28,2 ng/ml	49,0 ng/ml	98,2 ng/ml
Katkılı bölüntü	53,1 ng/ml	34,9 ng/ml	41,3 ng/ml	31,1 ng/ml	45,7 ng/ml	88,5 ng/ml
% Etki	-10,2	-3,1	7,3	10,3	-6,7	-9,9

### Çapraz reaktivite

Düşük ve yüksek D Vitamini konsantrasyonları içeren iki serum örneği, 1,25-dihidroksi Vitamin D2; 1,25-dihidroksi Vitamin D3; Vitamin D2; Vitamin D3; 25-hidroksi Vitamin D2; 25-hidroksi Vitamin D3; 24,25-dihidroksi Vitamin D2; 24,25-dihidroksi Vitamin D; 3-epi-25-hidroksi Vitamin D3 ve Parikalsitol dâhil olmak üzere, potansiyel çapraz reaksiyon bileşik konsantrasyonları eklenerek ve eklenmeden test edilmiştir. Belirtilen çapraz reaktant konsantrasyonundaki maksimum çapraz reaktivite her bileşik için belirlenmiştir.

Çapraz reaktant	Test edilen konsantrasyon (ng/ml)	% Çapraz reaktivite
Vitamin D2	500	2,0
Vitamin D3	500	1,9
1,25-(OH)2-Vitamin D2	100	4,0
1,25-(OH)2-Vitamin D3	100	9,8
1,25-(OH)2-Vitamin D3	400	7,8
25 (OH) Vitamin D2	100	93,0
25 (OH) Vitamin D3	25	106,0
Parikalsitol	200	-1,2
24, 25 (OH)2 Vitamin D2	40	-0,9
24, 25 (OH)2 Vitamin D3	20	117,4

### Kör Çözelti Limiti (LOB), Algılama Limiti (LOD) ve Ölçüm Limiti (LOQ)

FastPack® IP D Vitamini İmmünokimyasal Testi için, Kör Solüsyon Limiti (LOB, kör bir örnek için gözlemlenmesi muhtemel en yüksek ölçüm), algılama limiti (LOD, %5 olarak ayarlı tip I ve tip II hata oranlarıyla algılanabilen, bir örnekteki en düşük analit miktarı) ve ölçüm limiti (LOQ, bir örnekte güvenilir biçimde algılanabilen ve toplam hatanın doğruluk için önceden belirtilen koşulu karşıladığı en düşük analit miktarı), CLSI EP17-A'ya göre belirlenmiştir. Bu çalışmada, kör solüsyon limiti, üç reaktif lotunun kullanıldığı altı farklı FastPack® cihazının her birinde lipitten arındırılmış D Vitamini içermeyen bir insan serumuna ait 160 kopya belirleme kullanılarak tespit edilmiştir. Testlerden alınan işlenmemiş Bağlı Işık Birimleri, her bir teste ait kalibrasyon grafiğine bağlı olarak görünür ng/ml'ye dönüştürülmüştür. Kör Solüsyon Limiti (LOB), dağılımın üst 95'inci persentili olarak belirlenmiştir. Bu değer, 2,3 ng/ml D Vitamini olmuştur.

Algılama Limiti (LOD) dört düşük örneğin 60 kopya belirlemesinden hesaplanmıştır. CLSI EP17-A yönergesi doğrultusunda, Algılama Limiti aşağıdaki eşitlik ile belirlenmiştir:

$$LOD = LOB + (c_B * SS_S),$$

Burada,  $c_B = 1,645/(1-(1/(4 * f)))$ , f bağımsız olma derecesi ve  $SS_S$  gözlemlerin birleştirilmiş standart sapmasıdır. Bu çalışmada, Algılama Limitininin 6,2 ng/ml D Vitamini olduğu tespit edilmiştir.

Ölçüm Limiti analizleri için, D Vitamini konsantrasyonuna karşı % Değişim Katsayısının grafiği çıkarılmış ve uyumlu noktalara bağlı olarak %20 Değişim Katsayısının olduğu konsantrasyon tespit edilmiştir. Ölçüm Limiti 12,9 ng/ml D Vitamini olarak ayarlanmıştır.



## REFERANSLAR

1. Pilz S, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat. Rev. Cardiol.* 2009; 6:621-30.
2. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW, The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 1989; 320:981-991.
3. Holick MF, Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc. In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research. 3<sup>rd</sup> Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996; 74-81.
4. Souberbielle JC, Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine* 2006; 73:249-53.
5. Cavalier E, Vitamin D: current status and perspectives. *Clin. Chem. Lab Med* 2009; 47(2):120-27.
6. Peterlik M, Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: an emerging world-wide public health problem. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2009; 6:2585-607.
7. Grant WB, Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in Western Europe. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 2009; 99:104-13.
8. Holick MF, Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357:266-81.
9. Autier P, Vitamin D supplementation and total mortality: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med.* 2007; 167(16):1730-7.
10. Bischoff-Ferrari HA, Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:18-28.
11. Steingrimsdottir L, Relationship between serum parathyroid hormone Levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. *JAMA* 2005; 294(18):2336-41.
12. Grant WB, Current impediments to acceptance of the ultraviolet-B-vitamin D-cancer hypothesis. *Anticancer Res.* 2009; 29:3597-604.
13. Pilz S, Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. *Stroke* 2008; 9:2611-13.
14. Bischoff-Ferrari HA, Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009; 339:b3692.
15. Wielders JP, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH)-Vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem* 2009;55:1584-5.



Qualigen, Inc.  
Carlsbad, CA 92011 ABD  
Teknik Destek  
+1 (760) 918-9165  
(877) 709-2169



MDSS GmbH  
Schiffgraben 41  
30175 Hanover, Almanya

