



IVD

CE

Free 25OH Vitamin D ELISA

KAPF1991

Version : 240329

Date of issue : 29/03/2024

Revision date: 29/03/2024

History

Summary of change:

Previous Version: 230123	Current Version: 240329																																												
<p>V. REAGENTS PROVIDED</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 20px;"> <tr> <td style="width: 20%;">[WASH TABLET] PBS-Tween wash buffer tablet</td> <td style="width: 15%; text-align: center;">2 tablets Lyophilized</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Brown</td> <td style="width: 55%; text-align: center;">Dissolve 1 tablet in 500 ml distilled water</td> </tr> </table>	[WASH TABLET] PBS-Tween wash buffer tablet	2 tablets Lyophilized	Brown	Dissolve 1 tablet in 500 ml distilled water	<p>V. REAGENTS PROVIDED</p> <p>Removal of the column relative to the color code</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 20px;"> <tr> <td style="width: 20%;">[WASH SOLN CONC] Wash solution (TRIS-HCl)</td> <td style="width: 15%; text-align: center;">1 vial 10 ml</td> <td style="width: 10%; text-align: center;">Brown</td> <td style="width: 55%; text-align: center;">Dilute 200x with distilled water. Use a magnetic stirrer.</td> </tr> </table>	[WASH SOLN CONC] Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	Brown	Dilute 200x with distilled water. Use a magnetic stirrer.																																				
[WASH TABLET] PBS-Tween wash buffer tablet	2 tablets Lyophilized	Brown	Dissolve 1 tablet in 500 ml distilled water																																										
[WASH SOLN CONC] Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	Brown	Dilute 200x with distilled water. Use a magnetic stirrer.																																										
<p>VI. SUPPLIES NOT PROVIDED</p>	<p>VI. SUPPLIES NOT PROVIDED</p> <p>Addition of a magnetic agitator</p>																																												
<p>VII. REAGENT PREPARATION</p> <p>C. Working Wash Solution: according to the number of strips used, dissolve 1 wash buffer tablet in 500 ml distilled water, or 2 wash buffer tablets in 1L distilled water. Ensure that all the salt crystals are dissolved.</p>	<p>VII. REAGENT PREPARATION</p> <p>C. Working Wash Solution: Prepare an adequate volume of working wash solution by adding 199 volumes of distilled water to one volume of 200x concentrated Wash solution. Use a magnetic stirrer to homogenize. Dispose of unused working wash solution at the end of the day.</p>																																												
<p>VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS</p> <p>After reconstitution, wash buffer is stable for two weeks at room temperature</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Kit component</th> <th style="width: 70%;">In use stability</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Anti-Vitamin D coated plate</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Sample diluent</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>100x Biot-Vit D reagent</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Streptavidin-HRP reagent</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Calibrator 1 - 6</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Control 1-2</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>PBS-Tween wash buffer (reconstituted tablet)</td><td>Maximum of 2 weeks at room temperature</td></tr> <tr><td>Chromogenic solution TMB</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Stop reagent</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Biot-Vit D dilution buffer</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> </tbody> </table>	Kit component	In use stability	Anti-Vitamin D coated plate	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Sample diluent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	100x Biot-Vit D reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Streptavidin-HRP reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Calibrator 1 - 6	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Control 1-2	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	PBS-Tween wash buffer (reconstituted tablet)	Maximum of 2 weeks at room temperature	Chromogenic solution TMB	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Stop reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Biot-Vit D dilution buffer	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	<p>VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS</p> <p>Unused working wash solution should be disposed of at the end of the day.</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin-top: 10px;"> <thead> <tr> <th style="width: 30%;">Kit component</th> <th style="width: 70%;">In use stability</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>Anti-Vitamin D coated plate</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Sample diluent</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>100x Biot-Vit D reagent</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Streptavidin-HRP reagent</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Calibrator 1 - 6</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Control 1-2</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Working wash solution</td><td>1 day at room temperature.</td></tr> <tr><td>Chromogenic solution TMB</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Stop reagent</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> <tr><td>Biot-Vit D dilution buffer</td><td>Maximum of 2 weeks at 2-8 °C</td></tr> </tbody> </table>	Kit component	In use stability	Anti-Vitamin D coated plate	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Sample diluent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	100x Biot-Vit D reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Streptavidin-HRP reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Calibrator 1 - 6	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Control 1-2	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Working wash solution	1 day at room temperature.	Chromogenic solution TMB	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Stop reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C	Biot-Vit D dilution buffer	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
Kit component	In use stability																																												
Anti-Vitamin D coated plate	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Sample diluent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
100x Biot-Vit D reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Streptavidin-HRP reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Calibrator 1 - 6	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Control 1-2	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
PBS-Tween wash buffer (reconstituted tablet)	Maximum of 2 weeks at room temperature																																												
Chromogenic solution TMB	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Stop reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Biot-Vit D dilution buffer	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Kit component	In use stability																																												
Anti-Vitamin D coated plate	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Sample diluent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
100x Biot-Vit D reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Streptavidin-HRP reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Calibrator 1 - 6	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Control 1-2	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Working wash solution	1 day at room temperature.																																												
Chromogenic solution TMB	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Stop reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
Biot-Vit D dilution buffer	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C																																												
<p>XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS</p> <p>A. Limits of detection</p> <p>The Limit of Blank (LoB) and the Limit of Detection (LoD) were determined in accordance with the CLSI guideline EP17-A2. The LoB was calculated to be 1.5 pg/ml. The LoD was calculated to be 2.4 pg/ml.</p>	<p>XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS</p> <p>A. Limits of detection</p> <p>The Limit of Blank (LoB) and the Limit of Detection (LoD) were determined by converting mOD into pg/ml values with standard curve equation. The LoB was calculated to be 1.86 pg/ml. The LoD was calculated to be 2.38 pg/ml.</p>																																												

C. Precision

Intermediate Precision and repeatability was determined based on CLSI EP05-A3.

Sample	N	pg/ml		Repeatability (within run)	Intermediate Precision(Total)
Pool 1	80	5.8	SD	0.29	0.34
			CV	4.9%	5.9%
Pool 2	80	9.6	SD	0.53	0.59
			CV	5.5%	6.1%
Pool 3	80	18.4	SD	0.35	0.75
			CV	1.9%	4.0%
Pool 4	80	28.1	SD	1.26	1.76
			CV	4.5%	6.3%

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of Variation

D. Time delay

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

TIME DELAY				
	0 min (pg/ml)	5 min (pg/ml)	10 min (pg/ml)	15 min (pg/ml)
Sample 1	4.9	4.9	4.9	4.8
Sample 2	18.6	18.4	18.6	18.6

Assay results remain accurate even when a sample is dispensed 15 minutes after the Calibrator has been added in the coated wells.

G. Validated concentration interval

The validated concentration interval of the Free 25OH Vitamin D assay is 2.4 – 35 pg/mL Free 25OH Vitamin D.

C. Precision

Reproducibility and repeatability precisions were evaluated with two samples at medium and high concentrations. Their concentrations were measured in 10 different runs in duplicate for reproducibility and in a single run for repeatability precision.

Sample	N	pg/ml		Reproducibility Precision (Total runs)
Sample 1	20	8.22	SD	0.45
			CV	5.5%
Sample 2	20	29.42	SD	3.00
			CV	10.2%

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of Variation

Sample	N	pg/ml		Repeatability Precision (within a run)
Sample 1	12	9.02	SD	0.32
			CV	3.5%
Sample 2	12	32.38	SD	0.64
			CV	2.0%

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of Variation

D. Time delay

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

TIME DELAY					
	0 min (pg/ml)	5 min (pg/ml)	10 min (pg/ml)	15 min (pg/ml)	20 min (pg/ml)
Sample 1	5.60	5.68	5.70	5.46	5.71
Sample 2	13.17	14.70	13.07	14.27	13.38

Assay results remain accurate even when a sample is dispensed 20 minutes after the Calibrator has been added in the coated wells.

G. Validated concentration interval

The validated concentration interval of the Free 25OH Vitamin D assay is 2.38 – 34.4 pg/mL Free 25OH Vitamin D.



Read entire protocol before use.

