



25OH Vitamin D Total ELISA 90'

KAP1971-F1

Version: 220516

History

Summary of change:

Previous Version: 220405				Current Version: 220516																																																																																																											
Old DiaSource logo 				New DiaSource logo 																																																																																																											
V. REAGENTS PROVIDED				V. REAGENTS PROVIDED																																																																																																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>INC</th><th>BUF</th><th></th><th></th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2">Incubation Buffer with casein and proclin</td><td>1 vial 20 ml</td><td>green Ready for use</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CHROM</th><th>TMB</th><th></th><th></th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2">Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzydine)</td><td>1 vial 12 ml</td><td>orange Ready for use</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>STOP</th><th>SOLN</th><th></th><th></th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2">Stop solution HCl 1M</td><td>1 vial 12 ml</td><td>Ready for use</td></tr> </tbody> </table>				INC	BUF			Incubation Buffer with casein and proclin		1 vial 20 ml	green Ready for use	CHROM	TMB			Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzydine)		1 vial 12 ml	orange Ready for use	STOP	SOLN			Stop solution HCl 1M		1 vial 12 ml	Ready for use	<table border="1"> <thead> <tr> <th>INC</th><th>BUF</th><th></th><th></th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2">Incubation Buffer with casein and proclin</td><td>1 vial 30 ml</td><td>Ready for use</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CHROM</th><th>TMB</th><th></th><th></th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2">Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzydine)</td><td>1 vial 13 ml</td><td>Ready for use</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>STOP</th><th>SOLN</th><th></th><th></th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="2">Stop solution 0.2 M H₂SO₄</td><td>1 vial 13 ml</td><td>Ready for use</td></tr> </tbody> </table>				INC	BUF			Incubation Buffer with casein and proclin		1 vial 30 ml	Ready for use	CHROM	TMB			Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzydine)		1 vial 13 ml	Ready for use	STOP	SOLN			Stop solution 0.2 M H ₂ SO ₄		1 vial 13 ml	Ready for use																																																								
INC	BUF																																																																																																														
Incubation Buffer with casein and proclin		1 vial 20 ml	green Ready for use																																																																																																												
CHROM	TMB																																																																																																														
Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzydine)		1 vial 12 ml	orange Ready for use																																																																																																												
STOP	SOLN																																																																																																														
Stop solution HCl 1M		1 vial 12 ml	Ready for use																																																																																																												
INC	BUF																																																																																																														
Incubation Buffer with casein and proclin		1 vial 30 ml	Ready for use																																																																																																												
CHROM	TMB																																																																																																														
Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzydine)		1 vial 13 ml	Ready for use																																																																																																												
STOP	SOLN																																																																																																														
Stop solution 0.2 M H ₂ SO ₄		1 vial 13 ml	Ready for use																																																																																																												
VII. REAGENT PREPARATION				VII. REAGENT PREPARATION																																																																																																											
D. Working HRP conjugate solution: Prepare the solution according to the number of used strips, as indicated in the below table: for example for 6 strips (48 wells): 60 µl of concentrated conjugate and 30 µl of concentrated HRP to 6 ml of conjugate buffer.				D. Working HRP conjugate solution: Prepare the solution according to the number of used strips, as indicated in the below table: for example for 6 strips (48 wells): 130 µl of concentrated conjugate and 65 µl of concentrated HRP to 13 ml of conjugate buffer.																																																																																																											
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nb of strips</th><th>Volume of Conjugate Buffer (ml)</th><th>Volume of Concentrated Conjugate (µl)</th><th>Volume of Concentrated HRP (µl)</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>1</td><td>10</td><td>5</td></tr> <tr><td>2</td><td>2</td><td>20</td><td>10</td></tr> <tr><td>3</td><td>3</td><td>30</td><td>15</td></tr> <tr><td>4</td><td>4</td><td>40</td><td>20</td></tr> <tr><td>5</td><td>5</td><td>50</td><td>25</td></tr> <tr><td>6</td><td>6</td><td>60</td><td>30</td></tr> <tr><td>7</td><td>7</td><td>70</td><td>35</td></tr> <tr><td>8</td><td>8</td><td>80</td><td>40</td></tr> <tr><td>9</td><td>9</td><td>90</td><td>45</td></tr> <tr><td>10</td><td>10</td><td>100</td><td>50</td></tr> <tr><td>11</td><td>11</td><td>110</td><td>55</td></tr> <tr><td>12</td><td>12</td><td>120</td><td>60</td></tr> </tbody> </table>				Nb of strips	Volume of Conjugate Buffer (ml)	Volume of Concentrated Conjugate (µl)	Volume of Concentrated HRP (µl)	1	1	10	5	2	2	20	10	3	3	30	15	4	4	40	20	5	5	50	25	6	6	60	30	7	7	70	35	8	8	80	40	9	9	90	45	10	10	100	50	11	11	110	55	12	12	120	60	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Nb of strips</th><th>Volume of Conjugate Buffer (ml)</th><th>Volume of Concentrated Conjugate (µl)</th><th>Volume of Concentrated HRP (µl)</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>3</td><td>30</td><td>15</td></tr> <tr><td>2</td><td>5</td><td>50</td><td>25</td></tr> <tr><td>3</td><td>7</td><td>70</td><td>35</td></tr> <tr><td>4</td><td>9</td><td>90</td><td>45</td></tr> <tr><td>5</td><td>11</td><td>110</td><td>55</td></tr> <tr><td>6</td><td>13</td><td>130</td><td>65</td></tr> <tr><td>7</td><td>15</td><td>150</td><td>75</td></tr> <tr><td>8</td><td>17</td><td>170</td><td>85</td></tr> <tr><td>9</td><td>19</td><td>190</td><td>95</td></tr> <tr><td>10</td><td>21</td><td>210</td><td>105</td></tr> <tr><td>11</td><td>23</td><td>230</td><td>115</td></tr> <tr><td>12</td><td>25</td><td>250</td><td>125</td></tr> </tbody> </table>				Nb of strips	Volume of Conjugate Buffer (ml)	Volume of Concentrated Conjugate (µl)	Volume of Concentrated HRP (µl)	1	3	30	15	2	5	50	25	3	7	70	35	4	9	90	45	5	11	110	55	6	13	130	65	7	15	150	75	8	17	170	85	9	19	190	95	10	21	210	105	11	23	230	115	12	25	250	125
Nb of strips	Volume of Conjugate Buffer (ml)	Volume of Concentrated Conjugate (µl)	Volume of Concentrated HRP (µl)																																																																																																												
1	1	10	5																																																																																																												
2	2	20	10																																																																																																												
3	3	30	15																																																																																																												
4	4	40	20																																																																																																												
5	5	50	25																																																																																																												
6	6	60	30																																																																																																												
7	7	70	35																																																																																																												
8	8	80	40																																																																																																												
9	9	90	45																																																																																																												
10	10	100	50																																																																																																												
11	11	110	55																																																																																																												
12	12	120	60																																																																																																												
Nb of strips	Volume of Conjugate Buffer (ml)	Volume of Concentrated Conjugate (µl)	Volume of Concentrated HRP (µl)																																																																																																												
1	3	30	15																																																																																																												
2	5	50	25																																																																																																												
3	7	70	35																																																																																																												
4	9	90	45																																																																																																												
5	11	110	55																																																																																																												
6	13	130	65																																																																																																												
7	15	150	75																																																																																																												
8	17	170	85																																																																																																												
9	19	190	95																																																																																																												
10	21	210	105																																																																																																												
11	23	230	115																																																																																																												
12	25	250	125																																																																																																												
IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION				IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION																																																																																																											
<ul style="list-style-type: none"> - Serum and heparinized plasma provide similar results. Y (Heparin plasma) = 0.95 x (serum) + 2.8 ng/ml, $R^2 = 0.97$, $n = 19$ 				<ul style="list-style-type: none"> - Serum and heparinized plasma provide similar results. Y (Heparin plasma) = 1.0444 x (serum) – 0.7913 ng/ml, $R^2 = 0.9872$, $n = 10$ 																																																																																																											
B. Procedure <ol style="list-style-type: none"> Pipette 75 µl of Incubation Buffer into all the wells. Pipette 100 µl of the working HRP conjugate solution into each well. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature (18-25°C), on a plate shaker (400 rpm) 				B. Procedure <ol style="list-style-type: none"> Pipette 200 µl of Incubation Buffer into all the wells. Pipette 250 µl of the working HRP conjugate solution into each well. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature (18-25°C), on a plate shaker (400 rpm) 																																																																																																											

D. Accuracy

RECOVERY TEST	
Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Recovery (%)
0	100
12.8	102
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Recovery (%)
0	100
11.2	97

D. Accuracy

RECOVERY TEST	
Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Recovery (%)
5	97.1
10	95.1
25	86.7
50	93.9
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Recovery (%)
5	99.8
10	91.5
25	94.8
50	85.6

DILUTION TEST

Sample dilution	Theoretical concen. (ng/ml)	Measured concen. (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	74.9	74.9	100
1/2	37.4	37.9	101
1/4	18.7	19.2	103
1/8	9.3	10.2	110
1/1	56.3	56.3	100
1/2	28.1	28.7	102
1/4	14.0	14.8	106
1/8	7.0	5.8	83

DILUTION TEST

Sample dilution	Theoretical concen. (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	-	62.75	100
1/2	31.38	30.10	95.9
1/4	15.69	14.69	93.6
1/8	7.84	7.39	94.2

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (μ l)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ l)
Calibrators (0-5) Controls, Samples Incubation Buffer	25 - 75	- 25 75
Working HRP Conjugate	100	100

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (μ l)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ l)
Calibrators (0-5) Controls, Samples Incubation Buffer	25 - 200	- 25 200
Working HRP Conjugate	250	250

en

CE

Read entire protocol before use.

