



25OH Vitamin D Total ELISA

KAP1971

History

Summary of change:

Previous Version:	Current Version:																																								
200224-1	220722																																								
Old DiaSource logo 	New DiaSource logo 																																								
Immunoenzymatic assay for the <i>in vitro</i> quantitative measurement of 25-hydroxyvitamin D2 and D3 (25OH-D2 and 25OH-D3) in serum.	Immunoenzymatic assay for the <i>in vitro</i> quantitative measurement of 25-hydroxyvitamin D2 and D3 (25OH-D2 and 25OH-D3) in serum and plasma.																																								
V. REAGENTS PROVIDED	V. REAGENTS PROVIDED																																								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">INC</td> <td style="width: 10%;">BUF</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Incubation Buffer with casein and proclin</td> <td>1 vial 20 ml</td> <td>green</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="2">CHROM TMB</td> <td>1 vial 12 ml</td> <td>orange</td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="2">STOP SOLN</td> <td>1 vial 12 ml</td> <td></td> <td>Ready for use</td> </tr> </table>	INC	BUF				Incubation Buffer with casein and proclin		1 vial 20 ml	green	Ready for use	CHROM TMB		1 vial 12 ml	orange	Ready for use	STOP SOLN		1 vial 12 ml		Ready for use	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 10%;">INC</td> <td style="width: 10%;">BUF</td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> <td style="width: 10%;"></td> </tr> <tr> <td colspan="2">Incubation Buffer with casein and proclin</td> <td>1 vial 30 ml</td> <td></td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="2">CHROM TMB</td> <td>1 vial 13 ml</td> <td></td> <td>Ready for use</td> </tr> <tr> <td colspan="2">STOP SOLN</td> <td>1 vial 13 ml</td> <td></td> <td>Ready for use</td> </tr> </table>	INC	BUF				Incubation Buffer with casein and proclin		1 vial 30 ml		Ready for use	CHROM TMB		1 vial 13 ml		Ready for use	STOP SOLN		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		1 vial 12 ml	orange	Ready for use																																					
STOP SOLN		1 vial 12 ml		Ready for use																																					
INC	BUF																																								
Incubation Buffer with casein and proclin		1 vial 30 ml		Ready for use																																					
CHROM TMB		1 vial 13 ml		Ready for use																																					
STOP SOLN		1 vial 13 ml		Ready for use																																					
Note: For dilution of samples having concentrations of 25OH Vitamin D above the highest calibrator concentration, use Control 1 or a serum sample with a concentration of 25OH below 25ng/mL, and above 4.4ng/mL (limit of quantification of the assay), as measured in this assay. Use Ctrl 1 or this sample to dilute 2X the out of curve samples. Take the concentration of the Ctrl 1* or the low sample into account when calculating the dilution result. * Use the concentration of Ctrl 1 measured in the same run as the dilution run, not the mean concentration on the Ctrl 1 label!	Note: Use Calibrator 0 for dilution of samples with values above the highest calibrator. No international reference material is available.																																								
Calculations: Sample value = (Measured value – F1*Measured Ctrl 1) / F2 with the following values for F1 and F2: - Sample diluted 2 times, F1 = 0.5; F2 = 0.5 - Sample diluted 4 times, F1 = 0.75; F2 = 0.25 - Sample diluted 8 times, F1 = 0.875; F2 = 0.125																																									
Example: A sample out of the calibration curve is diluted 4 times with Ctrl 1, and is measured at 70ng/mL. Ctrl 1 is measured in the same run at 20ng/mL. Dilution 4 times, F1 = 0.75; F2 = 0.25 Sample calculated value = (70 – 0.75*20) / 0.25 = 220ng/mL No international reference material is available																																									
VII. REAGENT PREPARATION D. Prepare the solution according to the number of used strips, as indicated in the below table: for example for 6 strips (48 wells): 100 µl of concentrated conjugate and 50 µl of concentrated HRP to 10 ml of conjugate buffer.	VII. REAGENT PREPARATION D. 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" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Nb of strips</th> <th style="width: 10%;">Volume of Conjugate Buffer (ml)</th> <th style="width: 10%;">Volume of Concentrated Conjugate (µl)</th> <th style="width: 10%;">Volume of Concentrated HRP(µl)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3</td> <td>30</td> <td>15</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	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Nb of strips</th> <th style="width: 10%;">Volume of Conjugate Buffer (ml)</th> <th style="width: 10%;">Volume of Concentrated Conjugate (µl)</th> <th style="width: 10%;">Volume of Concentrated HRP (µl)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3</td> <td>30</td> <td>15</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																								
Nb of strips	Volume of Conjugate Buffer (ml)	Volume of Concentrated Conjugate (µl)	Volume of Concentrated HRP(µl)																																						
1	3	30	15																																						
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	6	60	30
4	8	80	40
5	9	90	45
6	10	100	50
7	12	120	60
8	14	140	70
9	16	160	80
10	18	180	90
11	20	200	100
12	22	220	110

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

- This kit is suitable for serum samples.
- Serum 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.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- This kit is suitable for serum and heparinized plasma samples.
- Serum and heparinized plasma 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. $Y(\text{Heparin plasma}) = 0.9922 \times (\text{serum}) + 0.2129 \text{ ng/ml}$, $R^2 = 0.9944$, $n = 10$

X. PROCEDURE

B. Procedure

3. Pipette 50 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 150 µl of Incubation Buffer into all the wells.
8. Pipette 200 µl of the working HRP conjugate solution into each well. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature, on a plate shaker (400 rpm)

X. PROCEDURE

B. Procedure

3. Pipette 25 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 250 µl of Incubation Buffer into all the wells.
8. Pipette 250 µl of the working HRP conjugate solution into each well. Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature, on a plate shaker (400 rpm)

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	2.66
	5.3 ng/ml	2.39
	15.0 ng/ml	1.83
	25.7 ng/ml	1.46
	54.3 ng/ml	0.81
	133 ng/ml	0.21

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	2.79
	3.44 ng/ml	2.56
	16.28 ng/ml	1.93
	32.39 ng/ml	1.20
	63.54 ng/ml	0.49
	122.76 ng/ml	0.16

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Limits of Detection

The Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD), and the Limit of Quantitation (LoQ), were determined in accordance with the CLSI guideline EP17-A.

The LoB was calculated by measuring the blank several times and calculating the 95th percentile of the distribution of the test values. The LoB was calculated to be 1.69ng/ml.

The LoD was calculated as described in the guideline. The LoD was calculated to be 2.81ng/ml.

The LoQ was calculated by testing 5 samples of low value 14 times in different test. The LoQ was calculated to be 4.39ng/ml with CV of 20%.

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Limits of Detection

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 2.07 ng/ml.

The LOD (Limit of detection) was calculated as the LOB - 1.65 standard deviation of a low concentration sample tested in 10 different run. The LOD was calculated to be 3.26 ng/ml.

The LOQ (Limit of quantitation) was calculated by testing 5 samples of low values, 10 times. The LOQ was calculated to be 3.35 ng/ml.

B. Specificity

Compound and Concentration	% Cross reaction
25OH-Vitamin D ₃ at 10 ng/mL	100
25OH-Vitamin D ₂ at 10 ng/mL	86
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	20
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₂ at 690 ng/mL	1.9
Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	2.9
Vitamin D ₂ at 200 ng/mL	1.3
24,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 20 ng/mL	>100
25,26(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 4 ng/mL	>100
3-epi-25OH-Vitamin D ₃ at 20 µg/mL	0.1

The effect of potential interfering substances on samples using the DiaSoure 25 OH Vitamin D Total ELISA test was evaluated. Different levels of Hemoglobin, Triglyceride, Vitamin C, Bilirubin Conjugate and Unconjugated and Zemplar in serum samples were tested on samples with different 25OH Vitamin D Concentration. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%. The tested substances did not affect the performance of the DiaSoure 25 OH Vitamin D Total ELISA test.

B. Specificity

Compound and Concentration	% Cross reaction
25OH-Vitamin D ₃ at 10 ng/mL	92
25OH-Vitamin D ₂ at 10 ng/mL	91
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	3.10
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₂ at 667 ng/mL	0.35
Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	0.17
Vitamin D ₂ at 200 ng/mL	0.22
3-epi-25OH-Vitamin D ₃ at 20 µg/mL	0.91

The effect of potential interfering substances on samples using the DiaSoure 25 OH Vitamin D Total ELISA test was evaluated. Different levels of Hemoglobin, Triglyceride, Vitamin C, Bilirubin Conjugate and Unconjugated in serum samples were tested on samples with different 25OH Vitamin D Concentration. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%. The tested substances did not affect the performance of the DiaSoure 25 OH Vitamin D Total ELISA test.

Substance	25OH Vitamin D (ng/mL)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Mean % Variation
Hemoglobin	7.6	250	-0.6%
		500	
	29.3	250	
		500	
	42.5	250	
		500	
	6.0	50	
		100	
Bilirubin Conjugated	21.6	50	-3.4%
		100	
	38.6	50	
		100	
	7.6	50	
		100	
	29.3	50	
		100	
Bilirubin Unconjugated	42.5	50	2.5%
		100	
	7.6	7.5	
		125	
	29.3	250	
		500	
	42.5	7.5	
		125	
Triglyceride	29.3	125	-4.3%
		250	
	42.5	125	
		250	
	7.6	500	
		500	
	29.3	7.5	
		125	
Vitamin C	6.0	0.2	2.5%
		0.4	
	21.6	1	
		10	
	38.6	100	
		1000	
	6.0	1	
		10	

Substance	25OH Vitamin D (ng/mL)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Mean % Variation
Hemoglobin	21.87	250	-3.7%
		500	
		250	
		500	
Bilirubin Conjugated	37.36	50	2.5%
		100	
		50	
		100	
Bilirubin Unconjugated	21.87	50	-0.2%
		100	
		50	
		100	
Triglyceride	21.87	6.25	-2.1%
		125	
		250	
		500	
		6.25	
		125	
Vitamin C	37.36	250	2.9%
		500	
		100	
		10	
		1	
		100	
Biotin	21.87	0.2	2.5%
		2	
		4	
		0.2	
		2	
		4	

Biotin	8.7	0.2	4.7%
		2	
		4	
		0.2	
	19.8	2	
		4	
		0.2	
	36.1	2	
		4	
		0.0013	
		0.0025	
Zemplar	17.6	0.0050	-4.4%
		0.0013	
		0.0025	
	33.5	0.0050	

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	C.V. (%)	Sample	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	5.5 ± 0.4	7.8	A	39	17.7 ± 1.3	7.4
B	35	27.4 ± 1.6	5.7	B	10	26.3 ± 1.2	4.7
C	35	43.0 ± 1.2	2.7	C	10	42.1 ± 1.8	4.3
D	24	81.2 ± 2.0	2.5	D	21	85.4 ± 7.8	9.2

SD: Standard Deviation, CV: Coefficient of variation

E. Accuracy

RECOVERY TEST			
Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)		Recovery (%)	
0		100	
25		96	
50		92	
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)		Recovery (%)	
0		100	
25		105	
50		95	

DILUTION TEST

A sample with a concentration known to be distributed throughout the measurable range was tested at equidistant dilutions, according to the dilution protocol in chapter V, to determine the linear range of the assay. A linear regression analysis was performed. The results are summarized in the following table:

Sample Dilution		Theoretical Concentration (ng/mL)	Measured Concentration (ng/mL)	Slope	Y-Intercept	R ²	Recovery (%)
1/1		101.8	101.8				100
1/2	with a Ctrl 1 measured at 27.1ng/mL	64.4	62.9	1.02	-1.91	>0.98	98
1/4		45.7	52.0				114
1/8		36.4	34.8				96
1/16		31.7	33.6				106

The linear range of the assay was found to be 33.6 ng/mL to 101.8 ng/mL.

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	C.V. (%)	Sample	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	20.40 ± 0.69	3.4	A	10	12.62 ± 0.79	6.3
B	24	33.32 ± 0.96	2.9	B	10	20.99 ± 0.69	3.3
C	10			C	10	33.22 ± 1.30	3.9
D	10			D	10	70.25 ± 2.42	3.4

SD: Standard Deviation, CV: Coefficient of variation

E. Accuracy

RECOVERY TEST			
Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)		Recovery (%)	
5		90	
10		92	
25		85	
50		71	
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)		Recovery (%)	
5		88	
10		91	
25		88	
50		83	

DILUTION TEST

DILUTION TEST:			
Sample dilution	Theoretical concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	-	65.20	-
1/2	32.60	29.34	90.0
1/4	16.30	15.01	92.1
1/8	8.15	8.91	109.3

Samples were diluted with the zero calibrator.

The linear range of the assay was found to be 8.91 ng/mL to 65.20 ng/mL

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µl)	SAMPLE(S) CONTROLS (µl)
Calibrators (0-5)	50	-
Controls, Samples	-	50
Incubation Buffer	150	150
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 400 rpm.		
Prepare the working HRP conjugate during the incubation and minimum 1h 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 µl of Wash Solution and aspirate.		
Working HRP Conjugate	200	200
Incubate for 30 minutes at room temperature with continuous shaking at 400 rpm.		
Aspirate the contents of each well.		
Wash 3 times with 350 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at room temperature 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).		

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	CALIBRATORS (µl)	SAMPLE(S) CONTROLS (µl)
Calibrators (0-5)	25	-
Controls, Samples	-	25
Incubation Buffer	250	250
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 400 rpm.		
Prepare the working HRP conjugate during the incubation and minimum 1h 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 µl of Wash Solution and aspirate.		
Working HRP Conjugate	250	250
Incubate for 30 minutes at room temperature with continuous shaking at 400 rpm.		
Aspirate the contents of each well.		
Wash 3 times with 350 µl of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at room temperature 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).		



en

US: For in-vitro diagnostic use only.

Read entire protocol before use.

25OH Vitamin D Total ELISA

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 Kit
- B. Catalog number: KAP1971: 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 is a solid phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay performed on microtiterplates. During a first 2 hours incubation step, at room temperature, 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 30 minutes incubation at room temperature, the microtiterplate is washed to stop the competition reaction. The Chromogene 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	96 Tests Kit	Reconstitution
Microtiterplate (96 breakable wells) with anti 25OH Vit. D₂ and D₃ (monoclonal antibodies)	96 wells	Ready for use
CAL 0 Calibrator 0: biological matrix with gentamycin and proclin	1 vial lyophilised	Add 1 ml distilled water
CAL N Calibrators 1-5 (see exact values on vial labels) in horse serum with gentamycin and proclin	5 vials lyophilised	Add 1 ml distilled water
CONTROL N Controls N = 2 in human serum with proclin	2 vials lyophilised	Add 1 ml distilled water
INC BUF Incubation Buffer with casein and proclin	1 vial 30 ml	Ready for use
CONJ CONC 25OH Vit D Concentrated Conjugate	1 vial 0.3 ml	Dilute 100 x with conjugate buffer
CONJ BUF Conjugate Buffer with casein and proclin	1 vial 30 ml	Ready for use
HRP CONC Concentrated HRP	1 vial 0.2 ml	Dilute 200 x with conjugate buffer
WASH SOLN CONC Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	Dilute 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CHROM TMB Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 13 ml	Ready for use
STOP SOLN Stop solution 0.2M H ₂ SO ₄	1 vial 13 ml	Ready for use

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 µl, 250 µl 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 1h45 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: example for 6 strips (48 wells): 130 µl of concentrated conjugate and 65 µl 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 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 (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

- 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 heparinized plasma samples.
- Serum and heparinized plasma 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. $Y(\text{Heparin plasma}) = 0.9922 \times (\text{serum}) + 0.2129 \text{ ng/ml}$, $r^2 = 0.9944$, $n = 10$

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 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.