Free 25OH Vitamin D ELISA

I. INTENDED USE

The DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA is an in vitro diagnostic medical device intended to be used by healthcare professionals for the quantitative measurement of free 25OH Vitamin D in human serum and can be used for screening and monitoring purposes.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA Kit
- B. **Catalog number :** KAPF1991 : 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

Due to its hydrophobic nature 25OH Vitamin D, and other Vitamin D metabolites, circulate on binding proteins. About 90% of the total circulating 25OH Vitamin D is bound to the so-called VDBP or DBP. The remaining 10% are bound to albumin, the main protein of human blood plasma. Although the affinity of albumin toward 25OH Vitamin D is much lower than the affinity of VDBP, the high concentration of albumin compensates for this difference. A tiny fraction representing 0.04% of the total 25OH Vitamin D concentration circulates as the free form.


The conversion of 25OH Vitamin D into the biologically active 1,25(OH)₂ Vitamin D takes place into the cells and so requires the internalization of 25OH Vitamin D from the extracellular fluid. Different transport mechanisms are likely to be involved and some of them involve the concentration of the free ligand as one of the important parameters. In these cases, the fraction of free 25OH Vitamin D relates to the biological activity of Vitamin D, and therefore may better reflect the physiological action of Vitamin D than the total concentration of 25OH Vitamin D.

The fraction of free 25OH Vitamin D represents about 0.04% of the total concentration of 25OH Vitamin D. However, this percentage is not constant and varies according to different conditions. Although the level of albumin tends to be stable among individuals, the concentration of VDBP can fluctuate in several conditions, therefore, influencing the fraction of free 25OH Vitamin D. Pregnancy leads to an increase of the VDBP levels by about 50% while, e.g., liver failure and chronic kidney disease both result in a decrease of the VDBP concentration by also about 50%. In case of elevated binding proteins concentration, the fraction of free 25OH Vitamin D is lower, and vice-versa in the case of low-binding proteins concentration. In these conditions, and in the conditions listed later, the measurement of free 25OH Vitamin D may be a better marker of the Vitamin D activity than the classical measurement of total 25OH Vitamin D. In addition to variable concentrations VDBP also exists as different polymorphic forms. The affinity of the different VDBP forms toward 25OH Vitamin D may vary although this is still under debate. A polymorphic form with a high affinity for 25OH Vitamin D will decrease the fraction of free 25OH Vitamin D available. Conversely, a low affinity VDBP form will result in higher levels of free 25OH Vitamin D.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

The Free 25OH Vitamin D ELISA is based on a two-step immunoassay procedure performed in a microtiter plate. During the first incubation step, free 25OH Vitamin D [25(OH)Vitamin D2 and D3] is bound to the anti-Vitamin D antibody coated on the well of the microtiter plate. The in vivo equilibrium between free and bound 25OH Vitamin D is minimally disturbed. After washing, a fixed amount of biotinylated 25OH Vitamin D is added to each well. The non-bound biotinylated 25OH Vitamin D is removed by washing and a streptavidin peroxidase conjugate is added. In a next step TMB chromogenic substrate is added. Finally, the reaction is stopped by addition of stop reagent and the absorbance [A450nm] is measured using a plate spectrophotometer. The concentration of free 25OH Vitamin D (pg/ml) in the sample is inversely proportional to the absorbance in each sample well.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Tests Kit	Reconstitution
 Anti-Vitamin D coated plate Microtiter plate coated with a mouse anti-25OH D2/D3 monoclonal antibody.	96 wells	Ready for use
[DIL SPE] Sample diluent: Specimen diluent, containing a fluorosurfactant and Proclin.	1 vial 14 ml	Ready for use
[Ag BIOT CONC] 100x Biot-Vit D reagent Biotinylated 25OH Vitamin D in preservation buffer.	1 vial 250 µl	Dilute 100 x with Biot-Vit D dilution buffer
[SAV HRP] Streptavidin-HRP reagent Peroxidase conjugated streptavidin, containing Proclin.	1 vial 14 ml	Ready for use
[CAL N] Calibrators ; N = 1 to 6 Lyophilized 25OH Vitamin D depleted human serum containing Proclin and BND. (see exact value on vial label)	6 vials Lyophilized	Add 250 µl distilled water
[CONTROL 1] Control 1 Normal human serum containing Proclin and BND. (see exact value on vial label)	1 vial Lyophilized	Add 250 µl distilled water
[CONTROL 2] Control 2 25OH Vitamin D spiked human serum containing Proclin and BND (see exact value on vial label)	1 vial Lyophilized	Add 250 µl distilled water
[WASH SOLN CONC] Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	Dilute 200x with distilled water Use a magnetic stirrer
[CHROM TMB] Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	Ready for use
[STOP SOLN] Stop reagent 1M HCl.	1 vial 12 ml	Ready for use
[Ag BIOT SOLN] Biot-Vit D dilution buffer Buffer containing Proclin and BND.	1 vial 14.5 ml	Ready for use

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Pipettes calibrated for delivery of 10 µl, 35 µl - 250 µl, 3500 µl - 5000 µl (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended).
- Vortex mixer
- Magnetic agitator
- Plate shaker incubator at 37 °C and 650 rpm
- Washer for microplates
- Microtiter plate reader capable of reading at 450 nm and 650 (bichromatic reading)

VII. REAGENT PREPARATION

Bring all reagents to room temperature (18-25°C) at least 30 minutes before use.

- Calibrators:** reconstitute the Calibrators with 250 µl distilled water and let them stand for 15 minutes at RT (18-25°C). After reconstitution, mix well and make sure that all lyophilized material has been reconstituted.
- Controls:** reconstitute the Controls with 250 µl distilled water. Let them stand for 15 minutes at RT (18-25°C). After reconstitution, mix well and make sure that all lyophilized material has been reconstituted.
- Working Wash Solution:** Prepare an adequate volume of working wash solution by adding 199 volumes of distilled water to one volume of 200x concentrated Wash solution.
Use a magnetic stirrer to homogenize. Dispose of unused working wash solution at the end of the day.
- Working Biot-Vit D solution:** prepare an adequate volume of working dilution of the Biot-Vit D reagent by mixing 100x concentrated Biot-Vit D reagent with Biot-Vit D dilution buffer according to the number of strips used, as indicated in the table below: for example, for 6 strips (48 wells): 60 µl 100x concentrated Biot-Vit D reagent is added to 6.0 ml Biot-Vit D dilution buffer.
Use an appropriate polypropylene container for preparation.
The preparation of working Biot-Vit D solution is not stable and must be discarded if not used.

No. Strips	100x Biot-Vit D reagent (µl)	Biot-Vit D dilution buffer (ml)
3	35	3.5
4	40	4.0
5	50	5.0
6	60	6.0
7	70	7.0
8	80	8.0
9	90	9.0
10	100	10.0
11	110	11.0
12	120	12.0

All other reagents provided are ready to use.

Do not use a plate seal during the incubation steps.

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.
- Protect the Streptavidin-HRP reagent and chromogenic solution TMB from light.
- Do not store diluted Biotin-Vit D reagent, dilute only the required amount.
- Once opened, reconstitute the foil bag containing the microtiter plate with desiccant (stable for a maximum of 2 weeks at 2-8 °C).
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for two weeks at 2-8°C.
- Unused working wash solution should be disposed of at the end of the day.

Kit component	In use stability
Anti-Vitamin D coated plate	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
Sample diluent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
100x Biot-Vit D reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
Streptavidin-HRP reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
Calibrator 1 - 6	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
Control 1-2	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
Working wash solution	1 day at room temperature.
Chromogenic solution TMB	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
Stop reagent	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C
Biot-Vit D dilution buffer	Maximum of 2 weeks at 2-8 °C

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 24h, sampling and storage at -20°C is recommended.
- Avoid repeated freeze-thawing cycles. Mix samples well after thawing and before testing.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.
Do not mix materials from different kit lots.
Bring all the reagents to room temperature (18-25°C) prior to use.
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
Use a clean plastic container to prepare the Working 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 D (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 microtiter plate.
During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiter plate.
Each well can only be used once.