25OH Vitamin D Total ELISA 90'

I. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the *in vitro* quantitative measurement of 25-hydroxyvitamin D2 and D3 (25OH-D2 and 25OH-D3) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name: DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA 90' Kit
- B. Catalog number: KAP1971-F1: 96 tests
- C. Manufactured by: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact:
Tel: +32 (0)10 84 99 11 Fax: +32 (0)10 84 99 90

III. CLINICAL BACKGROUND

Vitamin D is the generic term used to designate Vitamin D2 or ergocalciferol and Vitamin D3 or cholecalciferol.

Humans naturally produce Vitamin D3 when the skin is exposed to ultraviolet sun rays.

In the liver mainly, Vitamin D3 is metabolised into 25-Hydroxyvitamin D3 (25OH D3) which is the main form of Vitamin D circulating in the body.

25OH D3 is a precursor for other Vitamin D metabolites and has also a limited activity by itself.

The most active derivative is 1,25-hydroxyvitamin D3, produced in the kidney (or placenta) by 1-hydroxylation of 25OH D3.

25OH Vitamin D stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus and also bone resorption and mineralisation.

25OH Vitamin D might also be active in other tissues responsible for calcium transport (placenta, kidney, mammary gland ...) and endocrine gland (parathyroid glands, beta cells...).

Vitamin D3 and Vitamin D2 are also available by ingestion through food or dietary supplementation.

As Vitamin D2 is metabolised in a similar way to Vitamin D3, both contribute to the overall Vitamin D status of an individual.

It is the reason why it is very important to measure both forms of 25OH Vitamin D equally for a correct diagnosis of Vitamin D deficiency, insufficiency or intoxication.

Vitamin D deficiency is an important risk factor for rickets, osteomalacia, senile osteoporosis, cancer and pregnancy outcomes.

The measurement of both 25OH Vitamin D forms is also required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients.

Vitamin D intoxication has been shown to cause kidney and tissue damages.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA 90' is a solid phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay performed on microtiterplates. During a first 1 hour incubation step, at room temperature (18-25°C), total 25OH Vitamin D (D_2 and D_3) present in calibrators, controls and samples is dissociated from binding serum proteins to fix on binding sites of a specific monoclonal antibody. After 1 washing step, a fixed amount of 25OH Vitamin D-labelled with biotin in presence of horseradish peroxidase (HRP), compete with unlabelled 25OH Vitamin D_2 and 25OH Vitamin D_3 present on the binding sites of the specific monoclonal antibody. After a 15 minutes incubation at room temperature (18-25°C), the microtiterplate is washed to stop the competition reaction. The Chromogenic solution (TMB) is added and incubated for 15 minutes. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is inversely proportional to the total 25OH Vitamin D (D_2 and D_3) concentration.

A calibration curve is plotted and the total 25OH Vitamin D (D_2 and D_3) concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents		KAP 1971-F1	Reconstitution
LJ	Microtiterplate (96 breakable wells) with anti 25OH Vit. D_2 and D_3 (monoclonal antibodies)	96 wells	Ready for use
CAL	0	1 vial lyophilised	Add 1 ml distilled water
CAL	N	5 vials lyophilised	Add 1 ml distilled water
CONTROL	N	2 vials lyophilised	Add 1 ml distilled water
INC	BUF	1 vial 30 ml	Ready for use
CONJ	CONC	1 vial 0.3 ml	Dilute 100 x with conjugate buffer
CONJ	BUF	1 vial 30 ml	Ready for use
HRP	CONC	1 vial 0.2 ml	Dilute 200 x with conjugate buffer
WASH	SOLN	1 vial 10 ml	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CHROM	TMB	1 vial 13 ml	Ready for use
STOP	SOLN	1 vial 13 ml	Ready for use
Stop solution 0.2M H_2SO_4			

Note: Use Calibrator 0 for dilution of samples with values above the highest calibrator.

No international reference material is available.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 25 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 250 μ l and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Plate shaker (400 rpm)
6. Washer for microtiterplates
7. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 nm (bichromatic reading)

VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrator 0:** Reconstitute the calibrator 0 with 1 ml distilled water
- B. **Calibrators 1 - 5:** Reconstitute the calibrators 1-5 with 1 ml distilled water
- C. **Controls:** Reconstitute the controls with 1 ml distilled water.
- D. **Working HRP conjugate solution:**
The working HRP conjugate solution is to be prepared during the incubation and minimum 45 minutes before its use.
(cf X.B.5)

Prepare an adequate volume of working HRP conjugate solution by mixing the 3 reagents in the following sequence: (1) Conjugate buffer, (2) Concentrated Conjugate, (3) Vortex, (4) Concentrated HRP, (5) Vortex.

The order of addition of those 3 reagents is critical and should be rigorously respected to get reproducible Optical Densities.

Prepare the solution according to the number of used strips, as indicated in the below table: for example for 6 strips (48 wells): 130 μ l of concentrated conjugate and 65 μ l of concentrated HRP to 13 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize.

Until its use, keep the working HRP conjugate at room temperature (18-25°C) and avoid direct sunlight or use a brown glass vial for its preparation.

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

Nb of strips	Volume of Conjugate Buffer (ml)	Volume of Concentrated Conjugate (μ l)	Volume of Concentrated HRP (μ l)
1	3	30	15
2	5	50	25
3	7	70	35
4	9	90	45
5	11	110	55
6	13	130	65
7	15	150	75
8	17	170	85
9	19	190	95
10	21	210	105
11	23	230	115
12	25	250	125

E. Working Wash solution: Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 199 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (200x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for eight weeks at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 4 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- This kit is suitable for serum and plasma heparinized samples.
- Serum and plasma heparinized samples samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, **sampling and storage at -20°C is recommended.**
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Serum and heparinized plasma provide similar results.
- Y (Heparin plasma) = $1.0444 \times (\text{serum}) - 0.7913 \text{ ng/ml}$, $R^2 = 0.9872$, $n = 10$

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature (18-25°C) prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
Respect the incubation times.
To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section XIII paragraph E (Time delay).
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.
Each well can only be used once

B. Procedure

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2-8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 25 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 200 µl of Incubation Buffer into all the wells.
5. Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C), on a plate shaker (400 rpm)
6. Prepare the Working HRP conjugate solution during the incubation and minimum 45 minutes before its use.
7. Aspirate the liquid from each well.
8. Wash the plate 3 times by:
 - dispensing 0.35 ml of Wash Solution into each well
 - aspirating the content of each well
9. Pipette 250 µl of the working HRP conjugate solution into each well
10. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature (18-25°C), on a plate shaker (400 rpm)
11. Aspirate the liquid from each well.
12. Wash the plate 3 times by:
 - dispensing 0.35 ml of Wash Solution into each well
 - aspirating the content of each well
13. Pipette 100 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
14. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature (18-25°C), on a plate shaker (400 rpm), avoid direct sunlight.
15. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
16. Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section XI

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

XII. TYPICAL DATA

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

25OH-ELISA		OD units
Calibrator	0 ng/ml 4.88 ng/ml 13.10 ng/ml 27.39 ng/ml 56.08 ng/ml 121.30 ng/ml	2.600 2.428 2.105 1.723 0.906 0.282

Note: 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

The LOB (Limit of blank) was calculated by measuring the blank several times and was calculated as the mean – 1.65 standard deviation of the distribution of the test values. The LOB was calculated to be 2.012 ng/ml.

The LOD (Limit of detection) was calculated as the LOB – 1.645 standard deviation of a low concentration sample tested in 10 different run. The LOD was calculated to be 3.035 ng/ml.

The LOQ (Limit of quantitation) was calculated by testing 8 samples of low values, 10 times. The LOQ was calculated to be 5.91 ng/ml.

B. Specificity

Cross reactivity of the 25OH Vitamin D Total ELISA 90' assay was determined by testing sera with spiked and unspiked cross reactants. The results are summarized in the following table:

Compound and Concentration	% Cross reaction
25OH-Vitamin D ₃ at 10 ng/mL	100
25OH-Vitamin D ₂ at 10 ng/mL	80.1
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	3.06
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₂ at 667 ng/mL	0.73
Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	1.16
Vitamin D ₂ at 200 ng/mL	1.02
3-epi-25OH-Vitamin D ₃ at 20 µg/mL	0.07

The assay performance is not affected by hemolysis (2.5-5g/L hemoglobin tested), bilirubinemia (0.5-1g/L bilirubin conjugated and unconjugated tested) or triglycerides (0.625—2.5 g/L tested). Ascorbic acid (Vitamin C) (0.01-1g/L tested) and biotin (0.002-0.04g/L tested) don't interfere with this assay.