B. Procedure

- 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.
- Secure the strips into the holding frame.
- Pipette 25 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
- Pipette 250 µl of Incubation Buffer into all the wells.
- Incubate for 2 hours at room temperature, on a plate shaker (400 rpm)
 Prepare the Working HRP conjugate solution during the incubation and minimum 1h 45 minutes before its use.
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
 - dispensing 0.35 ml of Wash Solution into each well
 - aspirating the content of each well
- Pipette 250 µl of the working HRP conjugate solution into each well
 Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature, on a plate shaker (400 rpm)
- Aspirate the liquid from each well.
- Wash the plate 3 times by:
 - dispensing 0.35 ml of Wash Solution into each well
 - aspirating the content of each well
- Pipette 100 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
- Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature, on a plate shaker (400 rpm), avoid direct sunlight.
- Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
- 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

- Read the plate at 450 nm against a reference filter set at 650 nm (or 630 nm).
- Calculate the mean of duplicate determinations.
- 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.
- 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 3.44 ng/ml 16.28 ng/ml 32.39 ng/ml 63.54 ng/ml 122.76 ng/ml	2.79 2.56 1.93 1.20 0.49 0.16

Note: 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Limits of Detection

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 2.07 ng/ml.
 The LOD (Limit of detection) was calculated as the LOB - 1.65 standard deviation of a low concentration sample tested in 10 different run. The LOD was calculated to be 3.26 ng/ml.

The LOQ (Limit of quantitation) was calculated by testing 5 samples of low values, 10 times. The LOQ was calculated to be 3.35 ng/ml

B. Specificity

Cross reactivity of the 25OH Vitamin D Total ELISA 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	92
25OH-Vitamin D ₂ at 10 ng/mL	91
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	3.10
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₂ at 667 ng/mL	0.35
Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	0.17
3-epi-25OH-Vitamin D ₃ at 20 µg/mL	0.91

The effect of potential interfering substances on samples using the DIAsure 25 OH Vitamin D Total ELISA test was evaluated. Different levels of Hemoglobin, Triglyceride, Vitamin C, Bilirubin Conjugate and Unconjugated in serum samples were tested on samples with different 25OH Vitamin D Concentration. Our acceptance criteria was to have interference of less than 10%. The tested substances did not affect the performance of the DIAsure 25 OH Vitamin D Total ELISA test.

Substance	25OH Vitamin D (ng/mL)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Mean % Variation
Hemoglobin	21.87	250	-3.7%
		500	
	37.36	250	
		500	
Bilirubin Conjugated	21.87	50	2.5%
		100	
	37.36	50	
		100	
Bilirubin Unconjugated	21.87	50	-0.2%
		100	
	37.36	50	
		100	
Triglyceride	21.87	6.25	-2.1%
		125	
		250	
		500	
		6.25	
	37.36	125	
		250	
		500	
		6.25	
		125	
Vitamin C	21.87	1	2.9%
		10	
		100	
	37.36	1	
		10	
		100	
Biotin	21.87	0.2	2.5%
		2	
		4	
		0.2	
	37.36	2	
		4	
		0.2	
		2	

C Precision

The assay precision was calculated by running samples for a span of at least 20 days on 3 different lots. The results are summarized in the table below:

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	20.40 ± 0.69	3.4	A	10	12.62 ± 0.79	6.3
B	24	33.32 ± 0.96	2.9	B	10	20.99 ± 0.69	3.3
				C	10	33.22 ± 1.30	3.9
				D	10	70.25 ± 2.42	3.4

SD: Standard Deviation, CV: Coefficient of variation

D. Reproducibility

The reproducibility of the assay was done by testing three samples in duplicate for five days, twice a day, at three sites with two technicians per site. The mean results are summarized in the table below:

Sample	n	ng/mL	Within-Run	Between-Run	Between-Day	Between-Tech	Between-Site	Total
1	57	25.5	SD 0.22	0.61	0.98	1.54	2.21	2.59
			CV 0.3%	0.9%	3.8%	6.0%	8.7%	10.2%
2	57	52.9	SD 0.64	1.57	1.11	2.28	4.29	5.19
			CV 0.9%	2.3%	2.1%	4.3%	8.1%	9.8%
3	59	124.9	SD 1.00	1.74	1.84	3.39	4.98	6.25
			CV 1.4%	2.5%	1.5%	2.7%	4.0%	5.0%

E. Accuracy

Recovery was assessed by adding different levels of 25OH Vitamin D to samples. The results are summarized in the table below:

RECOVERY TEST		
Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)		Recovery (%)
5		90
10		92
25		85
50		71
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)		Recovery (%)
5		88
10		91
25		88
50		83

DILUTION TEST:			
Sample dilution	Theoretical concentration (ng/ml)	Measured concentration (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	-	65.20	-
1/2	32.60	29.34	90.0
1/4	16.30	15.01	92.1
1/8	8.15	8.91	109.3

Samples were diluted with the zero calibrator.

The linear range of the assay was found to be 8.91 ng/mL to 65.20 ng/mL.

F. Time delay

Time delay test between the last Calibrator and sample dispensing results is shown in the following table.

TIME DELAY			
	0 min (ng/ml)	10 min (ng/ml)	20 min (ng/ml)
Sample 1	27.9	30.5	30.2
Sample 2	49.5	47.5	49.0

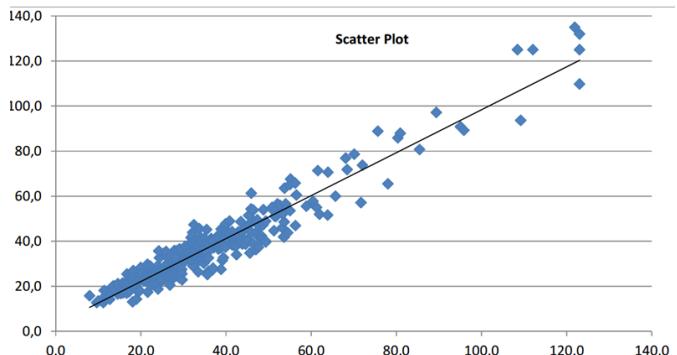
Assay results remain accurate even when incubation buffer is dispensed 10 and 20 minutes after the Calibrator has been added in the coated wells.

G. Limitations of the test

1. The test is an aid in the diagnosis and is to be used in conjunction with clinical findings.
2. The performance of this assay has not been established in a pediatric population.
3. Samples suspected of containing concentrations above the highest calibrator should be assayed in dilution.
4. Hemolysed samples should not be used.

H. Method comparison

The performance of the DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA test was determined by conducting a correlation study tested at three different sites using a total of 356 samples. The samples were tested on both the DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA test and a commercially available 25OH Vitamin D ELISA test. The results ranged from 8.0ng/ml to 123.0ng/ml, the correlation coefficient between the two methods was 0.917, with the 95% confidence interval of 87.6% to 93.6%, a slope of 0.954 and the y-intercept of 3.05. The following graph summarizes the results:



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

Reference ranges have been established based on 150 apparently healthy individuals. The individual patient serum samples used were obtained from a certified commercial source and were collected from an FDA Licensed Donor Center with informed consent. 50 samples were from Northern US (Pennsylvania), 50 samples were from Central US (Tennessee), and 50 samples were from Southern US (Florida). Samples were collected in the winter months (January - March), were between the ages of 21-92 years old and included both light skin and dark skin population. The donors from which samples were collected were not taking vitamin D supplements, had no family history of parathyroid, or calcium regulatory disease, had no history of Kidney, Liver, Parathyroid, Calcium related disease or bariatric surgery, and were not taking any medications known to affect absorption or catabolism of Vitamin D. The following table is the summary or results:

	Florida	Tennessee	Pennsylvania	Overall
Highest Conc. (ng/mL)	88.6	71.4	54.6	88.6
Lowest Conc. (ng/mL)	6.1	4.9	5.9	4.9
Median Conc. (ng/mL)	20.8	17.2	14.3	17.3

Only Central 95% (2.5% - 97.5%) of the results observed were used.

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 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, refer to the MSDS.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
2. HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
3. HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
4. 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.
5. 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.
6. HOLICK M.F.(2004) **Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.** Am. J. Clin. Nutr., 80:16788S-1688S.
7. HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D.** Clinical Laboratory International October 2010, vol.34: 16-19.
8. HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.
9. TAHN 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.
11. National Osteoporosis Foundation. Prevention – Vitamin D

<http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitamind>

12. EP17-A
Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

CALIBRATORS (μ L)	SAMPLE(S) CONTROLS (μ L)	
Calibrators (0-5) Controls, Samples Incubation Buffer	25 - 250	- 25 250
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 400 rpm. Prepare the working HRP conjugate during the incubation and minimum 1h 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 30 minutes at room temperature 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 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

Revision nr :
220722

Revision date : 22/07/2022



US : Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

25OH Vitamin D Total ELISA

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 Kit
- B. Numéro de catalogue: KAP1971: 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 un faire 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 est un essai immunoenzymatique en phase solide réalisé sur des plaques de microtitration. Une première incubation se fait à température ambiante et dure 2 heures. Durant cette étape, la vitamine D 25OH totale (D_2 et D_3) 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 1 étape de lavage, une quantité déterminée de vitamine D 25OH marquée à la biotine entre en compétition avec les vitamines D_2 25OH et D_3 25OH non marquées présentes pour les sites de liaison de l'anticorps monoclonal spécifique, en présence de peroxydase de raifort (HRP). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, 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 micro-plaque 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 (D_2 et D_3). Une courbe de calibration est tracée et les concentrations en 25OH vitamine D totale (D_2 et D_3) des échantillons sont déterminées par interpolation de la concentration sur la courbe de calibration.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Quantité	Reconstitution
Plaques de micro-titration (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 le sérum humain avec ProClin	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 Chromogène TMB (Tetramethylbenzidine)	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

Remarque :

Utiliser le calibrateur 0 pour la dilution d'échantillons dont les valeurs sont supérieures au calibrateur le plus élevé.

Aucun matériau de référence international n'est disponible.

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée

- Pipettes pour distribuer: 25 µl, 250 µl et 1 ml (il est recommandé d'utiliser des pipettes de précision avec des pointes en plastique à usage unique)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur de plaques (400 tpm)
- Laveur de micro-plaques
- Lecteur de micro-plaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

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

! La solution du conjugué HRP de travail doit être préparée pendant l'incubation et au minimum 1h45 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 de HRP concentrée pour 13 ml de tampon de conjugué. Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser.

Laisser le conjugué HRP de travail à température ambiante jusqu'à ce qu'il soit utilisé et éviter les rayons direct 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

- 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.
- $Y(\text{Plasma hépariné}) = 0,9922 \times (\text{sérum}) + 0,2129 \text{ ng/ml}$, $R^2 = 0,9944$, $n = 10$

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 avant utilisation.

Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Réaliser 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.

B. Mode opératoire

1. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaire pour la série. Les barrettes non utilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessiccat 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 250 µl de tampon d'incubation dans les puits.
5. Incuber pendant 2 heures à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tpm).
6. Préparer la solution du conjugué HRP de travail pendant l'incubation et au minimum 1h45 avant son utilisation.
7. Aspirer le liquide de chaque puits.
8. 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
9. Pipeter 250 µl de la solution du conjugué HRP de travail dans chacun des puits.
10. Incuber la microplaquette pendant 30 minutes à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tpm).
11. Aspirer le liquide de chaque puits.
12. 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
13. Pipeter 100 µl de la solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
14. Incuber la microplaquette pendant 15 minutes à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tpm), éviter exposition à la lumière du soleil.
15. Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
16. 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 préférable 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
	3,44 ng/ml
	16,28 ng/ml
	32,39 ng/ml
	63,54 ng/ml
	122,76 ng/ml

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

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limites de détection

La LOB (Limite du blanc) a été calculée en mesurant le blanc plusieurs fois et a été calculée comme la moyenne - 1,65 déviation standard de la distribution des valeurs de test. On a calculé que la LOB était de 2,07 ng/ml.

La LOD (Limite de détection) a été calculée comme étant la LOB - 1,65 déviation standard d'un échantillon à faible concentration testé en 10 passages différents. La LOD a été calculée comme étant 3,26 ng/ml.

La LOQ (Limite de quantification) a été calculée en testant 5 échantillons de faibles valeurs, 10 fois. La LOQ a été calculée comme étant de 3,35 ng/ml.

B. Spécificité

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

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Composé et concentration	% de réaction croisée
25OH-Vitamine D ₃ à 10 ng/mL	92
25OH-Vitamine D ₂ à 10 ng/mL	91
1,25(OH) ₂ -Vitamine D ₃ à 200 ng/mL	3,10
1,25(OH) ₂ -Vitamine D ₂ à 667 ng/mL	0,35
Vitamine D ₃ à 200 ng/mL	0,17
Vitamine D ₂ à 200 ng/mL	0,22
3-epi-25OH-Vitamine D ₃ à 20 µg/mL	0,91

L'effet des substances potentiellement interférentes sur les échantillons en utilisant le test 25 OH Vitamin D Total ELISA de DIAsoure a été évalué. Différents taux d'hémoglobine, triglycérides, vitamine C, bilirubine conjuguée et non conjuguée ont été testés sur des échantillons avec différentes concentrations en 25OH Vitamine D. Notre critère d'acceptation était d'avoir une interférence inférieure à 10%. Les substances testées n'ont pas affecté la performance du test 25 OH Vitamin D Total ELISA de DIAsoure.

Substance	25OH Vitamine D (ng/mL)	Concentration de l'interférent (mg/dL)	Variation moyenne %
Hémoglobine	21,87	250	-3,7%
		500	
	37,36	250	
		500	
Bilirubine conjuguée	21,87	50	2,5%
		100	
	37,36	50	
		100	
Bilirubine non conjuguée	21,87	50	-0,2%
		100	
	37,36	50	
		100	
Triglycérides	21,87	6,25	-2,1%
		125	
		250	
		500	
	37,36	6,25	
		125	
		250	
		500	
Vitamine C	21,87	1	2,9%
		10	
		100	
	37,36	1	
		10	
		100	
Biotine	21,87	0,2	2,5%
		2	
		4	
	37,36	0,2	
		2	
		4	

C. Précision

La précision de l'essai a été calculée en analysant des échantillons pendant au moins 20 jours avec 3 lots différents. Les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous:

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	20,40 ± 0,69	3,4	A	10	12,62 ± 0,79	6,3
B	24	33,32 ± 0,96	2,9	B	10	20,99 ± 0,69	3,3
				C	10	33,22 ± 1,30	3,9
				D	10	70,25 ± 2,42	3,4

SD : Déviation Standard, CV: Coefficient de variation

D. Reproductibilité

La reproductibilité de l'essai a été réalisée en testant trois échantillons en double pendant cinq jours dans trois sites avec deux techniciens par site. Les résultats moyens sont résumés dans le tableau suivant:

Échantillon	n	ng/ml	Intra-run	Inter-run	Inter-jour	Inter-tech	Inter-site	Total
1	57	25,5	SD 0,22	0,61	0,98	1,54	2,21	2,59
			CV 0,3%	0,9%	3,8%	6,0%	8,7%	10,2%
2	57	52,9	SD 0,64	1,57	1,11	2,28	4,29	5,19
			CV 0,9%	2,3%	2,1%	4,3%	8,1%	9,8%
3	57	124,9	SD 1,00	1,74	1,84	3,39	4,98	6,25
			CV 1,4%	2,5%	1,5%	2,7%	4,0%	5,0%

E. 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 RECUPÉRATION	
25OH-Vit.D ₃ ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
5	90
10	92
25	85
50	71

25OH-Vit.D ₂ ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
5	88
10	91
25	88
50	83

ESSAI DE DILUTION:			
Dilution de l'échantillon	Concentration théorique (ng/ml)	Concentration mesurée (ng/ml)	Récupération (%)
1/1	-	65,20	-
1/2	32,60	29,34	90,0
1/4	16,30	15,01	92,1
1/8	8,15	8,91	109,3

Les échantillons ont été dilués avec le calibrateur zéro.