B. Procedure

1. Select the required number of strips for the run. The unused strips should be resealed in the bag with a desiccant and stored at 2 – 8°C.
2. Secure the strips into the holding frame.
3. Pipette 90 µl of Sample diluent into all the wells.
4. Pipette 10 µl of each reconstituted Calibrator, Control or sample in duplicate into the appropriate wells (use a new pipette tip for each Calibrator, Control or sample).
5. Incubate for 90 minutes at 37 °C, shaking at 650 rpm.
6. Wash the plate 3 times with 350 µl working wash solution.
7. Pipette 100 µl of working Biot-Vit D solution into all wells.
8. Incubate for 30 minutes at 37 °C, shaking at 650 rpm.
9. Wash the plate 3 times with 350 µl working wash solution.
10. Pipette 100 µl of Streptavidin-HRP reagent into all the wells.
11. Incubate for 20 minutes at 37 °C, shaking at 650 rpm.
12. Wash the plate 3 times with 350 µl working wash solution.
13. Pipette 100 µl of the chromogenic solution into all the wells.
14. Incubate for 15 minutes at room temperature (18-25°C), stationary and protected from light.
15. Pipette 100 µl of the Stop reagent into all the well.
16. Read the absorbances at 450 nm within 5 minutes (reference filter 630nm or 650nm), and calculate the results as described in Section XI.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

Free 25OH Vitamin D ELISA		OD units
Calibrator	0.9 pg/ml	2.16
	3.1 pg/ml	1.71
	6.5 pg/ml	1.21
	11.6 pg/ml	0.83
	23.2 pg/ml	0.45
	40.3 pg/ml	0.23

Note : 1 pg/ml = 2.5 pmol/l

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Limits of detection

The Limit of Blank (LoB) and the Limit of Detection (LoD) were determined by converting mOD into pg/ml values with standard curve equation.

The LoB was calculated to be 1.86 pg/ml.

The LoD was calculated to be 2.38 pg/ml.

B. Specificity

Cross-reactivity of the antibody used in the Free 25OH Vitamin D ELISA was determined by the supplier as depicted in the following table:

Compound and Concentration	% Cross reaction
25OH-Vitamin D ₃ at 10 ng/ml	100
25OH-Vitamin D ₂ at 10 ng/ml	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 tested using the DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA kit was evaluated according to CLSI EP07-A2. Ascorbic acid, unconjugated bilirubin, HAMA, rheumatoid factor, hemoglobin, triglycerides, biotin and cholesterol were tested in samples with different free 25OH Vitamin D concentrations. The tested substances did not affect the performance of free 25OH Vitamin D ELISA.

Substances	Concentration of interferent	Free 25OH Vitamin D (pg/mL)	Mean % Interference
Ascorbic Acid	[3mg/dl]	6.5	1%
		11.1	-1%
		16.7	0%
Unconjugated Bilirubin	[20mg/dl]	6.6	-6%
		11.2	1%
		15.7	-3%
HAMA	[2µg/ml]	6.6	-5%
		10.5	2%
		15.1	2%
Rheumatoid Factor	[600IU/ml]	6.6	-1%
		10.5	-3%
		15.1	-6%
Haemoglobin	[200mg/dl]	6.9	-8%
		11.2	-8%
		17.0	-10%
Triglycerides	[37mmol/l]	6.8	-5%
		11.1	-5%
		16.2	-5%
Biotin	[4mg/dl]	6.5	1%
		10.6	4%
		15.7	1%
Cholesterol	[13mmol/l]	6.4	0%
		10.6	-1%
		16.8	-3%

C. Precision

Reproducibility and repeatability precisions were evaluated with two samples at medium and high concentrations. Their concentrations were measured in 10 different runs in duplicate for reproducibility and in a single run for repeatability precision.

Sample	N	pg/ml		Reproducibility Precision (Total runs)
Sample 1	20	8.22	SD	0.45
			CV	5.5%
Sample 2	20	29.42	SD	3.00
			CV	10.2%

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of Variation

Sample	N	pg/ml		Repeatability Precision (within a run)
Sample 1	12	9.02	SD	0.32
			CV	3.5%
Sample 2	12	32.38	SD	0.64
			CV	2.0%

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of Variation

D. Time delay

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

TIME DELAY					
	0 min (pg/ml)	5 min (pg/ml)	10 min (pg/ml)	15 min (pg/ml)	20 min (pg/ml)
Sample 1	5.60	5.68	5.70	5.46	5.71
Sample 2	13.17	14.70	13.07	14.27	13.38

Assay results remain accurate even when a sample is dispensed 20 minutes after the Calibrator has been added in the coated wells.

E. Limitations of the test

- The test is an aid in the diagnosis and is to be used in conjunction with clinical findings.
- The performance of this assay has not been established in a pediatric population.

F. Method comparison

The correlation between rate dialysis analysis result vs Free 25OH Vitamin D ELISA is 0.9916.

G. Validated concentration interval

The validated concentration interval of the Free 25OH Vitamin D assay is 2.38 – 34.4 pg/mL Free 25OH Vitamin D.

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 Vitamin D.

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

A reference range has been established based upon 109 apparently healthy individuals. The individual patient serum samples used were obtained in the

Netherlands from a local blood bank with informed consent. Samples were collected during summer. The following table provides a summary of the results:

	Free vitamin D concentration (pg/ml)
Highest concentration observed	17.1
Lowest concentration observed	<2.4
Median concentration observed	5.1
Average concentration observed	5.4

Classification of Vitamin D status has been established based on calculations performed by DIAsource, from the commonly accepted cut-off values for total 25OH Vitamin D, and from the % of free 25OH Vitamin D, and the linear correlation between both parameters, established in a large normal population.

These cut-offs are to be used by laboratories under their own responsibilities, as they have not been established by international societies yet. That said, there is also no consensus on the total 25OH Vitamin D cut-off values either.

N = 279 (normal population)

First calculation method, % Free 25OH Vitamin D = 0.020%

Second calculation method, Free 25OH Vitamin D = 0.138 Total 25OH Vitamin D + 1.4 pg/ml

Mean of the two calculation methods:

Level	Cut-off used for Total 25OH Vitamin D (ng/ml)	Proposed cut-off for Free 25OH Vitamin D (pg/ml)
Deficiency	<10	<2.4
Insufficiency	10-29	2.4-5.8
Sufficiency	30-100	>5.8

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 HCl. In case of contact, wash thoroughly with water.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

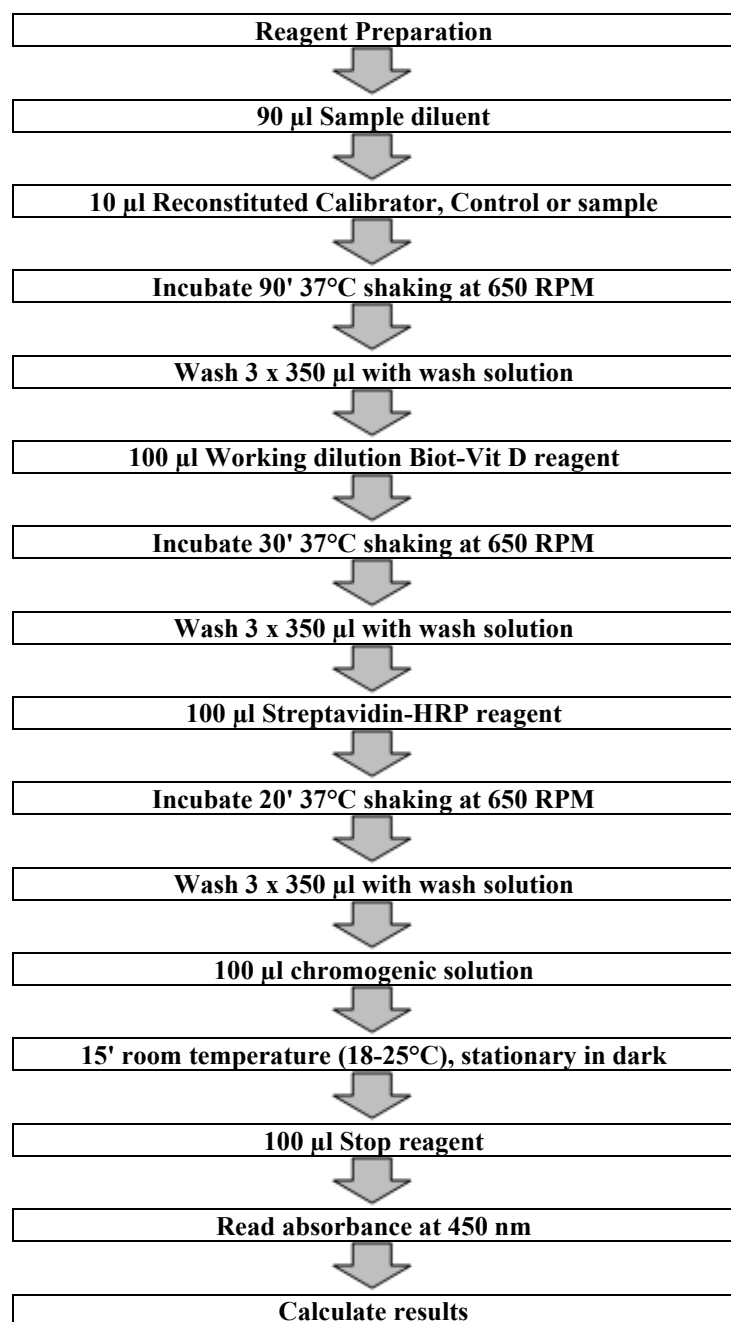
For more information, see Material Safety Data Sheet (MSDS)