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)	Sample	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	21.55 ± 0.85	3.92	A	10	18.72 ± 1.16	6.2
B	24	45.24 ± 1.45	3.20	B	10	67.90 ± 2.23	3.3

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST	
Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Recovery (%)
5	97.1
10	95.1
25	86.7
50	93.9
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Recovery (%)
5	99.8
10	91.5
25	94.8
50	85.6

DILUTION TEST			
Sample dilution	Theoretical concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	-	62.75	100
1/2	31.38	30.10	95.9
1/4	15.69	14.69	93.6
1/8	7.84	7.39	94.2

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when incubation buffer is dispensed 10, 15 and 20 minutes after the sample has been added in the coated wells.

TIME DELAY				
	0' (ng/ml)	10' (ng/ml)	15' (ng/ml)	20' (ng/ml)
Sample 1	18.0	20.1	21.2	23.0
Sample 2	40.1	41.4	37.6	41.5

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XV. EXPECTED VALUES

Dietary intake, race, season and age are known to affect the normal levels of 25OH.Vit.D₃.

Each laboratory should establish its own range based on their local population.

Recent literature has suggested the following ranges for the classification of 25 OH Vitamin D status:

Level	ng/mL
Deficient	<10
Insufficient	10-29
Sufficient	30-100
Potential Toxicity	>100

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for

HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures. All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious. Avoid any skin contact with all reagents, Stop Solution contains H₂SO₄. In case of contact, wash thoroughly with water. Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves. For more information, see Material Safety Data Sheet (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAPHY

- ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997) **Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.** Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006) **Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.** Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004) **Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.** Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D.** Clinical Laboratory International, October 2010, vol.34 : 16-19.
- HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M , VIETH R.(2010) **The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status.** Clinical Laboratory International, November 2010, vol.34 : 28-30
- HOLICK M.F. (2009) **Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application** Ann. Epidemiol., 19:73-78.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (μ l)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ l)
Calibrators (0-5)	25	-
Controls, Samples	-	25
Incubation Buffer	200	200
Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) with continuous shaking at 400 rpm.		
Prepare the working HRP conjugate during the incubation and minimum 45 minutes before its use. The sequence of preparation is critical, see VII. Reagent Preparation.		
Aspirate the contents of each well.		
Wash 3 times with 350 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Working HRP Conjugate	250	250
Incubate for 15 minutes at room temperature (18-25°C) with continuous shaking at 400 rpm.		
Aspirate the contents of each well.		
Wash 3 times with 350 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at room temperature (18-25°C) with continuous shaking at 400 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader. Record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm).		

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

DIAsource Catalogue Nr : KAP1971-F1	Revision nr : 220516
--	-------------------------

Revision date : 16/05/2022



Lire entièrement le protocole avant utilisation.

25OH Vitamin D Total ELISA 90'

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage immunoenzymatique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 25-hydroxyvitamine D2 et D3 (25OH-D2 et 25OH-D3) dans le sérum et plasma.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

A. Nom du produit: DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA 90' Kit

B. Numéro de catalogue: KAP1971-F1: 96 tests

C. Fabriqué par: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande:

Tel : +32 (0)10 84 99 11 Fax : +32 (0)10 84 99 90

III. CONTEXTE CLINIQUE

La vitamine D est le terme générique utilisé pour désigner la vitamine D2, ou ergocalciférol, et la vitamine D3, ou cholécalciférol.

L'homme produit naturellement de la vitamine D lorsque sa peau est exposée aux ultraviolets des rayons solaires.

La vitamine D3 est métabolisée, principalement dans le foie, en 25-hydroxyvitamine D3 (25OH D3) qui est la forme principale de la vitamine D circulante dans le corps.

La 25OH D3 est un précurseur d'autres métabolites de la vitamine D et possède en elle-même une activité limitée.

Le dérivé le plus actif est la 1,25-hydroxyvitamine D3 produite par le rein (ou le placenta) par 1-hydroxylation de la 25OH D3.

La 25OH vitamine D3 stimule l'absorption intestinale à la fois du calcium et du phosphore ainsi que la résorption et la minéralisation de l'os.

La 25OH vitamine D peut également être active sur d'autres tissus responsables du transport du calcium (placenta, rein, glande mammaire,...) et sur les glandes endocrines (glandes parathyroïdes, cellules bêta,...).

Une autre source de vitamine D3 et de vitamine D2 est l'alimentation ou la prise de suppléments diététiques.

La vitamine D2 étant métabolisée par une voie similaire à la vitamine D3, les deux formes de la vitamine contribuent au statut général en vitamine D d'un individu.

C'est la raison pour laquelle il est très important de doser les deux formes de la 25OH vitamine D pour faire un diagnostic correct de carence, insuffisance ou intoxication en vitamine D.

La carence en vitamine D est un facteur de risque important de rachitisme, ostéomalacie, ostéoporose sénile, cancer et mauvaise évolution de la grossesse.

Le dosage des deux formes de la vitamine D est aussi requis pour déterminer la cause d'une concentration anormale de calcium dans le sérum.

Il a été démontré qu'une intoxication en vitamine D provoque des dommages aux reins et à d'autres tissus..

IV. PRINCIPES DU DOSAGE

L'ELISA DIASource 25OH Vitamin D Total 90' est un essai immunoenzymatique en phase solide réalisé sur des plaques de microtitration. Une première incubation se fait à température ambiante (18-25°C) et dure 1 heure.

Durant cette étape, la vitamine D 25OH totale (D₂ et D₃) présente dans les calibrateurs, les contrôles et les échantillons est libérée de sa liaison aux protéines de liaison du sérum et se fixe sur les sites de fixation d'un anticorps monoclonal spécifique. Après une étape de lavage, une quantité déterminée de vitamine D 25OH marquée à la biotine entre en compétition avec les vitamines D₂ 25OH et D₃ 25OH non marquées présentes pour les sites de liaison de l'anticorps monoclonal spécifique, en présence de peroxydase de raifort (HRP). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante (18-25°C), la plaque de microtitration est lavée afin d'arrêter la réaction de compétition. Une solution chromogène (TMB) est ajoutée et incubée pour 15 minutes. La réaction est arrêtée avec l'addition de Solution d'arrêt et la microplaquette est alors lue à la longueur d'onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l'absorbance, qui est inversement proportionnelle à la concentration en vitamine D 25OH totale (D₂ et D₃). Une courbe de calibration est tracée et les concentrations en 25OH vitamine D totale (D₂ et D₃) des échantillons sont déterminées par interpolation de la concentration sur la courbe de calibration.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	KAP 1971-F1	Reconstitution
 Plaques de microtitration (96 puits cassables) avec l'anti 25OH-Vitamine D2 et D3 (anticorps monoclonaux)	96 puits	Prêt à l'emploi
CAL 0 Calibrateur 0 : matrice biologique avec gentamycine et ProClin	1 flacon lyophilisé	Ajouter 1 ml d'eau distillée
CAL N Calibrateurs 1-5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum de cheval avec gentamycine et ProClin	5 flacons lyophilisés	Ajouter 1 ml d'eau distillée
CONTROL N Contrôles - N = 2 Dans du sérum humain avec ProClin (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon)	2 flacons lyophilisés	Ajouter 1 ml d'eau distillée
INC BUF Tampon d'incubation avec caséine et ProClin	1 flacon 30 ml	Prêt à l'emploi
CONJ CONC Conjugué concentré de la Vit D 25OH	1 flacon 0,3 ml	Diluer 100 x avec du tampon du conjugué
CONJ BUF Tampon du conjugué avec caséine et ProClin	1 flacon 30 ml	Prêt à l'emploi
HRP CONC HRP concentré	1 flacon 0,2 ml	Diluer 200 x avec du tampon du conjugué
WASH SOLN CONC Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CHROM TMB Solution ChromogèneTMB (Tetramethylbenzydine)	1 flacon 13 ml	Prêt à l'emploi
STOP SOLN Solution d'arrêt 0,2M H ₂ SO ₄	1 flacon 13 ml	Prêt à l'emploi

Note: Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons avec des valeurs au-dessus du calibrateur le plus concentré. Des références internationales ne sont pas disponibles.

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 25 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl et 1 ml (il est recommandé d'utiliser des pipettes de précision avec des pointes en plastique à usage unique)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de plaques (400 rpm)
6. Laveur de microplaques
7. Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- A. **Calibrateur 0 :** Reconstituer le Calibrateur 0 avec 1 ml d'eau distillée
- B. **Calibrateurs 1 - 5 :** Reconstituer les Calibrateurs 1-5 avec 1 ml d'eau distillée
- C. **Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 1 ml d'eau distillée.
- D. **Solution du conjugué HRP de travail :**

! La solution du conjugué HRP de travail doit être préparée pendant l'incubation et au minimum 45minutes avant son utilisation (cf X.B.5)

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

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

Préparer la solution du conjugué HRP de travail pour le nombre de barrettes utilisées, comme le tableau ci-dessous l'indique: par exemple, pour 6 barrettes (48 puits), 130 µl de conjugué concentré et 65 µl d'HRP concentrée pour 13 ml de tampon de conjugué.

Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser.

Laisser le conjugué HRP de travail à température ambiante (18-25°C) jusqu'à ce qu'il soit utilisé et éviter les rayons directs du soleil ou utiliser une bouteille en verre brun pour sa préparation.

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

Nb de barrettes	Volume de tampon du conjugué (ml)	Volume de conjugué concentré (µl)	Volume de HRP concentrée (µl)
1	3	30	15
2	5	50	25
3	7	70	35
4	9	90	45
5	11	110	55
6	13	130	65
7	15	150	75
8	17	170	85
9	19	190	95
10	21	210	105
11	23	230	115
12	25	250	125

- E. **Solution de lavage:** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (200x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES RÉACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables huit semaines entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront

gardées à -20°C pendant 4 mois maximum. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.

- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON

- Cette trousse convient pour des échantillons de sérum et de plasma hépariné.
 - Les échantillons de sérum et de plasma hépariné doivent être gardés entre 2 et 8°C.
 - Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, **un stockage à -20°C est recommandé.**
 - Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
 - Les sera et les plasmas héparinés fournissent des résultats similaires.
- $$Y(\text{Plasma hépariné}) = 1,0444 \times (\text{sérum}) + 0,7913 \text{ ng/ml}, R^2=0,9872, n = 10$$

X. MODE OPÉRATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.

Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.

Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.

Utiliser un récipient en plastique propre pour préparer la Solution de Lavage.

Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Pour la distribution de la solution du chromogène et de la solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision.

Respecter les temps d'incubation.

Afin d'éviter des anomalies, le délai entre le pipetage du premier calibrateur et celui du dernier échantillon doit être limité au délai indiqué à la section XIII paragraphe E (Délai).

Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

Distribuer la solution du chromogène dans les 15 minutes après le lavage de la plaque de micro-titration.

Éviter l'exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la solution du chromogène.

Chaque puits ne peut être utilisé qu'une seule fois

B. Mode opératoire

1. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaires pour la série. Les barrettes non utilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessicant et gardées à 2-8°C.

2. Mettre les barrettes dans le cadre de maintien.

3. Pipeter 25 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Échantillon dans les puits appropriés.

4. Pipeter 200 µl de tampon d'incubation dans les puits.

5. Incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C), sur un agitateur de plaques (400 rpm).

Préparer la solution du conjugué HRP de travail pendant l'incubation et au minimum 45 minutes avant son utilisation.

6. Aspirer le liquide de chaque puits.

7. Laver la plaque 3 fois en:

- distribuant 0,35 ml de solution de lavage dans chacun des puits

- aspirant le contenu de chacun des puits

8. Pipeter 250 µl de la solution du conjugué HRP de travail dans chacun des puits.

Incuber la microplaqué pendant 15 minutes à température ambiante (18-25°C), sur un agitateur de plaques (400 rpm).

9. Aspirer le liquide de chaque puits.

10. Laver la plaque 3 fois en:

- distribuant 0,35 ml de solution de lavage dans chacun des puits

- aspirant le contenu de chacun des puits

11. Pipeter 100 µl de la solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.

12. Incuber la microplaqué pendant 15 minutes à température ambiante (18-25°C), sur un agitateur de plaques (400 rpm), éviter l'exposition à la lumière du soleil.

13. Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.

14. Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans l'heure et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

1. Lire la plaque à 450 nm contre un filtre de référence réglé à 650 nm (ou 630 nm).
2. Calculer la moyenne des déterminations réalisées en double.
3. Nous recommandons d'utiliser des méthodes assistées par ordinateur pour construire la courbe de calibration. La méthode préférentielle est l'ajustement de la courbe par régression logistique à 4 paramètres.
4. L'interpolation sur la courbe de calibration des valeurs de la DO de l'échantillon détermine les concentrations en vitamine D 25-OH des échantillons.

XII. DONNÉES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe d'étalonnage.

	25OH-ELISA	Unités DO
Calibrateur	0 ng/ml 4,88 ng/ml 13,10 ng/ml 27,39 ng/ml 56,08 ng/ml 121,30 ng/ml	2,600 2,428 2,105 1,723 0,906 0,282

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

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limites de détection

La LOB (Limite de blanc) a été calculée en mesurant plusieurs fois le blanc et en calculant la moyenne - 1,65 écart type de la distribution des valeurs de test. La LOB a été calculée à 2,012 ng / ml.

La limite de détection (LOD) a été calculée en tant qu'écart type LOB - 1,645 d'un échantillon à faible concentration testé lors de 10 essais différents. La LOD était calculée à 3,035 ng / ml.

La limite de quantification (LOQ) a été calculée en testant 5 échantillons de faibles valeurs, 10 fois. La limite de quantification a été calculée à 5,91 ng / ml.

B. Spécificité

La réactivité croisée de l'essai 25OH Vitamin D Total ELISA a été déterminée en testant des sera qui étaient enrichis et non enrichis en réactants croisés.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Composé et concentration	% de réaction croisée
25OH-Vitamine D ₃ à 25-50 ng/ml	100
25OH-Vitamine D ₂ à 25-50 ng/ml	80,1
1,25(OH) ₂ -Vitamine D ₃ à 200 ng/ml	3,06
1,25(OH) ₂ -Vitamine D ₂ à 2000 ng/ml	0,73
Vitamine D ₃ à 200 ng/ml	1,16
Vitamine D ₂ à 200 ng/ml	1,02
3-épi-25OH-Vitamine D ₃ à 20 µg/ml	0,07

La performance du test n'est pas affectée par l'hémolyse (testée à 2.5-5g/L hémoglobine), la bilirubinémie (testée à 0.5-1g/L le conjugué et non conjugué bilirubine) ni par la présence de triglycérides (testés à 0,625-2,5g/L).

L'acide ascorbique (Vitamine C) (testée à 0.01-1g/L) et biotin (testé à 0,002-0,04 g/L) n'interfèrent pas avec le test.

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Echantillon	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)	Echantillon	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	21,55 ± 0,85	3,92	A	10	18,72 ± 1,16	6,2
B	22	45,24 ± 1,45	3,20	B	10	67,90 ± 2,23	3,3

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

Le recouvrement a été évalué en additionnant différents taux de 25OH Vitamine D à des échantillons. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

TEST DE RÉCUPÉRATION	
25OH-Vit.D ₃ ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
5	97,1
10	95,1
25	86,7
50	93,9
25OH-Vit.D ₂ ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
5	99,8
10	91,5
25	94,8
50	85,6

TEST DE DILUTION			
Dilution des échantillons	Concentration théorique (ng/ml)	Concentration mesurée (ng/ml)	Récupération (%)
1/1	-	62,75	100
1/2	31,38	30,10	95,9
1/4	15,69	14,69	93,6
1/8	7,84	7,39	94,2

E. Délai entre le dernier calibrateur et la distribution de l'échantillon

Comme montré ci-après, les résultats de l'essai restent précis et cela même lorsque le tampon d'incubation est ajouté 10, 15 et 20 minutes après que les échantillons aient été ajoutés dans les puits.

DÉLAI				
	0 min (ng/ml)	10 min (ng/ml)	15 min (ng/ml)	20 min (ng/ml)
Éch. 1	18,0	20,1	21,2	23,0
Éch. 2	40,1	41,5	37,6	41,5

XIV. CONTROLE DE QUALITÉ INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Des contrôles qui contiennent de l'azoture influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en double des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.
- On recommande que les contrôles soient testés de façon routinière comme des échantillons inconnus pour mesurer la variabilité du test. La réalisation du test doit être suivie avec des fichiers de contrôle de qualité des contrôles.
- On recommande de vérifier visuellement le lissage de la courbe sélectionnée par l'ordinateur.

XV. VALEURS ATTENDUES

L'alimentation, la race, la saison et l'âge ont une influence sur les taux de 25OH.Vitamin D₃ normaux.

Tous les laboratoires doivent établir leur fourchette à partir de leur population locale.

Une bibliographie récente a suggéré les fourchettes suivantes pour la classification du statut en 25 OH Vitamine D :

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

XVI. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement. Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs des échantillons de sérum et de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés à partir d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

Éviter le contact de la peau avec tous les réactifs, la solution d'arrêt contient du HCl. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger, ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

Pour plus d'informations, consultez la fiche signalétique (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997) **Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.** Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006) **Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.** Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004) **Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.** Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D.** Clinical Laboratory International, October 2010, vol.34: 16-19.
- HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M, VIETH R.(2010)

The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status.
Clinical Laboratory International, November 2010, vol.34: 28-30

10. HOLICK M.F. (2009)
Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application
Ann. Epidemiol., 19: 73-78.

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS μl	ÉCHANTILLON(S) CONTROLE(S) μl
Calibrateurs (0-5)	25	-
Échantillons, Contrôles	-	25
Tampon d'incubation	75	75
Incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue à 400 rpm.		
Préparer la solution du conjugué HRP de travail pendant l'incubation et au minimum 45minutes avant son utilisation. La séquence de préparation est critique (cfr VII. PREPARATION DES REACTIFS).		
Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 350 μl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Conjugué HRP de travail	100	100
Incuber pendant 15 min à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue à 400 rpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 350 μl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution du chromogène	100	100
Incuber pendant 15 min à température ambiante (18-25°C) sous agitation continue à 400 rpm		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de micropplaques. Enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm)		

Numéro de catalogue DIAsource: KAP1971-F1	Numéro de révision 220516
--	------------------------------

Date de révision : 16/05/2022



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

25OH Vitamin D Total ELISA 90'

I. VERWENDUNGSZWECK

Immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in-vitro*-Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin D2 und D3 (25-OH-D2 und 25-OH-D3) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. **Handelsbezeichnung:** DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA 90' Kit

B. **Katalognummer:** KAP1971-F1: 96 Tests

C. **Hersteller:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellinformationen wenden Sie sich bitte an:
Tel.: +32 (0)10 84 99 11 Fax: +32 (0)10 84 99 90

III. KLINISCHER HINTERGRUND

Vitamin D ist der allgemeine Begriff für Vitamin D2 oder Ergocalciferol und Vitamin D3 oder Cholecalciferol. Vitamin D3 wird nach der Einwirkung von UV-Licht der Sonne auf natürliche Weise in der Haut des Menschen gebildet.