La plage linéaire du test est de 8,91 ng / ml à 65,20 ng / ml.

F. Délai

Les résultats du test de délai entre le dernier calibrateur et la distribution de l'échantillon sont montrés dans le tableau suivant.

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

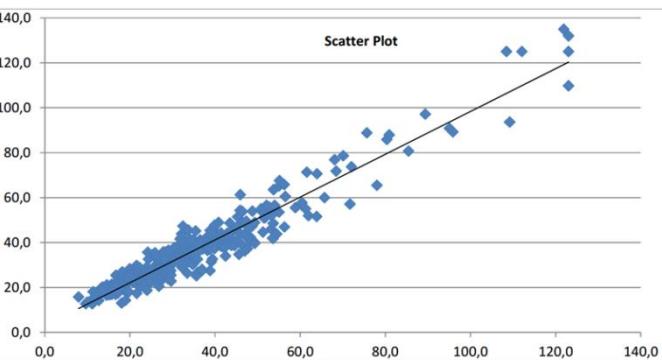
Les résultats de l'essai restent précis même lorsque le tampon d'incubation est distribué 10 et 20 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux puits tapissés

G. Limites de la procédure

1. Le test est une aide au diagnostic et doit être utilisé en conjonction avec les signes cliniques.
2. La performance de cet essai n'a pas été établie pour la population pédiatrique.
3. Les échantillons suspectés de contenir des concentrations supérieures à celles du calibrateur le plus élevé doivent être dilués avant d'être testés.
4. Les échantillons hémolysés ne doivent pas être utilisés.

H. Comparaison de la méthode

La performance du test 25OH Vitamin D Total ELISA de DIAsource a été déterminée par une étude de corrélation faite dans trois sites différents sur un total de 356 échantillons. Les échantillons ont été testés à la fois par le 25OH Vitamin D Total ELISA de DIAsource et un test d'analyse de la vitamine D par ELISA disponible dans le commerce. Les résultats se trouvaient dans une fourchette de 8,0 ng/ml à 123,0 ng/ml, le coefficient de corrélation entre les deux méthodes était de 0,917 avec l'intervalle de confiance à 95% de 87,6 à 93,6%, une pente de 0,954 et l'intersection avec l'axe des y à 3,05. Le graphique suivant résume les résultats:



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 *in duplo* 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

Les fourchettes de référence ont été établies sur base de 150 individus apparemment sains. Les sérum des différents patients ont été obtenus auprès d'une source commerciale certifiée et ont été prélevés par un centre de donneurs reconnus par la FDA (FDA Licensed Donor Center) avec un consentement éclairé. 50 échantillons provenaient du nord de l'Amérique (Pennsylvanie), 50 du centre de l'Amérique (Tennessee) et 50 du sud de l'Amérique (Floride). Les échantillons ont été prélevés pendant les mois d'hiver (janvier à mars). Les donneurs avaient un âge se situant entre 21 et 92 ans et incluaient à la fois une population à la peau claire et à la peau foncée. Ils ne prenaient pas de supplément en vitamine D, n'avaient pas d'antécédents familiaux de maladies de la parathyroïde ou de la régulation du calcium, n'avaient pas d'antécédents de maladies du rein, du foie, de la parathyroïde, concernant le calcium ou une chirurgie bariatrique et ne prenaient aucun médicament connu pour modifier l'absorption ou le catabolisme de la vitamine D. Le tableau suivant résume ces résultats:

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

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

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 devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés 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 H₂SO₄. 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, se référer à la MSDS.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
2. HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
3. HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D.** Clinical Laboratory International, October 2010, vol.34: 16-19.
8. HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.
9. TAHAN 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.
11. National Osteoporosis Foundation. Prevention – Vitamin D <http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitamind>
12. EP17-A
Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	CALIBRATEURS µl	ÉCHANTILLON(S) CONTRÔLE(S) µl
Calibrateurs (0-5) Échantillons, Contrôles Tampon d'incubation	25 - 250	- 25 250
Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation continue à 400 tpm. Préparer la solution du conjugué HRP de travail pendant l'incubation et au minimum 1h45 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	250	250
Incuber pendant 30 min à température ambiante sous agitation continue à 400 tpm. 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 sous agitation continue à 400 tpm		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de micrplaques. Enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm)		

Numéro de catalogue DIAsource:
KAP1971

Numéro de révision :
220722

Date de révision :22/07/2022



de

US: Nur für diagnostische Zwecke

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

25OH Vitamin D Total ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von 25-Hydroxy Vitamin D2 und D3 (25OH-D2 und 25OH-D3) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

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

B. Katalognummer: KAP1971: 96 Tests

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

Für technische Unterstützung oder Bestellungen 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 Ausdruck zur Bezeichnung von Vitamin D2, oder Ergocalciferol und Vitamin D3, oder Cholecalciferol.

Menschen produzieren Vitamin D3 auf natürliche Weise, wenn die Haut ultravioletten Sonnenstrahlen ausgesetzt wird.

Hauptsächlich wird Vitamin D3 in der Leber in 25-Hydroxyvitamin D3 (25OH D3) metabolisiert, welches die Hauptform von im Körper zirkulierendem Vitamin D darstellt.

25OH D3 ist ein Vorläufer für andere Vitamin D Metaboliten und ist in begrenztem Umfang selbst aktiv. Das am meisten aktive Derivat ist 1,25-Hydroxyvitamin D3, welches in den Nieren (oder in der Plazenta) durch eine 1-Hydroxylierung produziert wird. 25OH Vitamin D stimuliert die intestinale Absorption von Kalzium und Phosphor und auch die Knochenresorption und -Mineralisierung. 25OH Vitamin D kann auch in anderen Geweben aktiv für den Kalziumtransport verantwortlich sein (Plazenta, Nieren, Milchdrüsen,...) und für die Endokrinen Drüsen (Nebenschilddrüse, Beta Zellen,...).

Vitamin D3 und Vitamin D2 werden ebenfalls über die Nahrung oder diätische Ergänzungsmittel verfügbar gemacht. Da Vitamin D2 auf ähnliche Weise metabolisiert wird wie Vitamin D3, tragen auch beide zum Vitamin D Gesamtstatus einer Person bei. Das ist der Grund, warum eine Bestimmung der beiden Formen von 25 OH Vitamin D für eine korrekte Diagnose des Vitamin D Mangels, der Insuffizienz oder der Intoxikation so wichtig ist.

Vitamin D Mangel ist ein wichtiger Risikofaktor für Rachitis, Knochenerweichung, altersbedingte Osteoporose, Krebs und Schwangerschaftsvorfällen. Die Messung von beiden Formen von 25OH Vitamin D ist ebenso erforderlich zur Bestimmung der Ursachen von anormalen Konzentrationen von Serum Kalzium Spiegeln bei Patienten.

Vitamin D Intoxikationen verursachen Nieren und Gewebeschäden.

IV. WIRKUNGSPRINZIP DER METHODE

Der DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA ist ein Festphasen ELISA (Enzym gekoppeltes immunabsorbierendes Analysesystem), der auf Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Während einer ersten, 2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, dissoziert das gesamte 25OH Vitamin D (D_2 und D_3), welches in den Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten ist, von den bindenden Serum Proteinen, um an den Bindungsstellen eines spezifischen monoklonalen Antikörpers anzudocken. Nach einem Waschschritt konkurriert eine bestimmte Menge von, mit Biotin in Gegenwart von Meerrettich Peroxidase (HRP) gelabeltem, 25OH Vitamin D mit ungelabeltem 25OH Vitamin D_2 und 25OH Vitamin D_3 , welche an den Bindungsstellen des spezifischen monoklonalen Antikörpers vorhanden sind. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Mikrotiterplatte gewaschen, um die Wettbewerbsreaktion zu stoppen. Die chromogene Lösung (TMB) wird hinzugefügt und 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stopflösung gestoppt und die Mikrotiterplatte bei der geeigneten Wellenlänge abgelesen. Der Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die umgekehrt proportional zu der Gesamtconzentration von 25OH Vitamin D (D_2 und D_3) ist. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die Gesamtconzentrationen von 25OH Vitamin D (D_2 und D_3) der Proben durch Dosis Interpolation aus der Kalibrationskurve abgelesen.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	Quantität	Rekonstitution
WL 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	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_2SO_4	1 Gefäß 13 ml	Gebrauchsfertig

Anmerkung:

Verwenden Sie Kalibrator 0 zur Verdünnung von Proben mit Werten über dem höchsten Kalibrator.

Es ist kein internationales Referenzmaterial verfügbar.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Dest. Wasser
- Pipetten: 25 µl, 250 µl und 1 ml (die Benutzung von genauen Pipetten mit Einmalspitzen ist vorgeschrieben)
- Vortexmixer
- Magnetrührer
- Plattenschüttler (400 upm)
- Mikrotiterplatten Washer
- Mikrotiterplattenleser, der bei 450 und 650 nm abliest (bichromatische Ablesung)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Null-Kalibrator:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 1 ml dest. Wasser.
- Kalibratoren 1-5:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren 1-5 mit 1 ml dest. Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.
- HRP Konjugat Gebrauchslösung:**
Die HRP-Arbeitskonjugatlösung muss während der Inkubation und spätestens 1 h 45 Minuten vor Benutzung bereitet werden (siehe X.B.5).

Bereiten Sie eine entsprechende Menge der HRP-Arbeitskonjugatlösung durch Mischen der drei Reagenzien in folgender Reihenfolge: (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, die 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.. Benutzen Sie einen Vortex zum Homogenisieren.

Bis zur Verwendung lagern Sie das gebrauchsfertige HRP Konjugat bei Raumtemperatur und vermeiden Sie direktes Sonnenlicht oder benutzen Sie ein braunes Glasröhrchen für die Zubereitung.

Die Herstellung von gebrauchsfähigem HRP Konjugat ist nicht stabil und muss bei Nichtgebrauch verworfen werden.

Anzahl der Streifen	Volumen des Konjugatpuffers (ml)	Volumen des konzentrierten Konjugats (µl)	Volumen des konzentrierten 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

- Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (200x) 199 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach Rekonstituierung sind die Kalibratoren und Kontrollen für 8 Wochen bei 2 bis 8°C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden für maximal 4 Monate. Vermeiden Sie wiederholte Einfrier-Auftau Zyklen.

- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und 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 Probennahme und Lagerung bei 20°C empfohlen.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Serum und heparinisiertes Plasma liefern ähnliche Ergebnisse.
- $Y \text{ (Heparin-Plasma)} = 0,9922 \times (\text{Serum}) + 0,2129 \text{ ng/ml}$, $R^2 = 0,9944$, $n = 10$

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.

Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.

Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.

Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.

Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogene Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.

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) erwähnt wird.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.

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

B. Durchführung

1. Selektieren Sie die benötigte Anzahl Streifen für den Lauf. Die unbenutzten Streifen sollten im Beutel mit Trockenmittel versiegelt und bei 2-8°C aufbewahrt werden.
2. Sichern Sie die Streifen im Halterrahmen.
3. Pipettieren Sie 25 µl von jedem Kalibrator, jeder Kontrolle und Probe in die entsprechenden Vertiefungen.
4. Pipettieren Sie 250 µl Inkubationspuffer in alle Vertiefungen.
5. Inkubieren Sie für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (400 upm).
6. Die HRP Konjugat Gebrauchslösung während der Inkubation und mindestens 1 Std. 45 Min. vor ihrer Verwendung herstellen.
7. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung.
8. Waschen Sie die Platte 3 mal indem Sie:
 - 0,35 ml Waschlösung in jede Vertiefung pipettieren
 - den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen
9. Pipettieren Sie 250 µl der HRP Konjugat Gebrauchslösung in jede Vertiefung.
10. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei Raumtemperatur, auf einem Plattenschüttler (400 upm).
11. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung.
12. Waschen Sie die Platte 3 mal indem Sie:
 - 0,35 ml Waschlösung in jede Vertiefung pipettieren
 - den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen
13. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung.

14. Lesen Sie die Absorption bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb einer Stunde ab und berechnen Sie das Ergebnis, wie in Abschnitt XI beschrieben.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Lesen Sie die Platte bei 450 nm gegen den Referenzfilter, der auf 650nm (oder 630nm) eingestellt ist.
2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen
3. Es sollten Computer gestützte Methoden benutzt werden, um die Kalibrationskurve zu erstellen. 4-Parameter logistische Kurvenanpassung ist die bevorzugte Methode. Verwerfen Sie offensichtliche Ausreißer.
4. Durch Interpolation der Proben OD-Werte bestimmen Sie die 25OH Vitamin D Konzentrationen der Proben aus der Kalibrationskurve.

XII. TYPISCHE WERTE

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

25OH-ELISA		Absorptionseinheiten
Kalibrator	0 ng/ml	2,79
	3,44 ng/ml	2,56
	16,28 ng/ml	1,93
	32,39 ng/ml	1,20
	63,54 ng/ml	0,49
	122,76 ng/ml	0,16

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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenzen

Die LOB (Limit of blank) wurde durch mehrmalige Messung des Leerwertes berechnet und ergab sich aus dem Mittelwert - 1,65 Standardabweichung der Verteilung der Testwerte. Die LOB wurde mit 2,07 ng/ml berechnet.

Die LOD (Limit of detection) wurde berechnet als LOB - 1,65 Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration, die in 10 verschiedenen Durchläufen getestet wurde. Die LOD wurde mit 3,26 ng/ml berechnet.

Die LOQ (Bestimmungsgrenze) wurde berechnet, indem 5 Proben mit niedrigen Werten 10-mal getestet wurden. Der LOQ wurde mit 3,35 ng/ml berechnet.

B. Spezifität

Die Kreuzreakтивität des 25OH Vitamin D Total ELISA Testsystems wurde durch Austestung von Seren mit beladenen oder unbeladenen Reaktanten bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Komponente und Konzentration	% Kreuzreaktion
25OH-Vitamin D ₃ bei 10 ng/ml	92
25OH-Vitamin D ₂ bei 10 ng/ml	91
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ bei 200 ng/ml	3,10
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₂ bei 667 ng/ml	0,35
Vitamin D ₃ bei 200 ng/ml	0,17
Vitamin D ₂ bei 200 ng/ml	0,22
3-epi-25OH-Vitamin D ₃ bei 20 µg/ml	0,91

Der Effekt von potentiell interferierenden Substanzen auf Proben, die mit DiaSource 25 OH Vitamin D Total ELISA getestet wurden, wurde evaluiert. Verschiedene Mengen von Hämoglobin, Triglyceriden, Vitamin C, Bilirubin Konjugat und Unkonjugiert in Serumproben wurden gegen Proben mit verschiedenem 25OH Vitamin D Konzentrationen getestet.