XVII. REFERENCES

- BOUILLON R. (2016), Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial genotypic associations, JCEM, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-1104>.
- SOLLID S.T. (2016), Effects of vitamin D binding protein phenotypes and vitamin D supplementation on serum total 25(OH) D and directly measured free 25(OH)D, Eur. J. Endocrinol. April 1, 174:445-452.
- TANGPRICHA V. (2015), Free 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Cystic Fibrosis, Am. J. Med. Sci. 2015 Nov;350(5):374-9.
- ALOIA J. (2015), Free 25(OH)D and the Vitamin D Paradox in African Americans, J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015 Jul 10:JC20152066.
- SCHWARTZ J.B. (2014), A comparison of direct and calculated free 25(OH) Vitamin D levels in clinical populations, J. Clin. Endocrinol. Metab., 99(5):1631-7.
- BIKLE D. (2013), Variability in free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., S09600760.
- BIKLE D., Gee E, Halloran B, Haddad JG. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. J Clin Invest 1984;74:1966-71.

8. VAN HOOFF H.J., Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. Anal Biochem. 1998 May 1;258(2):176-83.

XVIII. PROTOCOL SUMMARY



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



Lire entièrement le protocole avant utilisation.

Free 25OH Vitamin D ELISA

I. UTILISATION PRÉVUE

Le DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA est un dispositif médical de diagnostic in vitro destiné à être utilisé par les professionnels de la santé pour la mesure quantitative de la 25OH Vitamine D libre dans le sérum humain et peut être utilisé à des fins de dépistage et de surveillance.

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA Kit
- B. **Numéro de catalogue :** KAPF1991 : 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

En raison de sa nature hydrophobe, la 25OH vitamine D, et d'autres métabolites de la vitamine D, circulent sur des protéines porteuses. Environ 90% de la 25OH vitamine D circulante sont liés à la VDBP ou DBP (Vitamin D Binding Protein). Les 10% restants sont liés à l'albumine, la principale protéine du plasma humain. Bien que l'affinité de l'albumine pour la 25OH vitamine D soit beaucoup plus faible que celle de la VDBP, la forte concentration d'albumine compense cette différence. Une infime fraction, environ 0,04 % de la concentration totale de 25OH vitamine D, circule sous forme libre.


La conversion de la 25OH vitamine D en 1,25(OH)₂ vitamine D biologiquement active a lieu dans les cellules et nécessite donc l'internalisation de la 25OH vitamine D du liquide extracellulaire. Différents mécanismes de transport sont susceptibles d'être impliqués et certains d'entre eux impliquent la concentration de la fraction libre comme l'un des paramètres importants. Dans ces cas, la fraction de 25OH vitamine D libre est liée à l'activité biologique de la vitamine D, et peut donc mieux refléter l'action physiologique de la vitamine D que la concentration totale de 25OH vitamine D.

La fraction de 25OH vitamine D libre représente environ 0,04 % de la concentration totale de 25OH vitamine D. Cependant, ce pourcentage n'est pas constant et varie en fonction de différentes conditions. Bien que le niveau d'albumine ait tendance à être stable chez les individus, la concentration de VDBP peut fluctuer dans plusieurs conditions, influençant ainsi la fraction de la 25OH vitamine D libre. La grossesse entraîne une augmentation des niveaux de VDBP d'environ 50% alors que, par exemple, l'insuffisance hépatique et les maladies rénales chroniques entraînent toutes deux une diminution de la concentration de VDBP d'environ 50%. En cas de concentration élevée de protéines porteuses, la fraction de 25OH vitamine D libre est plus faible, et inversement en cas de concentration faible de protéines porteuses. Dans ces conditions, et dans les conditions énumérées plus loin, la mesure de la 25OH vitamine D libre peut être un meilleur marqueur de l'activité de la vitamine D que la mesure classique de la 25OH vitamine D totale. En plus des concentrations variables, la VDBP existe également sous différentes formes polymorphes. L'affinité des différentes formes de VDBP pour la 25OH vitamine D peut varier, bien que cela fasse encore l'objet d'un débat. Une forme polymorphe ayant une forte affinité pour la 25OH vitamine D diminuera la fraction de 25OH vitamine D libre disponible. Inversement, une forme de VDBP de faible affinité entraînera des niveaux plus élevés de 25OH vitamine D libre.

IV. PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le test Free 25OH Vitamine D ELISA repose sur une procédure d'immunoessai en deux étapes effectuée dans une plaque de microtitration. Au cours de la première étape d'incubation, la 25OH vitamine D libre (25OH vitamine D2 et D3) est fixée à un anticorps anti-25OH vitamine D recouvrant les puits de la plaque de microtitration. L'équilibre in vivo entre la 25OH vitamine D libre et liée est à peine modifié. Après lavage, une quantité déterminée de 25OH vitamine D biotinylée est ajoutée dans chaque puits. La 25OH vitamine D biotinylée non liée est éliminée par lavage et un conjugué streptavidine peroxydase est ajouté. Un substrat chromogène TMB est ajouté au cours de l'étape suivante. Enfin, la réaction est arrêtée par l'addition d'un réactif d'arrêt et l'absorbance (à 450 nm) est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre pour microplaques. La concentration de 25OH vitamine D libre (pg/ml) dans l'échantillon est inversement proportionnelle à l'absorbance de chaque puits d'échantillon.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests Kit	Reconstitution
 Plaque de microtitration recouverte d'un anticorps monoclonal de souris anti-25OH D2/D3.	96 puits	Prêt à l'emploi
[DIL SPE] Diluant d'échantillon Diluant d'échantillon contenant un fluorosurfactant et du Proclin.	1 flacon 14 ml	Prêt à l'emploi
[Ag BIOT CONC] Réactif Biot-Vit D 100x 25OH Vitamine D biotinylée en solution dans un tampon de conservation.	1 flacon 250 µl	Diluer 100 x avec le tampon de dilution Biot-Vit D
[SAV HRP] Réactif streptavidine-HRP Streptavidine conjuguée à la peroxydase, contenant du Proclin.	1 flacon 14 ml	Prêt à l'emploi
[CAL N] Calibrateurs ; N = 1 to 6 Sérum humain lyophilisé contenant du Proclin et du BND. (voir la valeur exacte sur l'étiquette du flacon)	6 flacons Lyophilisés	Ajouter 250 µl d'eau distillée.
[CONTROL 1] Contrôle 1 Sérum humain normal lyophilisé contenant du Proclin et du BND. (voir la valeur exacte sur l'étiquette du flacon)	1 flacon Lyophilisé	Ajouter 250 µl d'eau distillée.
[CONTROL 2] Contrôle 2 Sérum humain lyophilisé additionné de 25OH vitamine D contenant du Proclin et du BND. (voir la valeur exacte sur l'étiquette du flacon)	1 flacon Lyophilisé	Ajouter 250 µl d'eau distillée.
[WASH SOLN CONC] Wash solution (TRIS-HCl)	1 flacon 10 ml	Diluer 200x avec de l'eau distillée Utiliser un agitateur magnétique
[CHROM TMB] Solution chromogène TMB (Tétraméthylbenzidine)	1 flacon 14 ml	Prêt à l'emploi
[STOP SOLN] Réactif d'arrêt 1 M HCl	1 flacon 14 ml	Prêt à l'emploi
[Ag BIOT SOLN] Tampon de dilution Biot-Vit D Tampon contenant du Proclin et du BND.	1 flacon 14,5 ml	Prêt à l'emploi

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

Le matériel suivant est requis mais non fourni dans le kit:

- Eau distillée
- Pipettes calibrées pour distribuer 10 µl, 35 µl à 250 µl, 3500 µl à 5000 µl (l'utilisation de pipettes de précision avec des embouts jetables en plastique est recommandée).
- Mélangeur vortex
- Agitateur magnétique
- Mélangeur incubateur de plaque à 37°C et 650 tr/min (rpm).
- Laveuse de microplaques
- Lecteur de microplaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Ramener tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) au moins 30 minutes avant utilisation.