Vitamin D3 wird hauptsächlich in der Leber zu 25-Hydroxyvitamin D3 (25-OH D3) metabolisiert; dies ist die wesentliche Form von Vitamin D, das im Körper zirkuliert.

25-OH D3 ist ein Vorläufer von anderen Vitamin-D-Metaboliten und verfügt selbst über eine begrenzte Aktivität.

Das aktivste Derivat ist 1,25-Hydroxyvitamin D3, das von 1-Hydroxylation von 25-OH D3 in der Niere (oder Plazenta) produziert wird.

25-OH Vitamin D stimuliert sowohl die intestinale Absorption von Calcium und Phosphor als auch die Knochenresorption und Mineralisierung.

25-OH Vitamin D kann auch in anderen Geweben, die für den Calciumtransport verantwortlich sind (z. B. Plazenta, Niere, Milchdrüse), und in endokrinen Drüsen (z. B. Nebenschilddrüsen, Beta-Zellen) aktiv sein.

Vitamin D3 und Vitamin D2 sind außerdem über die Nahrungsaufnahme in Form von Nahrungsmitteln oder Nahrungsergänzungsmitteln verfügbar.

Da Vitamin D2 ähnlich wie Vitamin D3 metabolisiert wird, tragen beide zum allgemeinen Vitamin-D-Status eines Menschen bei.

Es ist daher äußerst wichtig, beide Formen von 25-OH Vitamin D gleichermaßen zu messen, um eine korrekte Diagnose von Vitamin-D-Mangel, -Insuffizienz oder Intoxikation zu erhalten.

Vitamin-D-Mangel ist ein entscheidender Risikofaktor für Rachitis, Osteomalazie, Altersosteoporose, Krebs und Schwangerschaftsverläufe.

Außerdem ist die Messung beider 25-OH Vitamin-D-Formen erforderlich, um die Ursache von abnormen Serumcalciumkonzentrationen in Patienten zu bestimmen.

Es hat sich gezeigt, dass Vitamin-D-Intoxikation Nieren- und Gewebeschäden verursacht.

IV. GRUNDSÄTZE DER METHODE

Der DiaSource 25-OH Vitamin D Total ELISA 90' ist ein Festphasenenzymimmunassay, das auf Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Während des ersten einstündigen Inkubationsschrittes wird bei Raumtemperatur (18-25°C) das Gesamt-25-OH Vitamin D (D2 und D3) in den Kalibratoren, Kontrollen und Proben von bindenden Proteinen im Serum getrennt und bindet sich an den Bindungsstellen eines bestimmten monoklonalen Antikörpers. Nach einem Waschzyklus konkurriert eine festgelegte Menge von biotinyliertem 25-OH Vitamin D, in Gegenwart von Meerrettich-Peroxidase (HRP), mit dem ungekennzeichneten 25-OH Vitamin D2 und 25-OH Vitamin D3, die an den bestimmten monoklonalen Antikörper gebunden sind. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (18-25°C) wird die Mikrotiterplatte gewaschen, um die kompetitive Reaktion zu beenden. Danach wird die Farblösung (TMB) hinzugefügt und 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe einer Stopflösung angehalten, und die Mikrotiterplatte wird dann bei der geeigneten Wellenlänge gelesen. Die Menge an Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die umgekehrt proportional zur Gesamt-25-OH Vitamin D (D2 und D3) Konzentration ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt, und die Gesamt-25-OH Vitamin D (D2 und D3) Konzentrationen in den Proben werden durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	KAP 1971-F1	Rekonstitution
Mikrotiterplatte (mit abbrechbaren Vertiefungen) mit 96 Vertiefungen beschichtet mit Anti 25OH Vit. D2 und D3 (Monoklonale Antikörper)	96 Vertiefungen	Gebrauchsfertig
CAL 0 Null-Kalibrator: Biologische Matrix mit Gentamycin und Proclin	1 Gefäß lyophil.	1 ml dest. Wasser zugeben
CAL N Kalibratoren 1-5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) Pferdeserum mit Gentamycin und Proclin	5 Gefäße lyophil.	1 ml dest. Wasser zugeben
CONTROL N Kontrollen: N = 2 in Humanserum mit Proclin (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten)	2 Gefäße lyophil.	1 ml dest. Wasser zugeben
INC BUF Inkubationspuffer mit Kasein und Proclin	1 Gefäß 30 ml	Gebrauchsfertig
CONJ CONC 25OH Vit. D konzentriertes Konjugat	1 Gefäß 0,3 ml	100 x mit Konjugatpuffer verdünnen
CONJ BUF Konjugatpuffer mit Kasein und Proclin	1 Gefäß 30 ml	Gebrauchsfertig
HRP CONC Konzentriertes HRP	1 Gefäß 0,2 ml	200 x mit Konjugatpuffer verdünnen
WASH SOLN CONC Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 ml	200x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen.
CHROM TMB Chromogene Lösung TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 13 ml	Gebrauchsfertig
STOP SOLN Stopflösung 0,2M H ₂ SO ₄	1 Gefäß 13 ml	Gebrauchsfertig

Hinweis: Verwenden Sie den Null-Kalibrator zur Verdünnung der Proben mit Werten über dem höchsten Kalibrator.

Es ist kein internationales Referenzmaterial verfügbar.

VI. NICHT MITGELIEFERTES MATERIAL

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

- Destilliertes Wasser
- Pipetten für: 25 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl und 1 ml und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen aus Kunststoff wird empfohlen)
- Vortex-Mixer
- Magnetrührer

- Plattenschüttler (400 U/min)
- Waschgerät für Mikrotiterplatten
- Mikrotiterplattenleser zum Lesen bei 450 nm und 650 nm (bichromatisches Ablesen)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Null-Kalibrator:** Null-Kalibrator mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.
- Kalibratoren 1 - 5:** Kalibratoren 1-5 mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.
- Kontrollen:** Kontrollen mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituieren.
- HRP-Arbeitskonjugatlösung:**
! Die HRP-Arbeitskonjugatlösung muss während der Inkubation und mindestens 45 Minuten vor ihrem Gebrauch vorbereitet werden.
(vgl. X.B.5)

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

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

Bereiten Sie die Lösung entsprechend der Anzahl der verwendeten Streifen vor, wie in der Tabelle unten angegeben: zum Beispiel für 6 Streifen (48 Behälter): 130 µl konzentriertes Konjugat und 65 µl konzentriertes HRP zu 13 ml Konjugatpuffer.

Mit einem Vortex-Mixer homogenisieren.

Das HRP-Arbeitskonjugat bis zur Verwendung bei Raumtemperatur (18-25°C) lagern und direktes Sonnenlicht vermeiden oder zur Vorbereitung ein braunes Glasfläschchen verwenden.

Das HRP-Arbeitskonjugat ist instabil und muss entsorgt werden, wenn es nicht benutzt wird.

Anzahl Streifen	Menge an Konjugatpuffer (ml)	Menge an Konzentriertem Konjugat (µl)	Menge an Konzentriertem HRP (µl)
1	3	30	15
2	5	50	25
3	7	70	35
4	9	90	45
5	11	110	55
6	13	130	65
7	15	150	75
8	17	170	85
9	19	190	95
10	21	210	105
11	23	230	115
12	25	250	125

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

VIII. AUFBEWAHRUNG UND VERFALLDATUM DER HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen oder Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfalldatum haltbar.
- Nach ihrer Rekonstitution sind Kalibratoren und Kontrollen acht Wochen bei 2 bis 8°C haltbar. Für längere Aufbewahrungszeiten sind sie zu aliquotieren und einzufrieren und bei -20°C maximal 4 Monate aufzubewahren. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Die frisch hergestellte Waschlösung sollte am selben Tag aufgebraucht werden.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Das Kit ist für heparinisierte Serum- und Plasmaproben geeignet.
- Heparinisierte Serum- und Plasmaproben sind bei 28°C aufzubewahren.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, **wird eine Probenahme und Lagerung bei 20°C empfohlen.**
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Serum und heparinisertes Plasma liefern ähnliche Ergebnisse.
- $Y(\text{Heparin-Plasma}) = 1.0444 \times (\text{Serum}) - 0.7913 \text{ ng/ml}$, $R^2 = 0.9872$, $n=10$

X. DURCHFÜHRUNG

A. Handhabungshinweise

Das Kit oder die Komponenten nicht nach dem Verfalldatum verwenden. Materialien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht untereinander vermischt werden.

Alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18-25°C) bringen.

Alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Wirbeln mischen.

Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt ausführen. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.

Für die Vorbereitung der Waschlösung einen sauberen Kunststoffbehälter verwenden.

Um Kreuzkontamination zu vermeiden, eine saubere Pipettenspitze zum Hinzufügen der einzelnen Reagenzien und Proben verwenden.

Zur Pipettierung der Farblösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen verwenden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.

Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt XIII, Absatz E (Zeitverzögerung) aufgeführt wird.

Für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve erstellen, nicht die Daten von früheren Durchläufen verwenden.

Die Farblösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte pipettieren.

Während der Inkubation mit der Farblösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

Jeder Brunnen kann nur einmal verwendet werden

B. Durchführung

1. Wählen Sie die erforderliche Anzahl von Streifen für den Durchgang. Die nicht verwendeten Streifen sollten mit einem Trocknungsmittel in einem Beutel verschlossen und bei 2-8°C aufbewahrt werden.
2. Die Streifen im Halterrahmen befestigen.
3. Jeweils 25 µl Kalibrator, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
4. 200 µl Inkubationspuffer in alle Kavitäten pipettieren.
5. Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Plattenschüttler (400 U/min) inkubieren.
6. Die HRP-Arbeitskonjugatlösung vorbereiten, sobald die Inkubation gestartet wird, und zwar mindestens 45 Minuten vor ihrer Verwendung.
7. Flüssigkeit aus jeder Kavität absaugen.
8. Platte drei Mal wie folgt waschen:
 - 0,35 ml Waschlösung in jede Kavität geben und
 - Inhalt aus jeder Kavität absaugen.
9. 250 µl der HRP-Arbeitskonjugatlösung in jede Vertiefung pipettieren.
10. Die Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Plattenschüttler (400 U/min) inkubieren.
11. Flüssigkeit aus jeder Kavität absaugen.
12. Platte drei Mal wie folgt waschen:
 - 0,35 ml Waschlösung in jede Kavität geben und
 - Inhalt aus jeder Kavität absaugen.
13. Binnen 15 Minuten nach dem Waschschritt 100 µl der Farblösung in jede Kavität pipettieren.
14. Mikrotiterplatte 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Plattenschüttler (400 U/min) inkubieren, dabei direktes Sonnenlicht vermeiden.
15. 100 µl Stopplösung in jede Kavität pipettieren.
16. Absorption bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) binnen 1 Stunde ablesen und Ergebnisse wie in Punkt XI beschrieben berechnen.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

XII. TYPISCHE WERTE

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

25OH-ELISA		OD-Einheiten
Kalibrator	0 ng/ml 4,88 ng/ml 13,10 ng/ml 27,39 ng/ml 56,08 ng/ml 121,30 ng/ml	2,600 2,428 2,105 1,723 0,906 0,282

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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN

A. Nachweisgrenze

Das LOB (Limit von Leerzeichen) wurde durch mehrmaliges Messen des Leerwerts berechnet und wurde als Mittelwert - 1,65 Standardabweichung der Verteilung der Testwerte berechnet. Das LOB wurde zu 2,012 ng / ml berechnet.

Die LOD (Nachweisgrenze) wurde als LOB - 1.645 - Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration, die in 10 verschiedenen Durchläufen getestet wurde, berechnet. Die LOD wurde mit 3,035 ng / ml berechnet.

Die LOQ (Quantifizierungsgrenze) wurde durch zehnmaliges Testen von 5 Proben mit niedrigen Werten berechnet. Die LOQ wurde mit 5,91 ng / ml berechnet.

B. Spezifität

Die Kreuzreaktivität des 25-OH Vitamin D Total ELISA 90' Assay wurde ermittelt, indem Testserum mit aufgestockten und mit nicht aufgestockten Kreuzreaktanden getestet wurde.

Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Verbindung und Konzentration	% Kreuzreaktion
25-OH Vitamin D ₃ bei 10 ng/ml	100
25-OH Vitamin D ₂ bei 10 ng/ml	80,1
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ bei 200 ng/ml	3,06
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₂ bei 667 ng/ml	0,73
Vitamin D ₃ bei 200 ng/ml	1,16
Vitamin D ₂ bei 200 ng/ml	1,02
3-epi-25OH-Vitamin D ₃ bei 20 µg/ml	0,07

Die Leistung des Assay wird nicht durch Hämolyse (2,5-5g/l Hämoglobin getestet), Bilirubinämie (0,5-1g/l Bilirubin conjugat und unconjugat getestet) oder Triglyceride (0,625-2,5 g/l getestet) beeinträchtigt. Ascorbinsäure (Vitamin C) (0,01-1 g/l getestet) und biotin (0,002-0,04 g/l getestet) beeinträchtigen die Ergebnisse dieses Assays nicht.

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION				INTER-ASSAY PRÄZISION			
Probe	N	$\bar{X} \pm SA$ (ng/ml)	VK (%)	Probe	N	$\bar{X} \pm SA$ (ng/ml)	VK (%)
A	24	$21,55 \pm 0,85$	3,92	A	10	$18,72 \pm 1,16$	6,2
B	24	$45,24 \pm 1,45$	3,20	B	10	$67,90 \pm 2,23$	3,3

SA: Standardabweichung; VK: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST	
25-OH-Vit. D ₃ hinzugefügt (ng/ml)	Wiederfindungsrate (%)
5	97,1
10	95,1
25	86,7
50	93,9
25-OH-Vit. D ₂ hinzugefügt (ng/ml)	Wiederfindungsrate (%)
5	99,8
10	91,5
25	94,8
50	85,6

VERDÜNNUNGSTEST			
Probenverdünnung	Theoretische Konzentration (ng/ml)	Gemessene Konzentration (ng/ml)	Wiederfindungsrate (%)
1/1	-	62,75	100
1/2	31,38	30,10	95,9
1/4	15,69	14,69	93,6
1/8	7,84	7,39	94,2

E. Zeitverzögerung zwischen den letzten Standard- und Probenzugaben

Wie nachstehend gezeigt, bleiben die Assayergebnisse auch dann genau, wenn die Zugabe des Inkubationspuffers 10, 15 und 20 Minuten nach dem Hinzufügen der Probe in die beschichteten Vertiefungen erfolgt ist.

ZEITVERZÖGERUNG				
	0' (ng/ml)	10' (ng/ml)	15' (ng/ml)	20' (ng/ml)
Probe 1	18,0	20,1	21,2	23,0
Probe 2	40,1	41,4	37,6	41,5

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Liegen die für Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 erzielten Ergebnisse nicht in dem auf dem Fläschchenetikett angegebenen Bereich, können die Werte ohne treffende Erklärung der Abweichung nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquote eingefroren werden sollte. Kontrollen mit erhöhten Azidkonzentrationen stören die Enzymreaktion und können nicht verwendet werden.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf guter Laborpraxis beruhen.
- Es wird empfohlen, Kontrollen routinemäßig als unbekannte Proben zu behandeln, um die Assayvarianz zu messen. Die Leistung des Assays muss mit den Qualitätskontrollkurven der Kontrollen überprüft werden.
- Es gilt als gute Praxis, die vom Computer gewählte Kurvenanpassung visuell zu prüfen.

XV. ERWARTETE WERTE

Ernährung, Ethnie, Jahreszeit und Alter können den normalen Spiegel von 25-OH Vitamin D3 beeinflussen.

Jedes Labor sollte seine eigenen Bereiche auf Grundlage der örtlichen Bevölkerung festlegen.

In aktuellen Veröffentlichungen wurden die folgenden Bereiche für die Klassifizierung des 25-OH Vitamin-D-Status empfohlen:

Spiegel	ng/ml
Mangel	>10
Insuffizienz	10-29
Suffizienz	30-100
Mögliche Toxizität	>100

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für *in-vitro*-Diagnostik.

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

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern, in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden. Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien, die Stopplösung enthält HCl. Bei Kontakt gründlich mit Wasser waschen.

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

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).

XVII. LITERATUR

- ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997) **Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.** Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006) **Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.** Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004) **Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.** Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D.** Clinical Laboratory International, October 2010, vol.34: 16-19.
- HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M, VIETH R.(2010) **The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status.** Clinical Laboratory International, November 2010, vol.34: 28-30
- HOLICK M.F. (2009) **Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application** Ann. Epidemiol., 19:73-78.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	KALIBRATOREN (μ l)	PROBE(N) KONTROLLEN (μ l)
Kalibratoren (0-5)	25	-
Kontrollen, Proben	-	25
Inkubationspuffer	200	200
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) unter kontinuierlichem Schütteln bei 400 U/min inkubieren.		
HRP-Arbeitskonjugat während der Inkubation und spätestens 45 Minuten vor der Benutzung vorbereiten. Die Reihenfolge der Zubereitung ist wesentlich, siehe VII. Vorbereitung der Reagenzien.		
Inhalt aus jeder Kavität absaugen. 3 Mal mit 350 μ l Waschlösung waschen und absaugen.		
HRP-Arbeitskonjugat	250	250
Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) unter kontinuierlichem Schütteln bei 400 U/min inkubieren. Inhalt aus jeder Kavität absaugen. 3 Mal mit 350 μ l Waschlösung waschen und absaugen.		
Farblösung	100	100
Für 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) unter kontinuierlichem Schütteln bei 400 U/min inkubieren.		
Stopplösung	100	100
Auf einem Mikrotiterplattenleser ablesen. Die Absorption jeder Kavität bei 450 nm (im Vergleich zu 630 oder 650 nm) verzeichnen.		