Substanz	25OH Vitamin D (ng/ml)	Konzentration von Interferent (mg/dl)	Durchschnittsvariation %
Hämoglobin	21,87	250	-3,7%
		500	
	37,36	250	
		500	

Bilirubin konjugiert	21,87	50	2,5%
	37,36	100	
Bilirubin unkonjugiert	21,87	50	-0,2%
	37,36	100	
Triglyzeride	21,87	6,25	-2,1%
	37,36	125	
Vitamin C	21,87	250	2,9%
	37,36	500	
Biotin	21,87	1	2,5%
	37,36	10	
		100	
		10	
	21,87	100	
	37,36	100	
	21,87	0,2	2,5%
	37,36	2	
		4	
		0,2	
	21,87	2	
	37,36	4	

C. Präzision

Die Präzision des Tests wurde kalkuliert, indem Proben von 3 verschiedenen LOTs für mindestens 20 Tage getestet wurden. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle zusammengefasst:

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Probe	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)	Probe	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	20,40 ± 0,69	3,4	A	10	12,62 ± 0,79	6,3
B	24	33,32 ± 0,96	2,9	B	10	20,99 ± 0,69	3,3
				C	10	33,22 ± 1,30	3,9
				D	10	70,25 ± 2,42	3,4

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit des Testsystems wurde überprüft durch Testung von 3 Proben im Duplikat während 5 Tagen, zweimal pro Tag, an 3 verschiedenen Arbeitsplätzen mit je zwei Technikern pro Platz. Die Durchschnittsergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

Probe	n	ng/ml	Lauf-intern	Zwischen den Läufen	Zwischen den Tagen	Zwischen Technikern	Zwischen Arbeitsplätzen	Gesamt
1	57	25,5	SD 0,22 CV 0,3%	0,61 0,9%	0,98 3,8%	1,54 6,0%	2,21 8,7%	2,59 10,2%
2	57	52,9	SD 0,64 CV 0,9%	1,57 2,3%	1,11 2,1%	2,28 4,3%	4,29 8,1%	5,19 9,8%
3	59	124,9	SD 1,00 CV 1,4%	1,74 2,5%	1,84 1,5%	3,39 2,7%	4,98 4,0%	6,25 5,0%

E. Genauigkeit

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe von verschiedenen Mengen 25OH Vitamin D zu den Proben ermittelt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst:

WIEDERFINDUNGSTEST	
Zugeg. 25-OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
5	90
10	92
25	85
50	71
Zugeg. 25-OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
5	88
10	91
25	88
50	83

VERDÜNNUNGSTEST			
Probenverdünnung	Theoretische Konzentration (ng/mL)	Gemessene Konzentration (ng/mL)	Wiederfindungs rate (%)
1/1	-	65,20	-
1/2	32,60	29,34	90,0
1/4	16,30	15,01	92,1
1/8	8,15	8,91	109,3

Die Proben wurden mit dem Nullkalibrator verdünnt.

Der lineare Bereich des Assays wurde als zwischen 8,91 ng/mL und 65,20 ng/mL ermittelt.

F. Zeitverzögerung

Der Zeitverzögerungstest zwischen dem letzten Kalibrator und dem Dispensieren von Proben wird nachfolgend gezeigt:

ZEITABSTAND			
	0 Min (ng/ml)	10 Min (ng/ml)	20 Min (ng/ml)
Probe 1	27,9	30,5	30,2
Probe 2	49,5	47,5	49

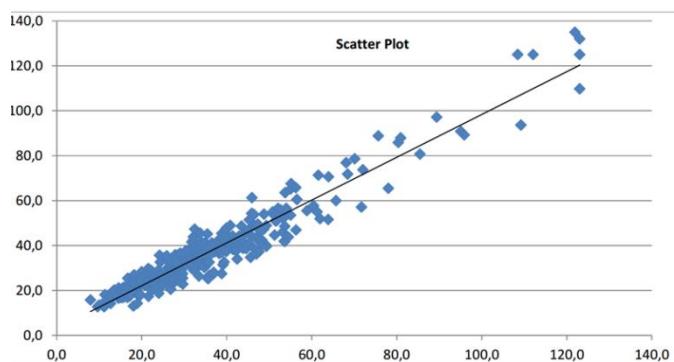
Testergebnisse bleiben genau, selbst wenn der Inkubationspuffer 10 oder 20 Minuten nach dem Kalibrator in die beschichteten Vertiefungen dispensiert wird.

G. Grenzen der Methodik

- Der Test stellt eine Hilfe bei der Diagnose dar und muss in Verbindung mit klinischen Befunden benutzt werden.
- Die Leistungsmerkmale dieses Tests wurden nicht in einer pädiatrischen Population ermittelt.
- Proben, bei denen Konzentrationen oberhalb des höchsten Kalibrators erwartet werden, sollten verdünnt getestet werden.
- Hämolierte Proben sollten nicht getestet werden.

H. Methodenvergleich

Die Leistung des DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA Testsystems wurde in einer Korrelationsstudie an drei verschiedenen Orten mit insgesamt 356 Proben ermittelt. Die Proben wurden sowohl mit dem DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA Testsystem als auch mit einem kommerziell erhältlichen 25OH Vitamin D Total ELISA Testsystem getestet. Die Ergebnisse lagen im Bereich von 8,0 ng/ml bis 123,0 ng/ml, der Korrelationskoeffizient zwischen den zwei Methoden betrug 0,917, mit dem 95% Vertrauensintervall zwischen 87,6% und 93,6%, die Steigung betrug 0,954 und das y-Interzept 3,05. Der folgende Graph fasst die Ergebnisse zusammen:



XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Wenn die Resultate für Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 sich nicht innerhalb des auf dem Fläschchenetikett angegebenen Bereichs befinden, können die Resultate nicht verwendet werden, wenn es keine zufriedenstellende Erklärung für die Diskrepanz gibt.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Kontrollen, die Azid enthalten, interferieren mit der enzymatischen Reaktion und können nicht verwendet werden.

- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.
- Es ist erforderlich, dass die Kontrollen routinemäßig als unbekannte Proben mitgeführt werden, um die Testvariabilität zu bestimmen. Die Leistung des Testsystems sollte mit Qualitätskontrollkarten der Kontrollen überwacht werden.
- Eine gute Vorgehensweise ist die optische Kontrolle der vom Computer selektierten Kurvenpassform.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Nahrungsaufnahme, Rasse, Jahreszeit und Alter haben einen Einfluss auf die Normalwerte des 25OH.Vit.D3.

Jedes Labor sollte seinen eigenen Bereich, basierend auf der lokalen Bevölkerung, etablieren.

Aktuelle Literatur schlägt die folgenden Bereiche für die Klassifizierung von 25 OH Vitamin D vor:

Menge	ng/ml
Mangel	<10
Unzulänglichkeit	10-29
Ausreichend	30-100
Giftigkeit	>100

Referenzbereiche basierend auf Proben von 150 offensichtlich gesunden Individuen wurden erstellt. Die benutzten individuellen Patienten Serumproben wurden über eine zertifizierte kommerzielle Quelle bezogen und wurden von einem FDA lizenzierten Spenderzentrum mit Spenderbescheinigung gesammelt. 50 Proben stammten aus dem Norden der USA (Pennsylvania), 50 Proben aus der Mitte (Tennessee) und 50 Proben aus dem Süden der USA (Florida). Die Proben wurden in den Wintermonaten (Januar –März) von 21-92 jährigen Spendern heller und dunkler Hautfarbe entnommen. Die von den Spendern gesammelten Proben enthielten keine Vitamin D Supplamente, wiesen keinen familiären Hintergrund für Nebennierenkrankungen oder Erkrankungen des Kalziumstoffwechsels auf, hatten keine Historie für Niere, Leber, Nebenniere und Kalziumhaushalt oder andere Ausschlussoperationen und nahmen keine den Vitamin D Haushalt beeinflussenden Medikamente. Die nachfolgende Tabelle ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse:

	Florida	Tennessee	Pennsylvania	Überall
Höchste Konz. (ng/ml)	88,6	71,4	54,6	88,6
Niedrigste Konz. (ng/ml)	6,1	4,9	5,9	4,9
Mittlere Konz. (ng/ml)	20,8	17,2	14,3	17,3

Nur die mittleren 95% (2,5% - 97,5%) der erhaltenen Ergebnisse wurden verwendet.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und 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 oder Serumproben in Übereinstimmung mit den 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 den Hautkontakt mit allen Reagenzien, die Stopflösung enthält H₂SO₄. Im Kontaktfall muss sorgfältig mit Wasser abgewaschen werden.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

XVII. LITERATUR

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
4. 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.
5. 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.
6. HOLICK M.F.(2004)
Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.
Am. J. Clin. Nutr., 80:16788S-1688S.
7. HEANEY R.P. (2010)
Defining deficiency of vitamin D .
Clinical Laboratory International October 2010, vol.34: 16-19.
8. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.
9. 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.
11. **National Osteoporosis Foundation. Prevention – Vitamin D**
<http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitamind>
12. EP17-A
Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

KALIBRATOREN µl	PROBE(N) KONTROLLEN µl
Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen Inkubationspuffer	25 - 250
Inkubieren Sie 2 Stunden unter permanentem Schütteln (400 UpM) bei Raumtemperatur.	250
Bereiten Sie das HRP-Arbeitskonjugat während der Inkubation und spätestens 1 h 45 Minuten vor Benutzung. Die Reihenfolge der Zubereitung ist wesentlich, siehe VII. Vorbereitung der Reagenzien.	
Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung auf.	
Waschen Sie 3mal mit 350 µl Waschlösung und entleeren Sie diese.	
HRP Konjugat Gebrauchslösung	250
Inkubieren Sie 30 Minuten unter permanentem Schütteln (400 UpM) bei Raumtemperatur.	250
Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung auf.	
Waschen Sie 3mal mit 350 µl Waschlösung und entleeren Sie diese.	
Chromogene Lösung	100
Inkubieren Sie 15 Minuten unter permanentem Schütteln (400 UpM)	100
Stopflösung	100

Ablesung auf einem Mikrotiterplatten Lesegerät-

Notieren Sie die Absorption von jeder Vertiefung bei 450 nm (gegen 630 oder
650 nm)

DIAsource Katalognummer:
KAP1971

Nummer der
Originalausgabe:
220722

Revisionsdatum: 22/07/2022



it

US: Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso.

25OH Vitamin D Total ELISA

I. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro della 25-idrossivitamina D2 e D3 (25OH-D2 e 25OH-D3) nel siero e nel plasma.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

A. **Nome commerciale:** DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA Kit

B. **Numero di catalogo:** KAP1971: 96 tests

C. **Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

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

III. INFORMAZIONI CLINICHE

Con il termine "Vitamina D" si intendono genericamente la Vitamina D2, o ergocalciferolo, e la Vitamina D3, o colecalciferolo.

L'esposizione della cute ai raggi ultravioletti induce naturalmente la sintesi di Vitamina D3 da parte dell'organismo umano.

La Vitamina D3 viene metabolizzata, principalmente nel fegato, a 25-idrossivitamina D3 (25OH-D3), la principale forma di Vitamina D circolante nell'organismo.

La 25OH-D3 è un precursore di altri metaboliti della Vitamina D, oltre ad avere essa stessa un'attività limitata.

Il suo derivato più attivo è la 1,25-idrossivitamina D3, prodotta dal rene (o dalla placenta) in seguito a idrossilazione della 25OH-D3 in posizione 1.

La 25OH-Vitamina D stimola l'assorbimento intestinale sia del calcio che del fosforo, oltre al riassorbimento e alla mineralizzazione delle ossa.

La 25OH-Vitamina D può anche essere attiva in altri tessuti responsabili del trasporto del calcio (placenta, rene, ghiandola mammaria, ecc.) e nelle ghiandole endocrine (paratiroidi, beta cellule, ecc.). Le Vitamine D3 e D2 sono assimilabili anche da fonti alimentari e dalla supplementazione con integratori alimentari.

Poiché la Vitamina D2 è metabolizzata in modo simile alla Vitamina D3, entrambe queste vitamine contribuiscono allo stato complessivo di Vitamina D nell'organismo umano.

Questo è il motivo per cui è molto importante misurare ugualmente entrambe le forme di 25OH-Vitamina D per effettuare una corretta diagnosi di carenza, insufficienza o intossicazione da Vitamina D.

La carenza di Vitamina D è un importante fattore di rischio per rachitismo, osteomalacia, osteoporosi senile, cancro ed esiti sfavorevoli di una gravidanza.

La misurazione di entrambe le forme di 25OH-Vitamina D è indispensabile anche quando è necessario determinare la causa di un'anomala concentrazione sierica di calcio in un paziente.

È stato dimostrato che l'intossicazione da Vitamina D causa danni renali e tissutali.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA consiste in un saggio immuno-assorbente legato a enzima che si esegue su piastre da microtitolo. Nel corso di una prima fase di incubazione di 2 ore, a temperatura ambiente, la 25OH-Vitamina D totale (D_2 e D_3) presente nei calibratori, nei controlli e nei campioni viene dissociata dalle proteine cui è legata nel siero e viene fissata sui siti di legame di un anticorpo monoclonale specifico. Dopo una fase di lavaggio, una quantità fissa di 25OH-Vitamina D marcata con biotina in presenza di perossidasi di rafano (HRP) compete con la 25OH-Vitamina D_2 e con la 25OH-Vitamina D_3 non marcate presenti sui siti di legame dell'anticorpo monoclonale specifico. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la piastra da microtitolo viene lavata per fermare la reazione di competizione. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione per 30 minuti. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza, che è inversamente proporzionale alla concentrazione totale di 25OH-Vitamina D (D_2 e D_3).

Si costruisce poi una curva di calibrazione e si calcolano le concentrazioni totali delle 25OH Vitamine D (D_2 e D_3) mediante interpolazione della dose sulla curva di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Quantità	Volume di ricostituzione
 Piastra di microtitolazione (96 pozzetti fragili) con anticorpo monoclonale anti 25OH-Vitamina.D2 e D3	96 pozzetti	Pronte per l'uso
CAL 0 Calibratore 0: matrice biologica con gentamicina e proclina	1 flacone liofilizzati	Aggiungere 1 ml i acqua distillata
CAL N Calibratori 1-5 (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi) in siero di cavallo con gentamicina e proclina	5 flaconi liofilizzati	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
CONTROL N Controlli N. = 2, in siero umano con proclina	2 flaconi liofilizzati	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
INC BUF Tampone di incubazione con caseina e proclina	1 flacone 30 ml	Pronte per l'uso
CONJ CONC Coniugato concentrato di 25OH-Vitamina D	1 flacone 0,3 ml	Diluire 100 x con tampone coniugato
CONJ BUF Tampone coniugato con caseina e proclina	1 flacone 30 ml	Pronte per l'uso
HRP CONC HRP concentrata	1 flacone 0,2 ml	Diluire 200 x con tampone coniugato
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio (Tris – HCl)	1 flacone 10 ml	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CHROM TMB Soluzione CromogenaTMB (tetrametilbenzidina)	1 flacone 13 ml	Pronte per l'uso
STOP SOLN Soluzione di arresto: 0,2M H_2SO_4	1 flacone 13 ml	Pronte per l'uso

Nota:

Utilizzare il calibratore 0 per la diluizione di campioni con valori superiori al calibratore più alto. Non è disponibile alcun materiale di riferimento internazionale.

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit:

- Acqua distillata
- Pipette per dispensare 25 μ l, 250 μ l e 1 ml (si raccomanda l'uso di pipette accurate con puntali di plastica monouso).
- Agitatore tipo vortex
- Agitatore magnetico
- Agitatore per piastre (da 400 rpm)
- Lavatrice per piastra di microtitolazione
- Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm e 650 nm (lettura bicromatica)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore 0:** Ricostituire il calibratore 0 con 1 ml di acqua distillata.
- Calibratori 1 - 5:** Ricostituire i calibratori 1-5 con 1 ml di acqua distillata.
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.
- Soluzione di lavoro con coniugato HRP:**

I La soluzione di lavoro coniugata con perossidasi di rafano deve essere preparata nel corso dell'incubazione e almeno 1h 45 minuti prima dell'uso (cfr. X.B.5).

Preparare un volume adeguato di soluzione di lavoro coniugata con perossidasi di rafano mescolando i 3 reagenti nella seguente sequenza: (1) Tampone coniugato, (2) Coniugato concentrato, (3) Vortex, (4) Perossidasi di rafano concentrata, (5) Vortex.