- Calibrateurs:** reconstituer les calibrateurs avec 250 µl d'eau distillée et les laisser reposer pendant 15 minutes à température ambiante (18-25°C). Après reconstitution, bien mélanger et s'assurer que tout produit lyophilisé a bien été reconstitué.
- Contrôles:** reconstituer les contrôles avec 250 µl d'eau distillée et les laisser reposer pendant 15 minutes à température ambiante (18-25°C). Après reconstitution, bien mélanger et s'assurer que tout produit lyophilisé a bien été reconstitué.
- Solution de lavage de travail:** Préparer un volume adéquat de solution de lavage de travail en ajoutant 199 volumes d'eau distillée à un volume de Wash solution 200x concentrée. Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la solution de lavage de travail non utilisée, à la fin de la journée.
- Solution Biot-Vit D de travail:** Préparer un volume adéquat de solution de travail du réactif Biot-Vit D en mélangeant le réactif concentré Biot-Vit D 100x et le tampon de dilution Biot-Vit D en fonction du nombre de barrettes utilisées comme indiqué dans le tableau ci-dessous, par exemple pour 6 barrettes (48 puits) : 60 µl de réactif concentré Biot-Vit D 100x sont ajoutés à 6,0 ml de tampon de dilution Biot-Vit D. Utiliser un contenant en polypropylène (PP) adapté pour la préparation. La préparation de la solution de Biot-Vit D de travail n'est pas stable et doit être jetée si elle n'est pas utilisée.

Nombre de barrettes	Réactif Biot-Vit D 100x (µl)	Tampon de dilution Biot-Vit D (ml)
3	35	3,5
4	40	4,0
5	50	5,0
6	60	6,0
7	70	7,0
8	80	8,0
9	90	9,0
10	100	10,0
11	110	11,0
12	120	12,0

Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.

Ne pas utiliser de film d'étanchéité sur la microplaque pendant les étapes d'incubation.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- 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.
- Tenir le réactif streptavidine-HRP et la solution chromogène TMB à l'abri de la lumière.
- Ne pas conserver de réactif Biotine-Vit D dilué ; diluer uniquement la quantité requise.
- Après ouverture, refermer le sachet métallique contenant la plaque de microtitration avec un dessiccant (stable pendant une durée maximum de 2 semaines à une température de 2°C à 8°C).
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables 2 semaines entre 2 et 8°C.
- La solution de lavage de travail non utilisée doit être éliminée à la fin de la journée.

Composant du kit	Stabilité en cours d'utilisation
Plaque recouverte d'anti-25OH vitamine D	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C
Diluant d'échantillon	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C
Réactif Biot-Vit D 100x	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C
Réactif streptavidine-HRP	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C
Calibrateurs 1 – 6	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C
Contrôles 1-2	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C
Solution de lavage de travail	1 jour à température ambiante .
Solution chromogène	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C
Réactif d'arrêt	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C
Tampon de dilution Biot-Vit D	Maximum de 2 semaines entre 2 °C et 8 °C

IX. RECUEIL ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Ce kit convient aux échantillons de sérum.
- Les échantillons de sérum doivent être conservés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas exécuté dans les 24h, l'aliquotage et le stockage à -20°C sont recommandés.
- Éviter les cycles répétés de congélation-décongélation. Bien mélanger les échantillons après décongélation et avant le test.

X. MODE OPÉRATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.

Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.

Tester les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.

Utiliser un récipient en plastique propre pour préparer la solution de lavage.

Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Pour la distribution de la solution du chromogène et de la solution d'arrêt, éviter des pipettes avec des parties en métal.

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

Respecter les temps d'incubation.

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

Préparer une courbe de calibration 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 microtitration.

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

Chaque puits ne peut être utilisé qu'une seule fois.

B. Mode opératoire

- Sélectionner le nombre de barrettes requis pour l'analyse. Les barrettes non utilisées doivent être refermées dans le sac avec un dessiccant et conservées entre 2 et 8°C.
- Fixer les barrettes dans le cadre de maintien.
- Pipeter 90 µl de diluant d'échantillon dans tous les puits.
- Pipeter 10 µl de chaque calibrateur reconstitué, contrôle reconstitué ou échantillon en double dans les puits appropriés (utiliser une nouvelle pointe de pipette pour chaque calibrateur, contrôle ou échantillon).
- Incuber la plaque pendant 90 minutes à 37°C en l'agitant à 650 tr/min.
- Laver 3 fois la plaque avec 350 µl de solution de lavage de travail.
- Pipeter 100 µl de solution de Biot-Vit D de travail dans tous les puits.
- Incuber la plaque pendant 30 minutes à 37°C en l'agitant à 650 tr/min.
- Laver 3 fois la plaque avec 350 µl de solution de lavage de travail.
- Pipeter 100 µl de réactif Streptavidine-HRP dans tous les puits.
- Incuber la plaque pendant 20 minutes à 37 °C en l'agitant à 650 tr/min.
- Laver 3 fois la plaque avec 350 µl de solution de lavage de travail.
- Pipeter 100 µl de la solution chromogène dans tous les puits.
- Incuber la plaque 15 minutes à température ambiante (18-25°C), immobile et à l'abri de la lumière.
- Pipeter 100 µl du réactif d'arrêt dans tout le puits.
- Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans les 5 minutes et calculer les résultats comme décrits dans la section XI.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

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

XII. DONNEES TYPES

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

Free 25OH Vitamin D ELISA		Unités DO
Calibrateur		
	0,9 pg/ml	2,16
	3,1 pg/ml	1,71
	6,5 pg/ml	1,21
	11,6 pg/ml	0,83
	23,2 pg/ml	0,45
	40,3 pg/ml	0,23

Note : 1 pg/ml = 2,5 pmol/l

XIII. PERFORMANCES ET LIMITES

A. Seuils de détection

La limite de blanc (LoB) et la limite de détection (LoD) ont été déterminées en convertissant les valeurs de mOD en pg/ml à l'aide de l'équation de la courbe standard. La LoB a été calculée comme étant de 1,86 pg/ml.

La LoD a été calculée comme étant de 2,38 pg/ml.

B. Spécificité

La réactivité croisée de l'anticorps utilisé pour le dosage de la vitamine 25[OH]D libre par la méthode ELISA (Free 25OH Vitamin D ELISA) a été établie par le fournisseur, comme indiqué dans le tableau suivant.

Composé et concentration	Pourcentage de réactions croisées
25OH Vitamine D3 à 10 ng/ml	100
25OH Vitamine D2 à 10 ng/ml	86
1,25(OH)2 Vitamine D3 à 200 ng/ml	20
1,25(OH)2 Vitamine D2 à 690 ng/ml	1,9
Vitamine D3 à 200 ng/ml	2,9
Vitamine D2 à 200 ng/ml	1,3
24,25(OH)2 Vitamine D3 à 20 ng/ml	> 100
25,26(OH)2 Vitamine D3 à 4 ng/ml	> 100
3-épi 25(OH) Vitamine D3 à 20 µg/ml	0,1

L'effet de substances interférentes potentielles sur les échantillons testés avec le kit DIASource Free 25OH Vitamin D ELISA a été évalué selon la norme EP07-A2 du CLSI. L'Acide ascorbique, la bilirubine non conjuguée, les anticorps humain anti-murine, les facteurs rhumatoïdes, l'hémoglobine, les triglycérides, la biotine et le cholestérol ont été testés dans les échantillons avec différentes concentrations de 25OH Vitamine D libre. Les substances testées n'ont pas affecté les performances du dosage de la 25OH Vitamine D par la méthode ELISA.