DIAsource Katalognummer:
KAP1971-F1

Revisionsnummer:
220516

Versionsstand: 16/05/2022

Lea todo el protocolo antes de usar.

25OH Vitamin D Total ELISA 90'

I. INDICACIONES

Ensayo inmunoenzimétrico para la determinación cuantitativa in vitro de la 25-hidroxivitamina D2 y D3 (25(OH) D2 y 25(OH) D3) en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

A. **Nombre comercial:** DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA 90' Kit

B. **Número de catálogo:** KAP1971-F1: 96 pruebas

C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

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

Tel: +32 (0)10 84 99 11 Fax: +32 (0)10 84 99 90

III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

Vitamina D es el término genérico que se emplea para designar a la vitamina D2 o ergocalciferol y a la vitamina D3 o colecalciferol.

Los seres humanos producen vitamina D3 de forma natural cuando la piel se expone a los rayos ultravioleta solares.

Sobre todo en el hígado, la vitamina D3 se metaboliza en 25-hidroxivitamina D3 (25(OH) D3), que es la forma principal de la vitamina D que circula por el organismo.

La 25(OH) D3 es una precursora de otros metabolitos de la vitamina D y también tiene una actividad limitada. Su derivado más activo es la 1,25-hidroxivitamina D3, producida en el riñón (o en la placenta) por 1-hidroxilación de 25(OH) D3.

La vitamina 25(OH) D estimula la absorción intestinal tanto del calcio como del fósforo, así como la reabsorción ósea y la mineralización.

La vitamina 25(OH) D puede también estar activa en otros tejidos responsables del transporte de calcio (placenta, riñón, glándula mamaria...) y glándulas endocrinas (glándulas paratiroides, células beta...).

La vitamina D3 y la vitamina D2 también están disponibles mediante la ingestión a través de la alimentación o suplementos dietéticos.

Puesto que la vitamina D2 se metaboliza de manera similar a la vitamina D3, ambas contribuyen al estado general de la vitamina D del individuo.

Esta es la razón por la cual es muy importante medir ambas formas de vitamina 25(OH) D del mismo modo para el correcto diagnóstico de una deficiencia, insuficiencia o intoxicación de vitamina D.

La deficiencia de vitamina D es un importante factor de riesgo para el raquitismo, la osteomalacia, la osteoporosis senil, el cáncer y el embarazo.

La medición de ambas formas de vitamina 25(OH) D también se requiere para determinar la causa de concentraciones séricas anormales de calcio en pacientes.

Se ha demostrado que la intoxicación por vitamina D causa daños renales y tisulares.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA 90' es un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas en fase sólida que se realiza en placas de microvaloración. Durante un primer paso de incubación de 1 hora a temperatura ambiente (18-25°), la vitamina 25(OH) D (D2 y D3) presente en los calibradores, controles y muestras se disocia de las proteínas de unión séricas para fijarse en los lugares de unión de un anticuerpo monoclonal específico. Tras 1 paso de lavado, una cantidad fija de vitamina (25)OH D marcada con biotina en presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP) compite con la vitamina 25(OH) D2 y la vitamina 25(OH) D3 no marcadas presentes en los lugares de unión del anticuerpo monoclonal específico. Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente (18-25°), la microppla se lava para detener la reacción de competencia. Se añade la solución cromogénica (TMB) y se incuba durante 15 minutos. Se detiene la reacción añadiendo solución de parada y a continuación se lee la placa de microvaloración a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato transformado se determina colorimétricamente midiendo la absorbancia, que es inversamente proporcional a la concentración de vitamina 25(OH) D (D2 y D3).

Se traza una curva de calibración y se determinan las concentraciones totales de vitamina 25(OH) D (D2 y D3) de las muestras mediante interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	KAP 1971-F1	Reconstitución
WL Microppla (96 pocillos desprendibles) con anti 25OH-Vitamin.D2 y 25OH-Vitamin.D3 (anticuerpos monoclonales)	96 pocillos	Listo para uso
CAL 0 Calibrador 0: matriz biológica con gentamicina y proclina	1 vial liofilizado	Añadir 1 ml de agua destilada
CAL N Calibradores 1-5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero de caballo con gentamicina y proclina	5 viales liofilizados	Añadir 1 ml de agua destilada
CONTROL N Controles - N = 2 en suero humano con proclina 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas)	2 viales liofilizados	Añadir 1 ml de agua destilada
INC BUF Tampón de incubación con caseína y proclina	1 vial 30 ml	Listo para uso
CONJ CONC Conjugado concentrado de 25OH Vitamina D	1 vial 0,3 ml	Diluir 100 x con tampón de conjugado
CONJ BUF Tampón de conjugado con caseína y proclina	1 vial 30 ml	Listo para uso
HRP CONC HRP Concentrado	1 vial 0,2 ml	Diluir 200 x con tampón de conjugado
WASH SOLN CONC Solución de lavado (Tris – HCl)	1 vial 10 ml	Diluir 200 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
CHROM TMB Solución Cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)	1 vial 13 ml	Listo para uso
STOP SOLN Solución de Parada: 0,2M H ₂ SO ₄	1 vial 13 ml	Listo para uso

Nota: Usar el calibrador 0 para la dilución de muestras con valores por encima del calibrador más alto.

No hay material de referencia internacional disponible.

VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

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

- Agua destilada
- Pipetas para dispensación de: 25 µl, 100 µl, 200 µl, 250 µl y 1 ml (se recomienda usar pipetas de precisión con puntas de plástico desechables)
- Agitador vórtex
- Agitador magnético
- Agitador de placas (400 rpm)
- Lavador de placas de microvaloración

7. Lector de placas de microvaloración con capacidad para leer a 450 nm y a 650nm (lectura bicromática)

VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

- Calibrador 0:** reconstituya el calibrador 0 con 1 ml de agua destilada
- Calibradores 1-5:** reconstituya los calibradores 1-5 con 1 ml de agua destilada

Controles: reconstituya los controles con 1 ml de agua destilada.

- Solución de trabajo del conjugado de HRP:**

La solución del conjugado de HRP de trabajo debe prepararse durante la incubación y mínimo 45 minutos antes de su uso.

(ver X.B.5)

Prepare un volumen adecuado de la solución del conjugado de HRP de trabajo mezclando los 3 reactivos en la secuencia siguiente: 1) tampón de conjugado concentrado, 2) conjugado concentrado, 3) agite con un vórtex, 4) HRP concentrado, 5) agite con un vórtex.

El orden en el que se añaden esos 3 reactivos es crítico y debe respetarse estrictamente para obtener densidades ópticas reproducibles.

Prepare la solución conforme al número de tiras utilizadas, según se indica en la tabla siguiente: por ejemplo, para 6 tiras (48 pocillos): 130 µl de conjugado concentrado y 65 µl de HRP concentrado para 13 ml de tampón conjugado.

Use un vórtex para homogeneizar.

Hasta su uso, mantenga el conjugado de HRP de trabajo a temperatura ambiente (18-25°) y evite la luz solar directa o utilice un vial de cristal marrón para su preparación.

La preparación del conjugado de HRP de trabajo no es estable y debe desecharse si no se usa.

N.º de tiras	Volumen del tampón de conjugado (ml)	Volumen del conjugado concentrado (µl)	Volumen del HRP concentrado (µl)
1	3	30	15
2	5	50	25
3	7	70	35
4	9	90	45
5	11	110	55
6	13	130	65
7	15	150	75
8	17	170	85
9	19	190	95
10	21	210	105
11	23	230	115
12	25	250	125

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

VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o de la reconstitución, todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad, indicada en la etiqueta, si se conservan entre 2 y 8 °C.
- Tras la reconstitución, los calibradores y controles se mantienen estables durante ocho semanas a 2-8 °C. Para períodos de tiempo más largos, deben tomarse partes alícuotas y conservarse a -20 °C durante un máximo de 4 meses. Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada deberá utilizarse en el mismo día.
- Las alteraciones del aspecto físico de los reactivos del kit pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

- Este kit es adecuado para muestras de suero y plasma heparinizado.
- Las muestras de suero o plasma heparinizado deben conservarse a 2-8 °C.
- Si la prueba no se realiza antes de 24 horas, **se recomienda obtener y conservar la muestra a -20 °C.**
- Evite ciclos posteriores de congelación y descongelación.
- El suero y el plasma heparinizados proporcionan resultados similares.
- $Y(\text{plasma heparinizado}) = 1,0444 X(\text{suero}) - 0,7913 \text{ ng/ml}, R^2=0.9872, n=10$

X. PROCEDIMIENTO

A. Notas sobre la manipulación

No utilice el kit o sus componentes pasada la fecha de caducidad.