L'ordine di inserimento di tali 3 reagenti è fondamentale e deve essere rigorosamente rispettato per ottenere Densità Ottiche riproducibili.

Preparare la soluzione secondo il numero di strisce utilizzate, come indicato nella tabella sottostante: per esempio per 6 strisce (48 pozzetti): 130 μ l di coniugato concentrato e 65 μ l di perossidasi di rafano concentrata a 13 ml di Tampone coniugato. Utilizzare un vortex per omogeneizzare.

Fino al momento dell'uso, conservare il coniugato di lavoro HRP a temperatura ambiente e al riparo dalla luce diretta o utilizzare un flaconcino di vetro scuro durante la sua preparazione.

La preparazione del coniugato di lavoro HRP non è stabile e se non viene utilizzata va scartata.

N. di strisce	Volume di tampone coniugato (ml)	Volume diconiugatoc concentrato (μ l)	Volume di HRP concentrata (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

- Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 199 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (200 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo la ricostituzione, i calibratori e i controlli sono stabili per 8 settimane a una temperatura compresa 2 e 8°C. Per periodi di conservazione più prolungati, vanno preparate aliquote che andranno conservate a -20°C per un massimo di 4 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.

- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Questo kit è adatto per campioni di siero e plasma eparinizzato.
- Conservare i campioni di siero e plasma eparinizzato a 2-8 °C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, **si raccomanda di conservare i campioni a -20 °C.**
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento
- Il siero e il plasma eparinizzato forniscono risultati simili. Y (plasma di eparina) = 0,9922 x (siero) + 0,2129 ng/ml, R² = 0,9944, n = 10

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.

Non mescolare reattivi di lotti diversi.

Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.

Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.

Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.

Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.

Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.

Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Stop Solution evitare pipette con parti metalliche.

L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.

Rispettare i tempi di incubazione.

Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione XIII, paragrafo E (Tempo Trascorso).

Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.

Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.

Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.

B. Metodo del dosaggio

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C
2. Incastrare le strisce nel supporto a cornice.
3. Pipettare 25 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Pipettare 250 µl di tamponi di incubazione in tutti i pozzetti.
5. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente, su un agitatore per piastre (da 400 rpm)
6. Preparare la soluzione di lavoro con coniugato HRP durante l'incubazione e almeno 1 ora e 45 minuti prima dell'uso.
7. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
8. Lavare la piastra 3 volte mediante:
 - erogazione di 0,35 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirazione del contenuto di ogni pozzetto
9. Pipettare 250 µl della soluzione di lavoro con coniugato HRP in ogni pozzetto. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente, su un agitatore per piastre (da 400 rpm)
10. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
11. Lavare la piastra 3 volte mediante:
 - erogazione di 0,35 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
 - aspirazione del contenuto di ogni pozzetto
12. Pipettare in ogni pozzetto 100 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
13. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a temperatura ambiente, su un agitatore per piastre (da 400 rpm) evitare la luce diretta del sole.
14. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
15. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro un'ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione XI.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento impostato su 650 nm (o 630 nm).

2. Calcolare la media delle determinazioni in duplice.
3. Si raccomanda l'utilizzo di metodi computerizzati per costruire la curva di taratura. Il metodo preferito si basa sull'adattamento della curva logistica a 4 parametri.
4. Per interpolazione dei valori di OD dei campioni, determinare le rispettive concentrazioni di 25OH-Vitamina D dalla curva di taratura.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

25OH-ELISA		Unità OD
Calibrator	0 ng/ml 3,44 ng/ml 16,28 ng/ml 32,39 ng/ml 63,54 ng/ml 122,76 ng/ml	2,79 2,56 1,93 1,20 0,49 0,16

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

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Limiti di rilevazione

Il LOB (Limite del bianco) è stato calcolato misurando più volte il bianco ed è stato calcolato come media - 1,65 deviazione standard della distribuzione dei valori del test. Il LOB è stato calcolato pari a 2,07 ng/ml. Il LOD (Limite di rilevazione) è stato calcolato come LOB - 1,65 deviazione standard di un campione a bassa concentrazione analizzato in 10 diversi run. Il LOD è stato calcolato pari a 3,26 ng/ml.

Il LOQ (Limite di quantificazione) è stato calcolato analizzando 5 campioni di valori bassi per 10 volte. Il LOQ è stato calcolato a 3,35 ng/ml.

B. Specificità

La reattività crociata nel saggio 25OH Vitamin D Total ELISA è stata valutata aumentando o non aumentando nei sieri il picco di concentrazione dei reagenti crociati. I risultati sono riassunti nella tabella riportata di seguito.

Composto e Concentrazione	Reazione crociata (%)
25OH-Vitamina D ₃ a 10 ng/mL	92
25OH-Vitamina D ₂ a 10 ng/mL	91
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₃ a 200 ng/mL	3,10
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₂ a 667 ng/mL	0,35
Vitamina D ₃ a 200 ng/mL	0,17
Vitamina D ₂ a 200 ng/mL	0,22
3-epi-25OH-Vitamina D ₃ a 20 µg/mL	0,91

È stato valutato l'effetto delle potenziali sostanze interferenti sui campioni utilizzando il test 25 OH Vitamin D Total ELISA di DIAsource. Sono stati testati diversi livelli di emoglobina, trigliceride, vitamina C, bilirubina coniugata e non coniugata nei campioni di siero su campioni con diverse concentrazioni di 25OH-vitamina D. Secondo i nostri criteri di accettazione, l'interferenza doveva essere minore del 10%. Le sostanze analizzate non avevano influenza sulle prestazioni del test 25 OH Vitamin D Total ELISA di DIAsource.

Sostanza	25OH-Vitamina D (ng/ml)	Concentrazione di interferente (mg/dl)	Variazione % media
Emoglobina	21,87	250	-3,7%
		500	
	37,36	250	
		500	
Bilirubina coniugata	21,87	50	2,5%
		100	
	37,36	50	
		100	
Bilirubina non	21,87	50	-0,2%

coniugata		100		-2,1%	
	37,36	50			
Trigliceride		100			
	21,87	6,25			
		125			
		250			
		500			
	37,36	6,25			
		125			
		250			
		500			
		1			
Vitamina C	21,87	10	2,9%		
		100			
		1			
	37,36	10			
		100			
Biotina	21,87	0,2	2,5%		
		2			
		4			
	37,36	0,2			
		2			
		4			

C. Precisione

La precisione del saggio è stata calcolata eseguendo l'analisi dei campioni per un periodo di almeno 20 giorni su 3 lotti diversi. I risultati sono riassunti nella tabella riportata di seguito.

INTRA-SAGGIO				INTER-SAGGIO			
Campione	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)	Campione	N	$\langle X \rangle \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	20,40 ± 0,69	3,4	A	10	12,62 ± 0,79	6,3
B	24	33,32 ± 0,96	2,9	B	10	20,99 ± 0,69	3,3

SD: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Riproducibilità

La riproducibilità del saggio è stata verificata analizzando tre campioni in doppio per cinque giorni, due volte al giorno, in tre laboratori con due tecnici per laboratorio. I risultati medi sono riassunti nella tabella riportata di seguito.

Campione	n	ng/ml	Intra-saggio	Inter-saggio	Inter-die	Inter-Tecnico	Inter-Laboratorio	Totale
1	57	25,5	SD	0,22	0,61	0,98	1,54	2,21
			CV	0,3%	0,9%	3,8%	6,0%	10,2%
2	57	52,9	SD	0,64	1,57	1,11	2,28	4,29
			CV	0,9%	2,3%	2,1%	4,3%	9,8%
3	57	124,9	SD	1,00	1,74	1,84	3,39	4,98
			CV	1,4%	2,5%	1,5%	2,7%	6,25

E. Accuratezza

Il recupero è stato analizzato aggiungendo diversi livelli di 25OH-vitamina D ai campioni. I risultati sono riassunti nella tabella riportata di seguito.

TEST DI RECUPERO		
25OH-Vit.D ₃ aggiunta (ng/ml)	Recupero (%)	
5	90	
10	92	
25	85	
50	71	
25OH-Vit.D ₂ aggiunta (ng/ml)	Recupero (%)	
5	88	
10	91	
25	88	
50	83	

PROVA DI DILUZIONE			
Diluizione del campione	Concentrazione teorica (ng/mL)	Concentrazione misurata (ng/mL)	Recupero (%)
1/1	-	65,20	-
1/2	32,60	29,34	90,0
1/4	16,30	15,01	92,1
1/8	8,15	8,91	109,3

I campioni sono stati diluiti con il calibratore zero.

L'intervallo lineare dell'analisi riscontrato è tra 8,91 ng/mL e 65,20 ng/mL.

F. Ritardo temporale

I risultati del test sul tempo trascorso tra l'erogazione dell'ultimo calibratore e quella del campione sono riportati nella tabella seguente.

TEMPO TRASCORSO			
	0 min (ng/ml)	10 min (ng/ml)	20 min (ng/ml)
campione 1	27,9	30,5	30,2
campione 2	49,5	47,5	49

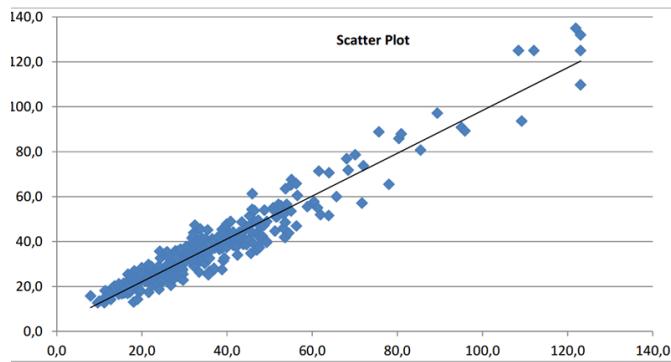
I risultati del saggio rimangono accurati anche quando il tampone di incubazione viene aggiunto 10 e 20 minuti dopo l'aggiunta del calibratore nei pozzetti rivestiti.

G. Limiti del test

- Il test va inteso come supporto alla diagnosi e va utilizzato insieme ad altri esiti clinici.
- Le prestazioni del presente saggio non sono state stabilite nella popolazione in età pediatrica.
- I campioni per i quali vi è il dubbio che siano caratterizzati da concentrazioni superiori al calibratore più elevato devono essere diluiti prima di eseguire l'analisi.
- Non utilizzare campioni emolizzati.

H. Confronto tra metodi

Le prestazioni del test DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA sono state verificate eseguendo uno studio di correlazione condotto in tre centri diversi analizzando in totale 356 campioni. I campioni sono stati analizzati sia mediante il test DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA sia mediante un test analogo disponibile in commercio. I risultati variavano da 8,0 ng/ml a 123,0 ng/ml, il coefficiente di correlazione tra i due metodi era pari a 0,917, l'intervallo di confidenza al 95% era 87,6% -93,6%, la pendenza di 0,954 e l'intercetta delle y di 3,05. Il grafico sotto riassume i risultati.



XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e quindi non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in doppio dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.
- Si raccomanda di saggiare i controlli con regolarità come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del saggio. La resa del saggio deve essere monitorata con tabelle di controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica verificare visivamente il modello di curva selezionato dal computer.

XV. VALORI ATTESI

È noto che l'apporto dietetico, la razza, la stagione e l'età influiscono sui normali livelli di 25OH-Vitamina D₃.

Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento in base alla propria popolazione locale.

La letteratura recente suggerisce i seguenti intervalli per la classificazione dello stato di 25-OH-Vitamina D:

Livello	ng/ml
Carente	<10
Insufficiente	10-29
Sufficiente	30-100
Potenziale tossicità	>100

Gli intervalli di riferimento sono stati stabiliti sulla base di 150 individui apparentemente sani. I campioni di siero dei singoli pazienti sono stati ottenuti da una fonte commerciale certificata e sono stati raccolti previo consenso informato presso un Centro di donatori autorizzato dall'ente statunitense FDA. 50 campioni provenivano dall'area settentrionale degli USA (Pennsylvania), 50 dall'area centrale (Tennessee) e 50 dall'area meridionale (Florida). I campioni sono stati prelevati durante i mesi invernali (gennaio - marzo) da donatori di età compresa tra 21 e 92 anni e di etnia di pelle sia chiara che scura. I donatori da cui sono stati prelevati i campioni non assumevano integratori di vitamina D, non presentavano anamnesi familiare per disturbi delle paratiroidi o malattie da alterato metabolismo del calcio, né per patologie di rene, fegato, paratiroidi o patologie correlate al calcio, non erano stati sottoposti a chirurgia bariatrica e non assumevano farmaci noti per influenzare l'assorbimento o il catabolismo della vitamina D. La seguente tabella riassume i risultati.

	Florida	Tennessee	Pennsylvania	Totale
Conc. massima (ng/ml)	88,6	71,4	54,6	88,6
Conc. minima (ng/ml)	6,1	4,9	5,9	4,9
Conc. mediana (ng/ml)	20,8	17,2	14,3	17,3

È stato utilizzato solo il 95% (2,5%—97,5%) dei risultati dei campioni provenienti dall'area.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto della cute con tutti i reagenti, la soluzione di arresto contiene H₂SO₄. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.

Non consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Usare indumenti protettivi e guanti monouso.

Per ulteriori informazioni, consultare l'MSDS.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 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.
- National Osteoporosis Foundation. Prevention – Vitamin D**
<http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitamind>
- EP17-A**
Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

CALIBRATORE µl	CAMPIONI CONTROLLI µl
Calibratore (0-5)	25
Campioni, Controlli	-
Tampone di incubazione	250
Incubare per 2 ore a temperatura ambiente sotto agitazione continua a 400 rpm. Preparare la soluzione di lavoro coniugata con perossidasi di rafano nel corso dell'incubazione e almeno 1h 45 minuti prima dell'uso. La sequenza di preparazione è fondamentale, cfr. VII. Preparazione del reagente. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 350 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.	
Soluzione di lavoro con coniugato HRP	250
Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione continua a 400 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 350 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.	
Soluzione cromogena	100
Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione continua a 400 rpm.	
Soluzione di arresto	100
Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione. Registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm).	

Numero di catalogo di DiSource :
KAP1971

Revisione numero:
220722

Data di revisione: 22/07/2022.



es

US: Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Leer el protocolo completo antes de usar.

25OH Vitamin D Total ELISA

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

A. Nombre: DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA Kit

B. Número de Catálogo: KAP1971: 96 test

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

Para cuestiones técnicas e información sobre pedidos contactar:

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

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

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

Los humanos producen vitamina D3 en forma natural cuando la piel está expuesta a los rayos ultravioleta del sol.

La vitamina D3 es metabolizada principalmente en el hígado produciendo 25-Hidroxivitamina D3 (25OH D3) que es la forma principal de vitamina D circulando en el organismo.

25OH D3 es la precursora para otros metabolitos de la vitamina D y tiene una actividad limitada por si sola.

El derivado más activo es la 1,25-hidroxivitamina D3, producida en el riñón (o placenta) por la 1-hidroxilación de 25OHD3.

La 25OH Vitamina D estimula la absorción intestinal del calcio y el fósforo y también la reabsorción y mineralización ósea.

La 25OH Vitamina D también puede estar activa en otros tejidos siendo responsable del transporte de calcio (placenta, riñón, glándula mamaria...) y glándula endocrina (glándula paratiroides, células beta...).

La Vitamina D3 y Vitamina D2 también están disponibles por ingestión a través de los alimentos o suplementos dietéticos.

Como la Vitamina D2 se metaboliza en forma similar a la Vitamina D3, ambas contribuyen al estado general de la Vitamina D de un individuo.