Substances	Concentration de la substance interférente	25OH Vitamine D libre (pg/ml)	% moyen d'interférence
Acide ascorbique	[3mg/dl]	6,5	1%
		11,1	-1%
		16,7	0%
Bilirubine non conjuguée	[20mg/dl]	6,6	-6%
		11,2	1%
		15,7	-3%
Anticorps humain antimurine	[2µg/ml]	6,6	-5%
		10,5	2%
		15,1	2%
Facteur rhumatoïde	[600IU/ml]	6,6	-1%
		10,5	-3%
		15,1	-6%

Hémoglobine	[200mg/dl]	6,9	-8%
		11,2	-8%
		17,0	-10%
Triglycérides	[37mmol/l]	6,8	-5%
		11,1	-5%
		16,2	-5%
Biotine	[4mg/dl]	6,5	1%
		10,6	4%
		15,7	1%
Cholestérol	[13mmol/l]	6,4	0%
		10,6	-1%
		16,8	-3%

C. Précision

La reproductibilité et répétabilité ont été évaluées avec deux échantillons à des concentrations moyennes et élevées. Leurs concentrations ont été mesurées en 10 passages différents en double pour la reproductibilité et en un seul passage pour la précision de la répétabilité.

Échantillon	N	pg/ml		Reproductibilité (nombre total de passages)
Echantillon 1	20	8.22	SD	0.45
			CV	5.5%
Echantillon 2	20	29.42	SD	3.00
			CV	10.2%

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

Échantillon	N	pg/ml		Répétabilité (au sein de la série)
Echantillon 1	12	9.02	SD	0.32
			CV	3.5%
Echantillon 2	12	32.38	SD	0.64
			CV	2.0%

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Délai

Les résultats obtenus pendant le temps écoulé entre le pipetage du dernier calibrateur et d'un échantillon sont présentés dans le tableau suivant.

	DÉLAI				
	0 min (pg/ml)	5 min (pg/ml)	10 min (pg/ml)	15 min (pg/ml)	20 min (pg/ml)
Echantillon 1	5.60	5.68	5.70	5.46	5.71
Echantillon 2	13.17	14.70	13.07	14.27	13.38

Les résultats du test restent précis même lorsqu'un échantillon est distribué 20minutes après l'ajout du calibrateur dans les puits.

E. Limites de la procédure

- Le test est une aide au diagnostic et doit être utilisé en conjonction avec les signes cliniques.
- La performance de cet essai n'a pas été établie pour la population pédiatrique.

F. Comparaison de méthode

La corrélation entre le résultat d'un dosage par dialyse et le taux de 25OH vitamine D libre mesuré par la méthode ELISA est de 0,9916.

G. Intervalle de concentration validé

L'intervalle de concentration validé du dosage de la 25OH vitamine D libre est 2,38 à 34.4 pg/ml.

XIV. CONTROLE INTERNE DE LA QUALITE

- 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'azote influenceront la réaction enzymatique et ne peuvent pas être utilisés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en doublet 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 Vitamine D normaux.

Tous les laboratoires doivent établir leur fourchette à partir de leur population locale. Une plage de référence a été établie à partir de 109 individus en bonne santé apparente. Les échantillons de sérum utilisés ont été obtenus auprès d'une banque du sang des Pays-Bas, avec consentement éclairé. Les échantillons ont été prélevés pendant l'été. Le tableau suivant présente une synthèse des résultats :

	Concentration de 25OH vitamine D libre (pg/ml)
Concentration la plus élevée observée	17,1
Concentration la plus basse observée	< 2,4
Concentration médiane observée	5,1
Concentration moyenne observée	5,4

La classification du statut de la vitamine D a été établie sur la base des calculs effectués par DIAsource, à partir des seuils communément admis pour la 25OH Vitamine D totale et du pourcentage de 25OH Vitamine D libre, et de la corrélation linéaire entre les deux paramètres, établie dans une grande population normale. Ces seuils doivent être utilisés par les laboratoires sous leurs propres responsabilités, car ils n'ont pas encore été établis par des sociétés internationales. Cela dit, il n'y a pas non plus de consensus sur les valeurs seuils de la 25OH Vitamine D totale.

N = 279 (population normale)

Première méthode de calcul, % 25OH de vitamine D libre = 0,020%

Deuxième méthode de calcul, 25OH Vitamine D libre = 0,138 x 25OH Vitamine D totale + 1,4 pg/ml

Moyenne des deux méthodes de calcul:

Taux	Seuils utilisés pour la 25OH Vitamine D totale (ng/ml)	Seuils proposés pour la 25OH Vitamine D libre (pg/ml)
Déficient	<10	<2,4
Insuffisant	10-29	2,4-5,8
Suffisant	30-100	>5,8

XVI. PRÉCAUTIONS ET MISES EN GARDE

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 HCl. En cas de contact, laver avec beaucoup d'eau.

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

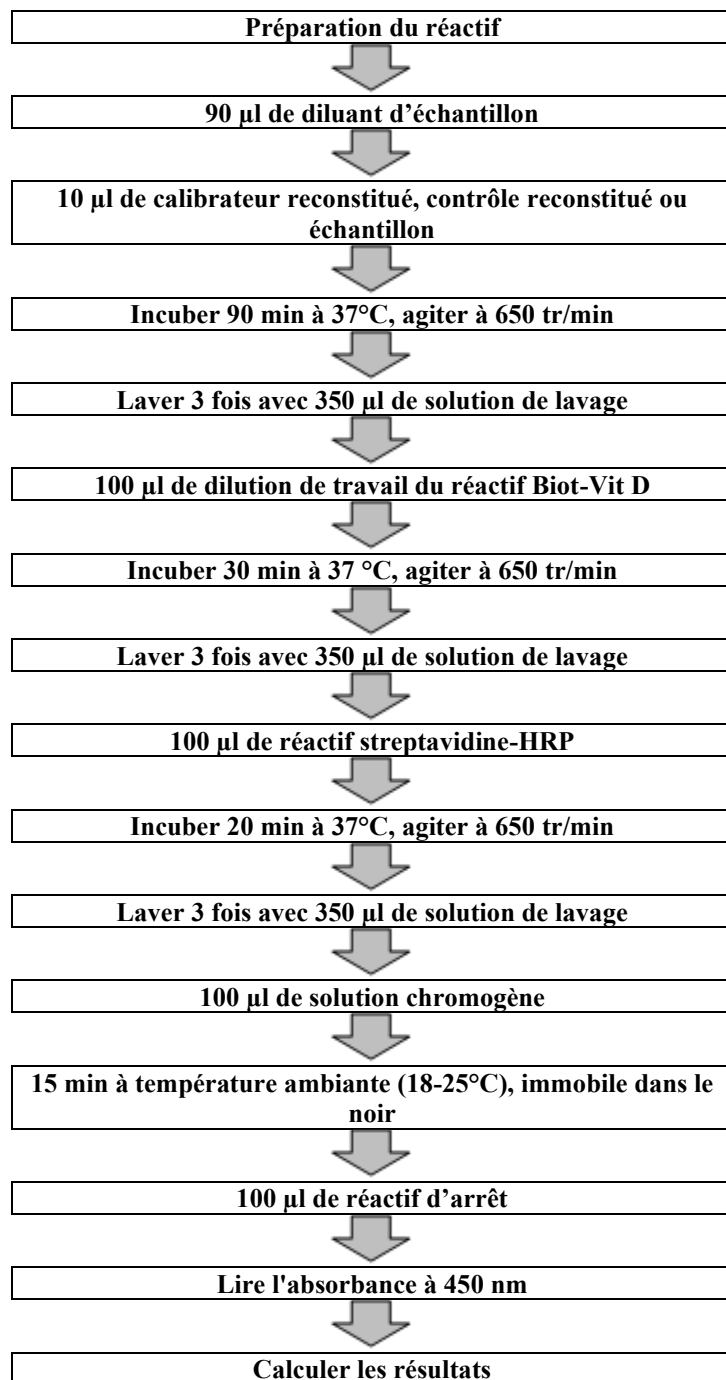
Pour plus d'informations, consultez la fiche signalétique (MSDS)

XVII. REFERENCES

- BOUILLON R. (2016), Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial genotypic associations, JCEM, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-1104>.
- SOLLID S.T. (2016), Effects of vitamin D binding protein phenotypes and vitamin D supplementation on serum total 25(OH) D and directly measured free 25(OH)D, Eur. J. Endocrinol. April 1, 174:445-452.