No mezcle materiales de distintos lotes de kit.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°) antes de usar.

Mezcle bien todos los reactivos y muestras agitándolos o revolviéndolos suavemente.

Realice los calibradores, los controles y las muestras por duplicado. Se recomienda alinear verticalmente.

Utilice un recipiente de plástico limpio para preparar la solución de lavado.

Para evitar la contaminación cruzada, utilice una punta de pipeta desechable al añadir cada reactivo y muestra.

No utilice pipetas con partes metálicas para dispensar la solución cromogénica y la solución de parada.

Las pipetas de alta precisión o un equipo de pipeteo automatizado mejorarán la precisión.

Respete los tiempos de incubación.

Para que no haya desvíos, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe limitarse al tiempo indicado en el apartado XIII, párrafo E (Tiempo de demora).

Prepare una curva de calibración para cada análisis, no utilice datos de análisis anteriores.

Dispense la solución cromogénica antes de transcurridos 15 minutos desde el lavado de la placa de microvaloración.

Durante la incubación con solución cromogénica, evite la luz solar directa en la placa de microvaloración.

Cada pozo solo se puede usar una vez

B. Procedimiento

1. Seleccione el número necesario de tiras para el análisis. Las tiras no utilizadas deberían volverse a guardar herméticamente en la bolsa con un desecante y conservarse entre 2 y 8 °C.
2. Fije las tiras en el marco de soporte.
3. Pipetee 25 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos adecuados.
4. Pipetee 200 µl de tampón de incubación en todos los pocillos.
5. Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°) en un agitador de placas (400 rpm).
6. Prepare la solución del conjugado de HRP de trabajo durante la incubación y al menos 45 minutos antes de su uso.
7. Aspire el líquido de cada pocillo.
8. Lave la placa 3 veces:
 - Dispensando 0,35 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
9. Pipetee 250 µl de la solución del conjugado de HRP de trabajo en todos los pocillos. Incube la placa de microvaloración durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°) en un agitador de placas (400 rpm).
10. Aspire el líquido de cada pocillo.
11. Lave la placa 3 veces:
 - Dispensando 0,35 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - Aspirando el contenido de cada pocillo
12. Pipetee 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo en los 15 minutos siguientes al paso de lavado.
13. Incube la placa de microvaloración durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°), en un agitador de placas horizontal (400 rpm), y evite la luz solar directa.
14. Pipetee 100 µl de solución de parada en cada pocillo.
15. Lea las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia a 630 o 650 nm) antes de 1 hora y calcule los resultados conforme se describe en el apartado XI.

XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

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

XII. DATOS TÍPICOS

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

25OH-ELISA		Unidades de DO
Calibrador	0 ng/ml	2,600
	4,88 ng/ml	2,428
	13,10 ng/ml	2,105
	27,39 ng/ml	1,723
	56,08 ng/ml	0,906
	121,30 ng/ml	0,282

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

XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

El LoB (límite del blanco) se calculó por medición del blanco varias veces y se calculó como la media – 1,65 desviación estándar de la distribución de los valores de la prueba. Se calculó que el LoB era 2,012 ng/ml.

El LoD (límite de detección) se calculó como el LoB – 1,645 desviación estándar de una muestra de concentración baja evaluado en 10 análisis diferentes. Se calculó que el LoD era 3,035 ng/ml.

El LoQ (límite de cuantificación) se calculó analizando 5 muestras de valores bajos 10 veces. Se calculó que el LoQ era 5,91 ng/ml.

B. Especificidad

La reactividad cruzada del ensayo 5OH Vitamin D Total ELISA 90' se determinó analizando el suero con reactivos añadidos y no añadidos. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Compuesto y concentración	% reactividad cruzada
Vitamina 25(OH) D3 a 10 ng/ml	100
Vitamina 25(OH) D2 a 10 ng/ml	80,1
Vitamina 1,25(OH)2 D3 a 200 ng/ml	3,06
Vitamina 1,25(OH)2 D2 a 667 ng/ml	0,73
Vitamina D3 a 200 ng/ml	1,16
Vitamina D2 a 200 ng/ml	1,02
Vitamina 3-epi-25(OH) D3 a 20 µg/ml	0,07

La eficacia del ensayo no se ve afectada por la hemólisis (2,5-5g/l en el análisis de hemoglobina), bilirrubinemia (0,5-1g/l en el análisis el conjugado y el unconjugado de bilirrubina) o triglicéridos (0,625-2,5 g/l en el análisis).

El ácido ascórbico (vitamina C) (0,01-1g/l en el análisis) y el biotin (0,002-0,04g/l en el análisis) no interfieren con este ensayo.

C. Precisión

INTRAENSAYO				INTERENSAYO			
Muestra	N	$\bar{X} \pm DE$ (ng/ml)	CV (%)	Muestra	N	$\bar{X} \pm DE$ (ng/ml)	CV (%)
A	24	21.55 ± 0.85	3.92	A	10	18.72 ± 1.16	6.2
B	24	45.24 ± 1.45	3.20	B	10	67.90 ± 2.23	3.3

DE: desviación estándar; CV: coeficiente de variación

D. Exactitud

PRUEBA DE RECUPERACIÓN	
Vitamina 25(OH) D3 añadida (ng/ml)	Recuperación (%)
5	97.1
10	95.1
25	86.7
50	93.9

PRUEBA DE RECUPERACIÓN	
Vitamina 25(OH) D2 añadida (ng/ml)	Recuperación (%)
5	99.8
10	91.5
25	94.8
50	85.6

PRUEBA DE DILUCIÓN			
Dilución de la muestra	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)	Recuperación (%)
1/1	-	62.75	100
1/2	31.38	30.10	95.9
1/4	15.69	14.69	93.6
1/8	7.84	7.39	94.2

E. Tiempo de demora entre el último calibrador y la dispensación de la muestra

Como se muestra a continuación, los resultados del ensayo siguen siendo precisos incluso cuando se dispensa tampón de incubación 10, 15 y 20 minutos después de haber añadido la muestra a los pocillos recubiertos.

TIEMPO DE DEMORA				
	0' (ng/ml)	10' (ng/ml)	15' (ng/ml)	20' (ng/ml)
Muestra 1	18,0	20,1	21,2	23,0
Muestra 2	40,1	41,4	37,6	41,5

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el control 1 o el control 2 no se encuentran dentro del intervalo especificado en la etiqueta del vial, no se pueden utilizar dichos resultados, salvo que se proporcione una explicación satisfactoria sobre la discrepancia.
- Cada laboratorio puede, si lo desea, realizar sus propias mezclas de muestras control, que deberían conservarse congeladas en alícuotas. Los controles que contienen azida interferirán con la reacción enzimática por lo que no se pueden utilizar.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados duplicados de las muestras deben basarse en las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Se recomienda analizar los controles de forma rutinaria como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. La eficacia del ensayo debe monitorizarse con gráficas de control de calidad de los controles.
- Es una buena práctica comprobar visualmente el ajuste de la curva seleccionada por el ordenador.

XV. VALORES ESPERADOS

Se sabe que la ingesta dietética, la raza, la estación y la edad afectan a los niveles normales de vitamina 25(OH) D3. Cada laboratorio debe establecer su propio intervalo basado en su población local.

La literatura reciente sugiere los siguientes intervalos para la clasificación del estado de la vitamina 25(OH) D.

Nivel	ng/ml
Deficiente	<10
Insuficiente	10-29
Suficiente	30-100
Toxicidad posible	> 100

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

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

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

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

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

Para obtener más información, consulte la Hoja de datos de seguridad del material (MSDS)

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997) **Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.** Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006) **Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.** Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004) **Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.** Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D.** Clinical Laboratory International, October 2010, vol.34: 16-19.
- HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M, VIETH R.(2010) **The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status.** Clinical Laboratory International, November 2010, vol.34: 28-30
- HOLICK M.F. (2009) **Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application** Ann. Epidemiol., 19:73-78.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (μ l)	MUESTRA(S) CONTROLES (μ l)
Calibradores (0-5)	25	-
Controles, muestras	-	25
Támpón de incubación	200	200
Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°) con agitación continua a 400 rpm.		
Prepare el conjugado de HRP de trabajo durante la incubación y al menos 45 minutos antes de su uso. La secuencia de preparación es crítica, véase VII.		
Preparación de los reactivos.		
Aspire el contenido de cada pocillo.		
Lave 3 veces con 350 μ l de solución de lavado y aspire.		
Conjugado de HRP de trabajo	250	250
Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°) con agitación continua a 400 rpm.		
Aspire el contenido de cada pocillo.		
Lave 3 veces con 350 μ l de solución de lavado y aspire.		
Solución cromogénica	100	100
Incube durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°) con agitación continua a 400 rpm.		
Solución de parada	100	100
Lea en un lector de placas de microvaloración.		
Registre la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (en comparación con 630 o 650 nm).		

N. ^º de catálogo de DIAsource: KAP1971-F1	N. ^º de revisión: 220516
---	--

Fecha de revisión: 16/05/2022