Por esta razón es muy importante medir ambos tipos de 25OH Vitamina D de la misma forma para un diagnóstico correcto de deficiencia, insuficiencia o intoxicación.

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

La medición de ambos tipos de 25OH Vitaminas D también es necesaria para determinar la causa de concentraciones anormales de calcio en el suero de pacientes. Se ha demostrado que la intoxicación con Vitamina D puede causar daño en el riñón y tejidos

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El ELISA 25OH Vitamina D Total de DIAsource es un ensayo competitivo de inmunoabsorción enzimática en fase sólida realizado en microplacas. Durante la primera fase de incubación de dos horas, a temperatura ambiente, la 25OH Vitamina D total (D_2 y D_3) presente en los calibradores, controles y muestras se disocia de las proteínas séricas y se fija en los sitios de unión de un anticuerpo monoclonal específico. Despues de un lavado, una cantidad fija de 25OH Vitamina D marcada con biotina en la presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP), compite con 25OH Vitamina D_2 y 25OH Vitamina D_3 no marcadas presentes en el sitio de unión del anticuerpo monoclonal específico. Despues de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lava la microplaca para parar la reacción de competencia. La solución cromogénica (TMB) es añadida e incubada durante 15 minutos. La reacción se para con la adición de la Solución de Parada y despues la microplaca se lee a la longitud de onda apropiada. La cantidad de recambio de sustrato es determinada de manera colorimétrica por la medición de la absorbancia, que es inversamente proporcional a la concentración total de 25OH Vitamina D (D_2 y D_3).

Se dibuja una curva de calibración y el total de las concentraciones de las 25OH Vitaminas D (D_2 y D_3) de las muestras se determinan por interpolación de dosis usando la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Reconstitución
WU Microplaca (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	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. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 25 μ l, 250 μ l y 1 ml (se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas plásticas)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de placas (400 rpm)

6. Lavador de microplacas

7. Lector de microplacas capaz de leer a 450 nm y 650 nm (lectura bicromática)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Calibrador 0:** Reconstituir Calibrador 0 con 1 ml de agua destilada.
- B. **Calibradores 1 - 5:** Reconstituir Calibradores 1-5 con 1 ml de agua destilada.

C. **Controles:** Reconstituir los controles con 1 ml de agua destilada.

D. **Solución de trabajo del conjugado HRP:**

La solución del conjugado de HRP de trabajo debe prepararse durante la incubación y al menos 1 hora y 45 minutos antes de su uso (véase 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 conjugado, 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 crucial 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 μ l de conjugado concentrado y 65 μ l de HRP concentrado para 13 ml de tampón conjugado.

Usar un agitador vortex para homogenizar.

Mantenga el conjugado HRP de trabajo a temperatura ambiente hasta su uso y evite la luz directa o utilice un envase de vidrio marrón para su preparación.

La preparación de trabajo del conjugado HRP es inestable y debe ser desechara si no se utiliza.

Nº de tiras	Volumen del tampón de conjugado (ml)	Volumen de conjugado concentrado (μ l)	Volumen de HRP Concentrado (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. Solución de lavado de trabajo: Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 199 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (200x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Este kit es adecuado para muestras de suero.
- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 horas, almacenar las muestras a -20°C.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE 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 (plasma heparinizado) = $0,9922x$ (suero) + $0,2129$ ng/ml, $R^2=0,9944$ n = 10

X. PROCEDIMIENTO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad.
No mezclar reactivos de diferente número de lote.
Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Mezclar concienzudamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente.
Preparar los calibradores, controles y muestras en duplicado. Se recomienda la alineación vertical.
Usar un envase plástico limpio para preparar la Solución de Lavado.
Con el fin de evitar cualquier contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
Al dispensar la Solución Cromogénica y la Solución de Parada, evitar usar pipetas con partes metálicas.
El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión.
Respetar los tiempos de incubación.
Para evitar deriva, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe estar limitado al tiempo mencionado en la sección XIII párrafo E (Demora en el tiempo).
Preparar la curva de calibración para cada ensayo, no utilizar los datos de ensayos previos.
Dispensar la Solución Cromogénica dentro de los 15 minutos posteriores al lavado de las microplacas.
Durante la incubación con Solución Cromogénica, evitar exponer las microplacas la luz solar directa.

B. Procedimiento

1. Seleccionar el número requerido de pocillos para el ensayo. Las tiras no utilizadas deben ser selladas en la bolsa con un desecante y guardadas a 2-8°C
2. Fijar las tiras en el marco de sostén.
3. Pipetear 25 µl de cada Calibrador, Control y Muestra diluida en el pocillo apropiado.
4. Pipetear 250 µl de Tampón de incubación en todos los pocillos.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, en un agitador de placas (400 rpm)
Prepare la solución de trabajo del conjugado HRP durante la incubación y al menos 1 hora 45 min. antes de su utilización.
6. Aspirar el líquido de cada pocillo.
7. Lavar la placa 3 veces:
 - dispensando 0,35 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - aspirando el contenido de cada pocillo
8. Pipetear 250 µl de solución de conjugado HRP de trabajo en cada pocillo.
Incubar la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente, en un agitador de placas (400 rpm)
9. Aspirar el líquido de cada pocillo.
10. Lavar la placa 3 veces:
 - dispensando 0,35 ml de solución de lavado en cada pocillo
 - aspirando el contenido de cada pocillo
11. Pipetear 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo dentro de los de 15 minutos después de la fase de lavado.
12. Incubar la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente, en un agitador de placas (400 rpm), evitar la luz solar directa.
13. Pipetear 100 µl del Reactivo de Parada en cada pocillo.
14. Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en menos de 1 hora y calcular los resultados como se ha descrito en la sección XI

XI. CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Leer la placa a 450 nm contra un filtro de referencia a 650 nm (o 630 nm).
2. Calcular la media de los duplicados.
3. Recomendamos la utilización de métodos asistidos por un ordenador para construir la curva de calibración. El método preferido es el ajuste de curva dado por la función logística de 4 parámetros. Eliminar los valores que son claramente atípicos
4. Determinar las concentraciones de 25OH Vitamina D por interpolación de los valores de DO de las muestras de la curva de calibración.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

	25OH-ELISA	unidades DO
Calibrator	0 ng/ml 3,44 ng/ml 16,28 ng/ml 32,39 ng/ml 63,54 ng/ml 122,76 ng/ml	2,79 2,56 1,93 1,20 0,49 0,16

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

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límites de la 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 2,07 ng/ml.
El LoD (límite de detección) se calculó como el LoB - 1,65 desviación estándar de una muestra de concentración baja evaluado en 10 análisis diferentes. Se calculó que el LoD era 3,26 ng/ml.
El LoQ (límite de cuantificación) se calculó analizando 5 muestras de valores bajos 10 veces. Se calculó que el LoQ era 3,35 ng/ml.

B. Especificidad

Se determinó la reactividad cruzada del ensayo 25OH Vitamin D Total ELISA, analizando sueros a los que se les añadieron reactantes que producen reacción cruzada y sueros sin estos reactantes. En la siguiente tabla están resumidos los resultados:

Compuesto y concentración	% Reacción cruzada
25OH-Vitamina D ₃ a 10 ng/mL	92
25OH-Vitamina D ₂ a 10 ng/mL	91
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₃ a 200 ng/mL	3,10
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₂ a 667 ng/mL	0,35
Vitamina D ₃ a 200 ng/mL	0,17
Vitamina D ₂ a 200 ng/mL	0,22
3-epi-25OH-Vitamina D ₃ a 20 µg/mL	0,91

Se evaluó el efecto de las sustancias que potencialmente pueden interferir, en muestras utilizando la prueba DiaSource 25 OH Vitamin D Total ELISA. Se analizaron diferentes cantidades de hemoglobina, triglicérido, vitamina C, bilirrubina conjugada y no conjugada en muestras de suero con diferentes concentraciones de 25OH Vitamina D. Nuestro criterio de aceptación fue una interferencia menor de 10%. Las sustancias analizadas no afectaron el rendimiento de la prueba DiaSource 25 OH Vitamin D Total ELISA.

Sustancia	25OH Vitamina D (ng/ml)	Concentración de la sustancia que interfiere (mg/dl)	Variación % promedio
Hemoglobina	21,87	250	-3,7%
		500	
	37,36	250	
		500	
Bilirrubina conjugada	21,87	50	2,5%
		100	
	37,36	50	
		100	
Bilirrubina no conjugada	21,87	50	-0,2%
		100	
	37,36	50	
		100	
Triglicérido	21,87	6,25	-2,1%
		125	
	37,36	250	
		500	
	21,87	6,25	
		125	
	37,36	250	
		500	
Vitamina C	21,87	1 10	2,9%

		100	
		1	
		10	
		100	
		0,2	
		2	
		4	
		0,2	
		2	
		4	
Biotina	37,36	2,5%	
	21,87		

Tiempo de espera

Los resultados del tiempo de espera entre dispensar el último calibrador y dispensar las muestras están en la siguiente tabla.

TIEMPO DE ESPERA			
	0 min (ng/ml)	10 min (ng/ml)	20 min (ng/ml)
Muestra 1	27,9	30,5	30,2
Muestra 2	49,5	47,5	49

C. Precisión

Se calculó la precisión del ensayo se analizando muestras por un periodo de al menos 20 días en tres lotes diferentes. El resumen de los resultados se encuentra en la siguiente tabla:

INTRA-ENSAYO				INTER-ENSAYO			
Muestra	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)	Muestra	N	$\bar{X} \pm SD$ (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	20,40 ± 0,69	3,4	A	10	12,62 ± 0,79	6,3
B	24	33,32 ± 0,96	2,9	B	10	20,99 ± 0,69	3,3
				C	10	33,22 ± 1,30	3,9
				D	10	70,25 ± 2,42	3,4

SD: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Reproducibilidad

La reproducibilidad del ensayo se realizó analizando tres muestras en duplicado durante cinco días, dos veces al día en tres centros con dos técnicos por centro. El resumen de los resultados promedio se presenta en la siguiente tabla:

Muestra	n	ng/ml	Dentro de la serie	Entre series	Entre días	Entre técnicos	Entre centros	Total
1	57	25,5	SD 0,22 CV 0,3%	0,61 0,9%	0,98 3,8%	1,54 6,0%	2,21 8,7%	2,59 10,2%
2	57	52,9	SD 0,64 CV 0,9%	1,57 2,3%	1,11 2,1%	2,28 4,3%	4,29 8,1%	5,19 9,8%
3	57	124,9	SD 1,00 CV 1,4%	1,74 2,5%	1,84 1,5%	3,39 2,7%	4,98 4,0%	6,25 5,0%

E. Exactitud

Se evaluó la recuperación añadiendo cantidades diferentes de 25OH Vitamina D a las muestras. Un resumen de los resultados se encuentra en la siguiente tabla:

TEST DE RECUPERACIÓN	
25OH-Vit.D ₃ añadido (ng/ml)	Recuperado (%)
5	90
10	92
25	85
50	71

25OH-Vit.D ₂ añadido (ng/ml)	Recuperado (%)
5	88
10	91
25	88
50	83

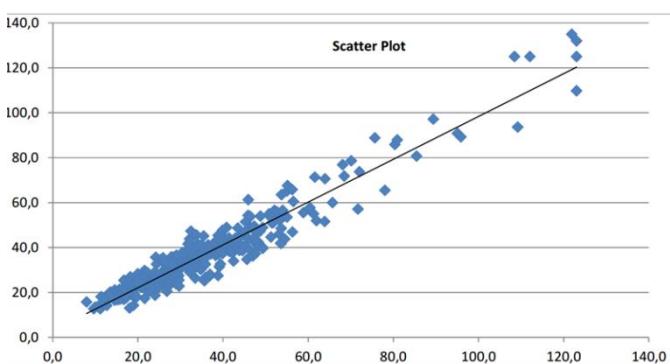
Los resultados del ensayo continúan siendo exactos aun cuando el tampón de incubación se dispensa 10 y 2 minutos después de que se ha añadido el calibrador en los pocillos recubiertos.

F. Limitaciones de la prueba

1. La prueba es una ayuda para el diagnóstico y debe utilizarse en conjunto con hallazgos clínicos.
2. El rendimiento de este ensayo no ha sido establecido en la población pediátrica.
3. Cuando se sospecha que una muestra pueda tener una concentración superior al calibrador más concentrado, esta se debe analizar diluida.
4. No se deben utilizar muestras hemolizadas.

G. Comparación de métodos

El rendimiento de la prueba 25OH Vitamin D Total ELISA de DIAsource se determinó haciendo un estudio correlativo en tres centros diferentes utilizando un total de 356 muestras. Las muestras se analizaron con 25OH Vitamin D Total ELISA de DIAsource y con una prueba 25OH Vitamin D ELISA disponible en el comercio. Los resultados variaron entre 8,0 ng/ml a 123,0 ng/ml, el coeficiente de correlación entre los dos métodos fue de 0,917, con el 95% de intervalo de confianza de 87,6% a 93,6%, una pendiente de 0,954 y el corte con el eje y en 3,05. El siguiente gráfico resume los resultados:



XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, cada laboratorio puede preparar sus propios grupos de muestras de control, las que deben almacenarse en alícuotas congeladas. Los controles que contienen azida interfieren con la reacción enzimática y no pueden ser utilizados.
- Los criterios de aceptación de las diferencias entre los resultados de los duplicados de las muestras deben depender de las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- Recomendamos que los controles sean incluidos rutinariamente en los ensayos como muestras desconocidas para medir la variabilidad del ensayo. El funcionamiento del ensayo debe ser controlado con gráficos de control de calidad de los controles.
- Recomendamos un control visual de la curva seleccionada por el ordenador.

PRUEBA DE DILUCIÓN			
Dilución de la muestra	Concentración teórica (ng/ml)	Concentración medida (ng/ml)	Recuperación (%)
1/1	-	65,20	-
1/2	32,60	29,34	90,0
1/4	16,30	15,01	92,1
1/8	8,15	8,91	109,3

Las muestras se diluyeron con el calibrador cero.

El intervalo lineal del ensayo fue de 8,91 ng/ml a 65,20 ng/ml.

XV. VALORES ESPERADOS

La alimentación, la raza, la estación y la edad pueden influenciar los niveles normales de 25OH.Vit.D3. Cada laboratorio debe establecer su propio rango basado en su población local.

Literatura reciente ha sugerido los siguientes rangos para la clasificación del estado de la 25 OH Vitamina D:

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

Los rangos de referencia se han establecido basándose en 150 individuos aparentemente sanos. Las muestras individuales de suero de pacientes utilizadas se obtuvieron de una fuente comercial autorizada y se recogidas de un FDA Licensed Donor Center con consentimiento informado. 50 muestras provenían del norte de los EE.UU. (Pennsylvania), 50 muestras provenían del centro de los EE.UU. (Tennessee) y 50 muestras del sur de los EE.UU. (Florida). Las muestras se tomaron durante los meses de invierno (enero - marzo), entre las edades de 21 a 92 años de edad incluyendo poblaciones de piel clara y oscura. Los donantes no estaban tomando suplementos de vitamina D, no tenían antecedentes familiares de enfermedad a la paratiroides o de regulación del calcio ni antecedentes de enfermedades renales, hepáticas, a la paratiroides o relacionada con el calcio o cirugía bariátrica y no estaban tomando ningún medicamento que son conocidos por afectar la absorción o el catabolismo de la vitamina D. Los resultados están en la siguiente tabla:

	Florida	Tennessee	Pennsylvania	Total
Concentración más alta (ng/ml)	88,6	71,4	54,6	88,6
Concentración más baja (ng/ml)	6,1	4,9	5,9	4,9
Concentración mediana (ng/ml)	20,8	17,2	14,3	17,3

Se utilizó solo el 95% (2,5% - 97,5%) central de los resultados observados.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo para HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo substancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.