3. TANGPRICHA V. (2015), Free 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Cystic Fibrosis, *Am. J. Med. Sci.* 2015 Nov;350(5):374-9.
4. ALOIA J. (2015), Free 25(OH)D and the Vitamin D Paradox in African Americans, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015 Jul 10:JC20152066.
5. SCHWARTZ J.B. (2014), A comparison of direct and calculated free 25(OH) Vitamin D levels in clinical populations, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 99(5):1631-7.
6. BIKLE D. (2013), Variability in free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, S09600760.
7. BIKLE D., Gee E, Halloran B, Haddad JG. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. *J Clin Invest* 1984;74:1966–71.
8. VAN HOOFF H.J., Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. *Anal Biochem.* 1998 May 1;258(2):176-83.

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE





Lees het hele protocol vóór gebruik.

Free 25OH Vitamin D ELISA

I. BEOOGD GEBRUIK

De DIAsource Free 25OH Vitamine D ELISA is een medisch hulpmiddel voor in-vitrodiagnostiek dat bestemd is voor gebruik door professionele zorgverleners voor de kwantitatieve meting van gratis 25OH Vitamine D in menselijk serum en kan worden gebruikt voor screening en monitoring.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA Kit
- B. **Catalogusnummer:** KAPF1991 : 96 tests
- C. **Geproduceerd door:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgium.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel : +32 (0)10 84 99 11

Fax : +32 (0)10 84 99 90

III. KLINISCHE ACHTERGROND

Door zijn hydrofobe eigenschappen circuleert 25OH Vitamine D, en andere Vitamine D-metabolieten, op bindingseiwitten. Ongeveer 90% van het totaal aan circulerende 25OH Vitamine D is gebonden aan het zogenoemde VDBP (vitamine D-bindend proteïne) of DBP. De resterende 10% is gebonden aan albumine, het belangrijkste eiwit in het menselijke bloedplasma. Hoewel de affiniteit van albumine voor 25OH Vitamine D veel lager is dan de affiniteit van VDBP, compenseert de hoge albumineconcentratie dit verschil. Een kleine fractie, die 0,04% van de totale 25OH Vitamine D-concentratie vertegenwoordigt, circuleert vrij.


De omzetting van 25OH Vitamine D in het biologisch actieve $1,25(\text{OH})_2$ Vitamine D vindt plaats in de cellen en hiervoor is dus de internalisatie van 25OH Vitamine D uit de extracellulaire vloeistof nodig. Verschillende transportmechanismen zijn hier waarschijnlijk bij betrokken en sommige daarvan hebben betrekking op de concentratie van de vrije ligand als één van de belangrijke parameters. In die gevallen heeft de fractie vrij circulerende 25OH Vitamine D betrekking op de biologische activiteit van Vitamine D, en geeft daardoor waarschijnlijk beter de fysiologische werking van Vitamine D weer dan de totale concentratie van 25OH Vitamine D.

De fractie vrij circulerende 25OH Vitamine D vertegenwoordigt ongeveer 0,04% van de totale concentratie van 25OH Vitamine D. Dit percentage is echter niet constant en varieert afhankelijk van de omstandigheden. Hoewel de albumineconcentratie meestal stabiel is tussen individuen, kan de concentratie van VDBP fluctueren in verschillende omstandigheden, waardoor de fractie van vrij circulerende 25OH Vitamine D wordt beïnvloed. Zwangerschap leidt tot een toename van de VDBP-concentraties met ongeveer 50%, terwijl bijvoorbeeld leverfalen en chronische nierziekte beide resulteren in een afname van de VDBP-concentratie met ook ongeveer 50%. In het geval van een verhoogde concentratie aan bindingseiwitten is de fractie vrij circulerende 25OH Vitamine D lager, en vice versa in het geval van een lage concentratie aan bindingseiwitten. In die omstandigheden, en in de later genoemde omstandigheden, kan de meting van vrij circulerende 25OH Vitamine D een betere marker van de Vitamine D-activiteit zijn dan de klassieke meting van de totale 25OH Vitamine D. Naast variabele concentraties bestaat VDBP ook als verschillende polymorfe vormen. De affiniteit van de verschillende VDBP-vormen voor 25OH-vitamine D kan variëren, hoewel dit nog steeds ter discussie staat. Een polymorfe vorm met een hoge affiniteit voor 25OH Vitamine D zal de beschikbare fractie vrij circulerende 25OH Vitamine D verminderen. Omgekeerd zal een VDBP-vorm met een lage affiniteit resulteren in hogere concentraties van vrij circulerende 25OH Vitamine D.

IV. PRINCIPES VAN DE METHODE

De Free 25OH Vitamine D ELISA is gebaseerd op een immuuntestprocedure in twee stappen die wordt uitgevoerd in een microtiterplaat. Tijdens de eerste incubatiestap wordt vrij 25OH vitamine D [25(OH)vitamine D2 en D3] gebonden aan het anti-vitamine D antilichaam gecoat op het putje (well) van de microtiterplaat. Het in vivo evenwicht tussen vrij en gebonden 25OH vitamine D wordt zo weinig mogelijk verstoord. Na het wassen wordt een vaste hoeveelheid gebiotinyleerd 25OH vitamine D toegevoegd aan elk putje. Het niet-gebonden gebiotinyleerd 25OH vitamine D wordt verwijderd door wassen en peroxidase-geconjugeerd streptavidine wordt toegevoegd. In een volgende stap wordt TMB chromogeen substraat toegevoegd. Tenslotte wordt de reactie gestopt door het toevoegen van stopreagens en wordt de absorptie [A450nm] gemeten met behulp van een plaat-spectrofotometer. De concentratie van vrij 25OH vitamine D (pg/ml) in het monster is omgekeerd evenredig aan de absorptie in elke monsterputje.

V. MEEGELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Kit met 96 testen	Reconstitutie
 Anti-vitamine D gecoate plaat Microtiterplaat gecoat met muis anti-25OH D2/D3 monokonaal antilichaam.	96 wells	Klaar voor gebruik
[DIL SPE] Monsterverdunningsmiddel Verdunningsmiddel voor monsters dat een fluorsurfactant en Proclin bevat.	1 flacon 14 ml	Klaar voor gebruik
[Ag BIOT CONC] 100x Biot-Vit D reagens Gebiotinyleerd 25OH vitamine D in een preservatiebuffer.	1 fles 250 µl	Verdun 100 x met Biot-Vit D verdunningsbuffer
[SAV HRP] Streptavidine-HRP reagens Peroxidase-geconjugeerd streptavidine met Proclin.	1 fles 14 ml	Klaar voor gebruik
[CAL N] Kalibrators ; N = 1 to 6 Gevriesdroogd 25OH vitamine D-arm humaan serum bevat Proclin en BND. (zie exacte waarde op flaconetiket)	6 flessen gevriesdroogd	Voeg 250 µl gedestilleerd water toe
[CONTROL 1] Controle 1 Gevriesdroogd normaal humaan serum met Proclin en BND. (zie exacte waarde op flaconetiket)	1 flacon gevriesdroogd	Voeg 250 µl gedestilleerd water toe
[CONTROL 2] Controle 2 Gevriesdroogd 25OH vitamine D-arm humaan serum verrijkt met vrij vitamine D incl. Proclin en BND. (zie exacte waarde op flaconetiket)	1 fles gevriesdroogd	Voeg 250 µl gedestilleerd water toe
[WASH SOLN CONC] Wasoplossing (TRIS-HCl)	1 fles 10 ml	Verdun 200x met gedestilleerd water Gebruik een magneetroerder
[CHROM TMB] Chromogene oplossing TMB (Tetramethylbenzydine)	1 fles 14 ml	Klaar voor gebruik
[STOP SOLN] Stopreagens 1M HCl.	1 fles 14 ml	Klaar voor gebruik
[Ag BIOT SOLN] Biot-Vit D verdunningsbuffer Buffer met Proclin en BND.	1 fles 14,5 ml	Klaar voor gebruik

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

Het volgende materiaal is vereist, maar wordt niet meegeleverd in de set:

- Gedestilleerd water
- Pipetten gekalibreerd voor aflevering van 10 µl, 35 µl - 250 µl, 3500 µl - 5000 µl (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen).
- Vortex mixer
- Magnetische roerder
- Plaatschudincubator bij 37 °C en 650 RPM.
- Wasmachine voor microplaten
- Microtiterplaatlezer in staat tot lezen bij 450 nm en 650 nm (bichromatische lezing)

VII. VOORBEREIDING REAGENS

Laat alle reagentia minstens 30 minuten vóór gebruik op kamertemperatuur (18-25°C) komen.