Evitar contacto de la piel con todos los reactivos, la Solución de Parada contiene H₂SO₄. En caso de contacto, lavar con abundante agua.

No fumar, beber, comer o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetejar con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

Para obtener más información, consulte la MSDS.

XVII. BIBLIOGRAFIA

- 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.
- National Osteoporosis Foundation. Prevention – Vitamin D**
<http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitamind>
- EP17-A**
Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CALIBRADORES (μl)	MUESTRA(S) CONTROL(ES) (μl)
Calibradores (0-5)	25	-
Muestras, controles	-	25
Tampón de incubación	250	250
Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente agitando continuamente a 400 rpm. Prepare el conjugado de HRP de trabajo durante la incubación y al menos 1 hora y 45 minutos antes de su uso. La secuencia de preparación es crucial, véase VII. Preparación de los reactivos. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 350 μl de la Solución de Lavado y aspirar.		
Trabajo del conjugado HRP	250	250
Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente agitando continuamente a 400 rpm. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 350 μl de la Solución de Lavado y aspirar.		
Solución Cromogénica	100	100
Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente agitando continuamente a 400 rpm.		
Solución de Parada	100	100
Leer con un lector de microplacas. Registrar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (contra 630 o 650 nm).		

DIAsource Catalogo Nr : KAP1971	Revisión nr : 220722
------------------------------------	-------------------------

Fecha de la revisión: 22/07/2022



el

US :Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

25OH Vitamin D Total ELISA

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ανοσοενζυμομετρικός προσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της 25-υδροξυβιταμίνης D2 και D3 (25OH-D2 και 25OH-D3) στον ορό α πλάσμα αίματος

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: DIAsource 25OH Vitamin D Total ELISA Kit
- B. Αριθμός καταλόγου: KAP1971: 96 εξετάσεις
- C. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Βέλγιο.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.:+32 (0)10 84 99 11 Φαξ:+32 (0)10 84 99 90

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

Βιταμίνη D είναι η κοινή ονομασία για την βιταμίνη D2 ή εργοκαλσιφερόλη και τη βιταμίνη D3 ή χοληκαλσιφερόλη. Ο ανθρώπινος οργανισμός παράγει φυσιολογικά βιταμίνη D3 όταν το δέρμα εκτίθεται σε υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία.

Η βιταμίνη D3 μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ σε 25-υδροξυβιταμίνη D3 (25OH D3), που αποτελεί την κύρια κυκλοφορούσα μορφή βιταμίνης D στο σώμα.

Η 25OH D3 αποτελεί πρόδρομη ουσία για άλλους μεταβολίτες βιταμίνης D και διαθέτει επίσης περιορισμένη ενεργότητα.

Το πιο δραστικό παράγωγο είναι η 1,25-υδροξυβιταμίνη D3, η οποία παράγεται στους νεφρούς (ή τον πλακούντα) μέσω

1-υδροξυλίωσης της 25OH D3.

Η 25OH-βιταμίνη D διεγέρει την εντερική απορρόφηση τόσο του ασβεστίου όσο και του φωσφόρου αλλά και την οστική απορρόφηση και την εναπόθεση αλάτων σε αυτά.

Η 25OH βιταμίνη D ενδεχομένως είναι επίσης ενεργή σε άλλους ιστούς που είναι επιφορτισμένοι με την μεταφορά του ασβεστίου (πλακούντας, νεφροί, μαζικοί αδένες...) και ενδοκρινείς αδένες (παραθυρεοειδείς αδένες, κύτταρα β...).

Η βιταμίνη D3 και η βιταμίνη D2 είναι επίσης διαθέσιμες μέσω πρόσληψης με την τροφή ή διατροφικών συμπληρωμάτων. Η βιταμίνη D2 μεταβολίζεται με παρόμοιο τρόπο όπως η βιταμίνη D3 και επομένως και οι δύο συνεισφέρουν στα επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό.

Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο είναι ιδιαίτερα σημαντική η μέτρηση και των δύο μορφών της 25OH βιταμίνης D για την ορθή διάγνωση της έλλειψης, ανεπάρκειας ή τοξίνωσης από βιταμίνη D.

Η έλλειψη βιταμίνης D αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τη ραχίτιδα, την οστεομαλακία, την οστεοπόρωση του γήρατος, τον καρκίνο και την έκβαση της κύνησης.

Η μέτρηση και των δύο μορφών της 25OH βιταμίνης D απαιτείται επίσης για τον καθορισμό της αιτίας παθολογικών συγκεντρώσεων ασβεστίου στον ορό ασθενών.

Έχει φανεί πως η τοξίνωση από βιταμίνη D οδηγεί σε νεφρικές και ιστικές βλάβες.

.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο προσδιορισμός 25OH Vitamin D Total ELISA της DiaSource είναι ένας ενζυμικός ανοσοπροσροφητικός προσδιορισμός στερέας φάσης, εκτελουμένος σε πλάκες μικροτιτλοδότησης. Κατά τη διάρκεια του αρχικού βήματος επώασης 2 ωρών, σε θερμοκρασία δωματίου, η ολική 25OH βιταμίνη D (D_2 και D_3) που υπάρχει στους βαθμονομητές, τους ορούς ελέγχου και τα δείγματα αποσυνδέεται από τις πρωτεΐνες πρόσδεσης στον ορό για να καθηλωθεί σε θέσεις πρόσδεσης ενός συγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος. Μετά από 1 βήμα πλύσης, μία σταθερή ποσότητα 25OH βιταμίνης D-σημασμένης με βιοτίνη σε παρουσία ράφανηδικής υπεροξειδάσης (HRP), ανταγωνίζεται με μη σημασμένη 25OH βιταμίνη D_2 και 25OH βιταμίνη D_3 που υπάρχουν στις θέσεις πρόσδεσης του συγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος. Μετά από επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, η πλάκα μικροτιτλοδότησης υποβάλλεται σε πλύση για την ανάσχεση της αντίδρασης ανταγωνισμού. Προστίθεται το Χρωμογόνο διάλυμα (TMB) και ακολουθεί επώαση 15 λεπτών. Η αντίδραση σταματά με την προσθήκη Ανασχετικού διαλύματος. Ακολουθεί ανάγνωση της πλάκας μικροτιτλοδότησης στο κατάλληλο μήκος. Η ποσότητα μετατροπής του υποστρώματος προσδιορίζεται χρωματομετρικά, με μέτρηση της απορρόφησης, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη της συνολικής συγκέντρωσης 25OH βιταμίνης D (D_2 και D_3). Αποτυπώνεται μία καμπύλη βαθμονόμησης και οι συνολικές συγκεντρώσεις 25OH βιταμίνης D (D_2 και D_3) των δειγμάτων προσδιορίζονται μέσω παρεμβολής τιμών από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Ποσότητα	Ανασύσταση
ΠΛ Πλάκα μικροτιτλοδότησης (96 αποστρώμενες υπόδοσες) με αντί 25OH βιτ. D_2 και D_3 (μονοκλωνικά αντισώματα)	96 υποδοχές	Έτοιμο για χρήση
CAL 0 Βαθμονομητής 0 βιολογική μήτρα με γενταμακίνη και προκλίνη	1 φιαλίδιο λυοφιλ.	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
CAL N Βαθμονομητής 1 - 5 σε ορό αλόγου με γενταμακίνη και προκλίνη	5 φιαλίδια λυοφιλ.	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
CONTROL N Ορός ελέγχου $N = 2$ (δείτε τις ακριβείς τιμές στις επικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό με προκλίνη	2 φιαλίδια λυοφιλ.	Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού
INC BUF Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης με καζέΐνη και προκλίνη	1 φιαλίδιο 30 ml	Έτοιμο για χρήση
CONJ CONC Συμπτυκνωμένο σύζευγμα 25OH βιτ. D	1 φιαλίδιο 0,3 ml	Αραιώστε 100 x με ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CONJ BUF Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος με καζέΐνη και προκλίνη	1 φιαλίδιο 30 ml	Έτοιμο για χρήση
HRP CONC Συμπτυκνωμένο HRP	1 φιαλίδιο 0,2 ml	Αραιώστε 200 x με ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (Tris – HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	Αραιώστε 200 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CHROM TMB Χρωμογόνος TMB (τετραμεθυλβενζίνη)	1 φιαλίδιο 13 ml	Έτοιμο για χρήση
STOP SOLN Ανασχετικό αντιδραστήριο 0,2M H_2SO_4 H	1 φιαλίδιο 13 ml	Έτοιμο για χρήση

Σημείωση:

Χρησιμοποιήστε τον βαθμονομητή 0 για την αραίωση δειγμάτων με τιμές πάνω από τον υψηλότερο βαθμονομητή.
Δεν υπάρχει διαθέσιμο διεθνές υλικό αναφοράς.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο kit:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 25 μl, 250 μl και 1ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Αναμείκητη στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Ανακινητήρας πλάκας (400 σ.α.λ.)
- Συσκευή πλύσης για πλάκες μικροτιτλοδότησης
- Συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιτλοδότησης με δυνατότητα ανάγνωσης στα 450 nm και 650 nm (διχρωματική ανάγνωση)

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητής 0:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητής 0 με 1 ml απεσταγμένο νερού.
- Βαθμονομητές 1 - 5:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές 1-5 με 1 ml απεσταγμένο νερού.
- Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 1 ml απεσταγμένο νερού.
- Διάλυμα εργασίας συζεύγματος HRP:**
! Το διάλυμα εργασίας συζεύγματος υπεροξειδάσης χρέουν πρέπει να προετοιμαστεί κατά τη διάρκεια της επώασης και του λάχιστο μία ώρα και 45 λεπτά πριν από τη χρήση του (βλ. X.B.5).

Προετοιμάστε έναν επαρκή όγκο από διάλυμα εργασίας συζεύγματος υπεροξειδάσης χρέουν αναμειγνύοντας τα 3 αντιδραστήρια με την εξής σειρά: (1) Ρυθμιστικό Διάλυμα Συζεύγματος, (2) Συμπτυκνωμένο Σύζευγμα, (3) Οργανικός Διαλύτης Vortex, (4) Συμπτυκνωμένη Υπεροξειδάση Χρέουν, (5) Οργανικός Διαλύτης Vortex.

Η σειρά προσθήκης αυτών των 3 αντιδραστηρίων είναι κρίσιμη και πρέπει να τηρείται αυστηρά για να αποκτηθούν Οπτικές Πυκνότητες με δυνατότητα αναπαραγωγής.

Προετοιμάστε το διάλυμα σύμφωνα με τον αριθμό χρησιμοποιημένων λωρίδων, όπως σημειώνεται στον παρακάτω πίνακα: για παραδειγμα για 6 λωρίδες (48 πηγάδια): 130 μl από συμπτυκνωμένο σύζευγμα and 65 μl από συμπτυκνωμένη υπεροξειδάση χρέουν προς 13 ml από ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος.

Χρησιμοποιήστε αναμείκητη στροβιλισμού (τύπου vortex) για να ομογενοποιήσετε.

Διατηρήστε το σύζευγμα HRP εργασίας σε θερμοκρασία δωματίου και αποφύγετε το άμεσο ηλιακό φως ή χρησιμοποιήστε φιαλίδιο καφέ γιασιλού σε παραδειγμα για 6 λωρίδες (48 πηγάδια): 130 μl από συμπτυκνωμένο σύζευγμα and 65 μl από συμπτυκνωμένη υπεροξειδάση χρέουν προς 13 ml από ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος.

Το παρασκεύασμα του συζεύγματος HRP εργασίας δεν είναι σταθερό και πρέπει να απορριφθεί εάν δεν χρησιμοποιηθεί.

Αρ. ταινιών	Όγκος ρυθμιστικού διαλύματος συζεύγματος (ml)	Όγκος συμπτυκνωμένο u συζεύγματος (μl)	Όγκος συμπτυκνωμένου 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

- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 199 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (200x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Μετά την ανασύσταση, οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι σταθεροί για οκτώ εβδομάδες στους 2 έως 8°C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα και να διατηρούνται στους -20°C για έως και 4 μήνες το ανώτερο. Αποφύγετε τους επανειλημένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Αυτό το κιτ είναι κατάλληλο για δείγματα ορού και ηπαρινισμένου πλάσματος.
- Τα δείγματα ορού a plasma πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C. Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, **συνιστάται η φύλαξη στους -20°C.**
- Αποφύγετε τους επανειλημένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης. Ο ορός και το ηπαρινισμένο πλάσμα παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα. $Y = 0,9922 \times (ορός) + 0,2129 \text{ ng/ml}$, $R^2 = 0,9944$, $n = 10$

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Σημείωσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης.

Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ.

Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.

Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση.

Εκτελέστε εις διπλούν ανάληψη των βαθμονομητών, των ορών ελέγχου και των δειγμάτων. Συνιστάται κάθετη ευθυγράμμιση.

Χρησιμοποιήστε ένα καθαρό, πλαστικό δοχείο για να ετοιμάσετε το διάλυμα πλύσης.

Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση.

Αποφύγετε πιπέτες με μεταλλικά μέρη για τη διανομή του Χρωμογόνου Διαλύματος και του Ανασχετικού Διαλύματος.

Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες.

Τηρείτε τους χρόνους επώασης.

Για να αποφύγετε τη μετατόπιση, ο χρόνος μεταξύ της διανομής με πιπέτα του πρώτου βαθμονομητή και του τελευταίου δείγματος πρέπει να περιορίζεται στο χρόνο που αναφέρεται στην ενότητα XIII, παράγραφο Ε (μεσοδιάστημα).

Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

Διανείμετε το Χρωμογόνο Διάλυμα εντός 15 λεπτών από την πλύση της πλάκας μικροτιτλοδότησης.

Κατά τη διάρκεια επώασης με το Χρωμογόνο Διάλυμα, αποφύγετε την έκθεση της πλάκας μικροτιτλοδότησης σε άμεσο ηλιακό φως.

B. Διαδικασία

1. Επιταχύνετε τον απαιτούμενο αριθμό ταινιών για την εκτέλεση. Οι μη χρησιμοποιημένες ταινίες θα πρέπει να σφραγίστονται και πάλι στο σακουλάκι μαζί με αποξηραντικό και να φυλαχθούν στους 2-8°C.
2. Στερεώστε τις ταινίες στο πλαίσιο στήριξης.
3. Διανείμετε με πιπέτα 50 μl από κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα στις κατάλληλες υποδοχές.
4. Διανείμετε με πιπέτα 150 μl του Ρυθμιστικού διαλύματος επώασης σε κάθε υποδοχή.
5. Επιώάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, επάνω σε ανακίνητρά πλάκας (400 σ.α.λ.)
Προετοιμάστε το διάλυμα εργασίας συζεύγματος HRP κατά την επώαση και τουλάχιστον 1 ώρα και 45 λεπτά πριν από τη χρήση του.
6. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
7. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,35 ml Διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
8. Διανείμετε με πιπέτα 200 μl του διαλύματος εργασίας συζεύγματος HRP σε κάθε υποδοχή. Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία

δωματίου, επάνω σε ανακίνητρά πλάκας (400 σ.α.λ.)

9. Αναρροφήστε το υγρό από κάθε υποδοχή.
10. Πλύνετε την πλάκα 3 φορές:
 - διανέμοντας 0,35 ml Διαλύματος πλύσης σε κάθε υποδοχή
 - αναρροφώντας το περιεχόμενο κάθε υποδοχής
11. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl του χρωμογόνου διαλύματος σε κάθε υποδοχή, εντός 15 λεπτών από τη βήμα πλύσης.
12. Επωάστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, επάνω σε ανακίνητρά πλάκας (400 σ.α.λ.), αποφύγετε την άμεση έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία.
13. Διανείμετε με πιπέτα 100 μl ανασχετικού διαλύματος σε κάθε υποδοχή.
14. Κάντε ανάγνωση των απορροφήσεων στα 450 nm (φίλτρο αναφοράς 630 nm ή 650 nm) εντός 1 ώρας και υπολογίστε τα αποτελέσματα όπως περιγράφεται στην ενότητα XI.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Κάντε ανάγνωση της πλάκας στα 450 nm έναντι ενός φίλτρου αναφοράς που ρυθμίζεται στα 650 nm (ή τα 630 nm).
2. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
3. Συνιστούμε τη χρήση μεθόδου με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης. Η προτιμώμενη μέθοδος είναι η προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων. Απορρίψτε τις εμφανείς τιμές εκτός εύρους.
4. Με παρεμβολή των τιμών οπτικής πυκνότητας των δειγμάτων (OD), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις της 25OH βιταμίνης D των δειγμάτων από την καμπύλη αναφοράς.

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

25OH-ELISA		Mονάδες OD
Calibrator	0 ng/ml 3,44 ng/ml 16,28 ng/ml 32,39 ng/ml 63,54 ng/ml 122,76 ng/ml	2,79 2,56 1,93 1,20 0,49 0,16

Σημείωση: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όρια Ανίχνευσης

Το LOB (Limit of blank) υπολογίστηκε με τη μέτρηση του τυφλού αρκετές φορές και υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος - 1,65 τυπική απόκλιση της κατανομής των τιμών της δοκιμής. Το LOB υπολογίστηκε σε 2,07 ng/ml. Το LOD (Όριο ανίχνευσης) υπολογίστηκε ως το LOB - 1,65 τυπική απόκλιση ενός δείγματος χαμηλής συγκέντρωσης που εξετάστηκε σε 10 διαφορετικές εκτελέσεις. Το LOD υπολογίστηκε σε 3,26 ng/ml. Το LOQ (Όριο ποσοτικού προσδιορισμού) υπολογίστηκε με τη δοκιμή 5 δειγμάτων χαμηλών τιμών, 10 φορές. Το LOQ υπολογίστηκε σε 3,35 ng/ml.

B. Ειδικότητα

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του προσδιορισμού 25OH VitaminD Total ELISA καθορίστηκε μέσω εξέτασης ορών, με και χωρίς εμβολιασμό ουσών διασταυρούμενης αντιδρασης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ουσία και συγκέντρωση	% Διαστ. αντίδραση
25OH-βιταμίνη D ₃ στα 10 ng/ml	92
25OH-βιταμίνη D ₂ στα 10 ng/ml	91
1,25(OH) ₂ -βιταμίνη D ₃ στα 200 ng/ml	3,10
1,25(OH) ₂ -βιταμίνη D ₂ στα 667 ng/ml	0,35
Βιταμίνη D ₃ στα 200 ng/ml	0,17
Βιταμίνη D ₂ στα 200 ng/ml	0,22
3-επι-25OH-βιταμίνη D ₃ στα 20 μg/ml	0,91

Αξιολογήθηκε η επίδραση δυνητικά παρεμβαλλόμενων ουσιών σε δείγματα με χρήση του προσδιορισμού 25 OH Vitamin D Total ELISA της DiaSource. Εξετάστηκαν διαφορετικά επίπεδα Αιμοσφαιρίνης, Τριγλυκερίδιων, Βιταμίνης C, συζευγμένης και μη συζευγμένης χολερυθρίνης σε δείγματα ορού με διαφορετικές συγκεντρώσεις 25OH βιταμίνης D. Τα κριτήρια αποδοχής μας ήταν παρεμβολή κάτω από 10%. Οι ουσίες που εξετάστηκαν δεν επηρέασαν την απόδοση της εξέτασης DiaSource 25 OH VitaminD Total ELISA.

Ουσία	25OH βιταμίνη D (ng/ml)	Συγκέντρωση παρεμβαλλόμενης ουσίας (mg/dl)	Μέση % διακύμανση
Αιμοσφαιρίνη	21,87	250	-3,7%
		500	
	37,36	250	
		500	
Συζευγμένη χολερυθρίνη	21,87	50	2,5%
		100	
	37,36	50	
		100	
Μη συζευγμένη χολερυθρίνη	21,87	50	-0,2%
		100	
	37,36	50	
		100	
Τριγλυκερίδια	21,87	6,25	-2,1%
		125	
		250	
		500	
	37,36	6,25	
		125	
		250	
		500	
Βιταμίνη C	21,87	1	2,9%
		10	
		100	
	37,36	1	
Βιοτίνη		10	2,5%
		100	
		1	
	37,36	10	
		100	
		0,2	
	21,87	2	
		4	
		0,2	
	37,36	2	
		4	

C. Ακρίβεια

Η ακρίβεια του προσδιορισμού υπολογίστηκε με την ανάλυση δειγμάτων σε διάστημα τουλάχιστον 20 ημερών σε 3 διαφορετικές παρτίδες. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ			ΜΕΤΑΞΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ				
Δείγμα	N	Δείγμα	N	Δείγμα	N		
A	24	20,40 ± 0,69	3,4	A	10	12,62 ± 0,79	6,3
B	24	33,32 ± 0,96	2,9	B	10	20,99 ± 0,69	3,3
				C	10	33,22 ± 1,30	3,9
				D	10	70,25 ± 2,42	3,4

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

D. Αναπαραγωγιμότητα

Η αναπαραγωγιμότητα του προσδιορισμού ελέγχθηκε με την εξέταση τριών δειγμάτων εις διπλούν, για πέντε ημέρες, δις ημεροσίως, σε τρεις τοποθεσίες με δύο τεχνολόγους ανά τοποθεσία. Οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Δείγμα	n	ng/ml	Έντος ανάλυσης	Μεταξύ αναλύσεων	Μεταξύ ημερών	Μεταξύ τεχνολόγων	Μεταξύ τοποθεσιών	Σύνολο
1	57	25,5	SD 0,22	0,61	0,98	1,54	2,21	2,59
			CV 0,3%	0,9%	3,8%	6,0%	8,7%	10,2%
2	57	52,9	SD 0,64	1,57	1,11	2,28	4,29	5,19
			CV 0,9%	2,3%	2,1%	4,3%	8,1%	9,8%
3	57	124,9	SD 1,00	1,74	1,84	3,39	4,98	6,25
			CV 1,4%	2,5%	1,5%	2,7%	4,0%	5,0%

E. Ορθότητα

Η ανάκτηση αξιολογήθηκε με την προσθήκη διαφορετικών επιπτέδων 25OHβιταμίνηςD σε δείγματα. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ	
Προστεθείσα 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Ανάκτηση(%)
5	90
10	92
25	85
50	71

Προστεθείσα 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	
Ανάκτηση(%)	
5	88
10	91
25	88
50	83

ΔΟΚΙΜΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ:			
Αραίωση δείγματος	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/mL)	Μετρημένη συγκέντρωση (ng/mL)	Ανάκτηση (%)
1/1	-	65,20	-
1/2	32,60	29,34	90,0
1/4	16,30	15,01	92,1
1/8	8,15	8,91	109,3

Τα δείγματα αραίωθηκαν με το μηδενικό βαθμονομητή

Το γραμμικό εύρος της δοκιμασίας βρέθηκε ότι είναι 8,91 ng/mL έως 65,20 ng/mL.

F. Χρονική καθυστέρηση

Τα αποτελέσματα εξέτασης χρονικής καθυστέρησης μεταξύ του τελευταίου βαθμονομητή και της διανομής δείγματος παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ			
	0λεπτά(ng/ml)	10λεπτά(ng/ml)	20λεπτά (ng/ml)
δείγμα 1	27,9	30,5	30,2
δείγμα 2	49,5	47,5	49

Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ακριβή ακόμη και όταν διανέμεται ρυθμιστικό διάλυμα επώασης 10 και 20 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στις επιστρωμένες υποδοχές.

G. Περιορισμοί της εξέτασης

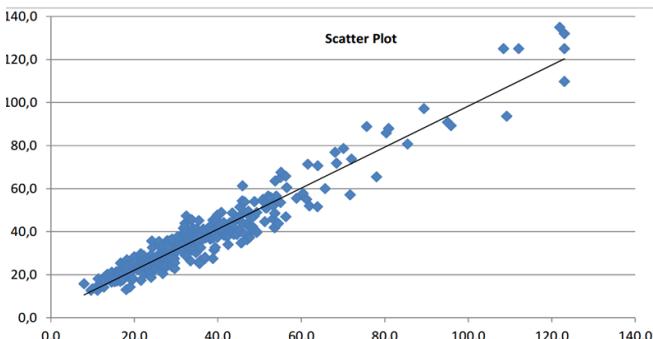
- Αυτή η εξέταση προορίζεται για βοήθεια στη διάγνωση και πρέπει να χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τα κλινικά ευρήματα.
- Η απόδοση αυτού του προσδιορισμού δεν έχει επιβεβαιωθεί στον παιδιατρικό πληθυσμό.
- Τα δείγματα που πιθανολογείται ότι περιέχουν συγκεντρώσεις πάνω από τον υψηλότερο βαθμονομητή θα πρέπει να υποβάλλονται σε προσδιορισμό σε αραίωση.
- Δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα με αιμόλυση.

H. Σύγκριση μεθόδων

Η απόδοση της εξέτασης DiaSource 25 OH Vitamin D Total ELISA

Υψηλότερη συγκ. (ng/ml)	Φλόριντα	Τεννεσί	Πενσυλβανία	Σύνολο
6,1	88,6	71,4	54,6	88,6
20,8	4,9	5,9	4,9	4,9
20,8	17,2	14,3	17,3	17,3

προσδιορίστηκε με διεξαγωγή μιας μελέτης συσχέτισης σε τρία διαφορετικά κέντρα με χρήση ενός συνόλου 356 δειγμάτων. Τα δείγματα εξετάστηκαν τόσο με την εξέταση DiaSource 25OH Vitamin D Total ELISA όσο και με μια διαθέσιμη στο εμπόριο εξέταση 25OH βιταμίνης D ELISA. Τα αποτελέσματα κυμαίνονταν από 8,0 ng/ml έως 123,0 ng/ml, ο συντελεστής συσχέτισης μεταξύ των δύο μεθόδων ήταν 0,917, με το διάστημα εμπιστοσύνης 95% σε 87,6% έως 93,6%, μια κλίση 0,954 και σημείο τομής για 3,05. Το παρακάτω γράφημα συνοψίζει τα αποτελέσματα:



XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην επικέτα του φιαλίδιου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήστης. Οροί ελέγχου που περιέχουν αζίδιο θα επιδράσουν στην ενζυμική αντίδραση και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.
- Συνιστάται οι οροί ελέγχου να υποβάλλονται σε προσδιορισμό τακτικά ως άγνωστα δείγματα για να μετράται η μεταβλητότητα του προσδιορισμού. Η απόδοση του προσδιορισμού πρέπει να παρακολουθείται με διαγράμματα ποιοτικού ελέγχου των ορών ελέγχου.
- Είναι καλό το να ελέγχετε οπτικά την προσαρμογή της καμπύλης του επιλέχθηκε από τον υπολογιστή.

XV. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Η διατροφή, η φυλή, η εποχή και η ηλικία είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα φυσιολογικά επίπεδα της 25OH.Vit.D₃. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώνει το δικό του εύρος με βάση τον εκάστοτε τοπικό πληθυσμό.

Η πρόσφατη βιβλιογραφία συνιστά τα ακόλουθα εύρη για την ταξινόμηση της κατάστασης της 25 OH βιταμίνης D:

Επίπεδο	ng/ml
Έλλειψη	<10
Ανεπαρκής	10-29
Επαρκής	30-100
Δυνητική τοξικότητα	>100

Τα εύρη αναφοράς έχουν τεκμηριωθεί με βάση 150 φαινομενικά υγιή άτομα. Τα δείγματα ορού των εκάστοτε ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν, λήφθηκαν από πιστοποιημένη εμπορική πηγή και συλλέχθηκαν από αδειοδοτημένο από τον FDA Κέντρο Αιμοδοσίας κατόπιν ενημέρωσης με συναίνεση. 50 δείγματα προήλθαν από τις Βόρειες Η.Π.Α. (Πενσυλβανία), 50 δείγματα από τις Κεντρικές Η.Π.Α. (Τεννεσί) και 50 δείγματα από τις Νότιες Η.Π.Α. (Φλόριντα). Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τους χειμερινούς μήνες (Ιανουάριος-Μάρτιος), από πληθυσμό ηλικίας 21-92 ετών, τόσο ανοιχτού όσο και σκοτεινού δέρματος. Τα άτομα από τα οποία συλλέχθηκαν τα δείγματα δεν λάμβαναν συμπληρώματα βιταμίνης D, δεν είχαν οικογενειακό ιστορικό ρυθμιστικών διαταραχών των παραθυρεοειδών αδένων ή του ασβεστίου, δεν είχαν ιστορικό παθήσεων σχετιζόμενων με τους νεφρούς, το ήπαρ, τους παραθυρεοειδείς αδένες ή το ασβέστιο ή βαριατρική χειρουργική και δεν λάμβαναν κανένα φάρμακο με γνωστή επίδραση στην πρόσληψη ή τον καταβολισμό της βιταμίνης D. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα κεντρικά 95% (2,5% - 97,5%) των παρατηρημένων αποτελεσμάτων.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση invitro.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία

HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων ή δειγμάτων ορού θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφύγετε κάθε επαφή με το δέρμα με όλα τα αντιδραστήρια, το ανασχετικό διάλυμα περιέχει HCl. Σε περίπτωση επαφής, πλύνετε σχολαστικά με νερό. Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μην χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και αναλώσιμα γάντια. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο MSDS (κύριο δελτίο δεδομένων ασφαλείας).

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
2. HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
3. HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D.** Clinical Laboratory International October 2010, vol.34: 16-19.
8. HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.
9. 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.
11. National Osteoporosis Foundation. Prevention – Vitamin D <http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitaminD>
12. EP17-A **Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.**

XVIII.ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ μι	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΥΛΙΚΑ ΕΛΕΓΧΟΥ μι
Βαθμονομητές (0-5) Δείγματα, Υλικά ελέγχου Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	25 - 250
Επωάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανακίνηση στις 400 σ.α.λ.	- 25 250
Προετοιμάστε το σύζευγμα εργασίας υπεροξειδάσης χρέουν κατά τη διάρκεια της επώασης και τουλάχιστο μία ώρα και 45 λεπτά πριν από τη χρήση του.	
Η σειρά της προετοιμασίας είναι κρίσιμη, βλ. VII. Προετοιμασία Αντιδραστηρίων.	
Πλύνετε 3 φορές με 350 μι διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε.	
εργασίας συζεύγματος HRP	250
Επωάστε επί 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανακίνηση στις 400 σ.α.λ.	250
Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε υποδοχής.	
Πλύνετε 3 φορές με 350 μι διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε	
Αποκαλυπτικό διάλυμα	100
Επωάστε επί 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανακίνηση στις 400 σ.α.λ.	100
Ανασχετικό διάλυμα	100
Κάντε ανάγνωση σε συσκευή ανάγνωσης πλακών μικροτιλοδότησης και καταγράψτε την απορρόφηση κάθε υποδοχής στα 450 nm (έναντι 630 ή 650 nm)	100

Αρ. καταλόγου DIAsource:
ΚΑΡ1971

Αρ. αναθεώρησης:
220722

Ημερομηνία αναθεώρησης : 22/07/2022