- Kalibrators:** reconstitueer de kalibrators met 250 µl gedestilleerd water en laat ze gedurende 15 minuten rusten op kamertemperatuur (18-25°C). Na reconstitutie, goed mengen en ervoor zorgen dat alle gevriesdroogd materiaal gereconstitueerd werd.
- Controls:** reconstitueer de controls met 250 µl gedestilleerd water en laat ze gedurende 15 minuten rusten op kamertemperatuur (18-25°C). Na reconstitutie, goed mengen en ervoor zorgen dat alle gevriesdroogd materiaal gereconstitueerd werd.
- Werkende wasoplossing:** Bereid een voldoende volume werkende wasoplossing door 199 volumes gedestilleerd water toe te voegen aan één volume 200x geconcentreerde wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder om te homogeniseren. Gooi ongebruikte wasoplossing aan het einde van de dag weg.
- Werken Biot-Vit D-oplossing:** Bereid een aangepast werkverdunningsvolume van het Biot-Vit D-reagens door 100x geconcentreerd Biot-Vit D reagens te mengen met Biot-Vit D verdunningsbuffer afhankelijk van het aantal gebruikte strips, zoals aangegeven in onderstaande tabel, bijvoorbeeld voor 6 strips (48 putjes): 60 µl 100x geconcentreerd Biot-Vit D reagens wordt toegevoegd aan 6,0 ml Biot-Vit D verdunningsbuffer. Gebruik een geschikte polypropyleen container voor de bereiding. De bereiding van werkende Biot-Vit D-oplossing is niet stabiel en moet worden weggegooid als deze niet wordt gebruikt.

Aantal strips	100x Biot-Vit D reagens (µl)	Biot-Vit D verdunningsbuffer (ml)
3	35	3,5
4	40	4,0
5	50	5,0
6	60	6,0
7	70	7,0
8	80	8,0
9	90	9,0
10	100	10,0
11	110	11,0
12	120	12,0

Alle andere meegeleverde reagentia zijn klaar voor gebruik. Gebruik geen plaatverzegeling tijdens de incubatiestappen.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Bescherm het streptavidine-HRP reagens en Chromogene oplossing TMB tegen licht.
- Bewaar geen verdund Biotin-Vit D reagens, verdund alleen de benodigde hoeveelheid.
- Na openen, de foliezak met de microtiterplaat en silicagel zakje hersluiten (stabiel gedurende maximaal 2 weken bij 2-8 °C).
- Na reconstitutie zijn kalibrators en controles gedurende 2 weken stabiel bij 2 - 8 °C.
- Ongebruikte wasoplossing moet aan het eind van de dag worden weggegooid.

Kit component	Stabiliteit bij gebruik
Anti-vitamine D gecoate plaat	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C
Monsterverdunningsmiddel	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C

Kit component	Stabiliteit bij gebruik
100x Biot-Vit D reagens	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C
Streptavidine-HRP reagens	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C
Kalibrator 1-6	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C
Controle 1-2	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C
Werking wasoplossing	1 dag bij kamertemperatuur.
Chromogene oplossing TMB	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C
Stopreagens	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C
Biot-Vit D verdunningsbuffer	Maximaal 2 weken bij 2-8 °C

IX. MONSTERAFFNAME EN -BEREIDING

- Deze kit is geschikt voor serummonsters.
- Serummonsters moeten bij 2 - 8 °C worden bewaard.
- Als de test niet binnen 24 uur wordt uitgevoerd, wordt bemonstering en opslag bij -20 °C aanbevolen.
- Vermijd herhaald invriezen/ontdooien. Meng de monsters goed na het ontdooien en vóór het testen.

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum.

Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur (18-25°C) komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien.

Voer kalibrators, controles en monsters in dubbel uit. Een verticale opstelling wordt aanbevolen.

Gebruik een proper plastic recipiënt om de Wasoplossing in te bereiden.

Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbaar pipetpunt gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Vermijd voor het toevoegen van de Chromogene Oplossing en de Stopoplossing pipetten met onderdelen van metaal.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteapparatuur zullen de precisie verhogen.

Respecteer de incubatietijden.

Om drift te voorkomen, moet de tijd tussen het pipetteren van de eerste kalibrator en het laatste monster worden beperkt tot de tijd vermeld in sectie XIII paragraaf D (Tijdvertraging).

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

Breng de Chromogene Oplossing aan binnen de 15 minuten na het wassen van de microtiterplaat.

Tijdens de incubatie met de Chromogene Oplossing moet direct contact met zonlicht vermeden worden.

Elke put kan maar één keer worden gebruikt.

B. Procedure

1. Selecteer het vereiste aantal strips voor de run. De ongebruikte strips moeten met een droogmiddel in de zak worden verzegeld en bij 2 - 8 °C worden bewaard.
2. Bevestig de strips in het bevestigingsframe.
3. Pipetteer 90 µl monsterverdunningsmiddel in alle putjes.
4. Pipetteer 10 µl van elke gereconstitueerde kalibrator, controle of monster in tweevoud in de juiste putjes (gebruik een nieuwe pipetpunt voor elke kalibrator, controle of monster).
5. Incubeer de plaat 90 minuten bij 37°C, schudden bij 650 RPM.
6. Was de plaat drie keer met 350 µl werkende wasoplossing.
7. Pipetteer 100 µl werkende Biot-Vit D-oplossing in alle putjes.
8. Incubeer de plaat 30 minuten bij 37°C, schudden bij 650 RPM.
9. Was de plaat drie keer met 350 µl werkende wasoplossing.
10. Pipetteer 100 µl streptavidine-HRP-reagens in alle putjes.
11. Incubeer de plaat 20 minuten bij 37°C, schudden bij 650 RPM.
12. Was de plaat drie keer met 350 µl werkende wasoplossing.
13. Pipetteer 100 µl van het chromogene oplossing TMB in alle putjes.
14. Incubeer de plaat gedurende 15 minuten op kamertemperatuur (18-25°), stationair en beschermd tegen licht.
15. Pipetteer 100 µl van het stopreagens in het putje.
16. Lees de absorbanties bij 450 nm (referentiefilter 630 nm of 650 nm) binnen 5 minuten en bereken de resultaten zoals beschreven in sectie XI.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Lees de plaat op 450 nm tegen een referentiefilter gezet op 650 nm (of 630 nm).
2. Bereken het gemiddelde van de dubbele bepalingen.

3. We raden het gebruik van computerondersteunde methoden aan om de kalibratiecurve te construeren. Logistische functie-curve-aanpassing met 4 parameters is de geprefereerde methode. Weigeren duidelijke uitschieters.
4. Bepaal door interpolatie van de OD-monsterwaarden de vrije 25OH-vitamine D-concentraties van de monsters uit de kalibratiecurve.

XII. TYPISCHE WERTE

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

Free 25OH Vitamin D ELISA		OD-units
Kalibrator	0,9 pg/ml	2,16
	3,1 pg/ml	1,71
	6,5 pg/ml	1,21
	11,6 pg/ml	0,83
	23,2 pg/ml	0,45
	40,3 pg/ml	0,23

Nota : 1 pg/ml = 2,5 pmol/l

XIII. PRESTATIE EN BEPERKINGEN

A. Detectiegrenzen

De Limit of Blank (LoB) en de Limit of Detection (LoD) werden bepaald door mOD om te zetten in pg/ml-waarden met standaardcurvevergelijking.

De LoB werd berekend op 1,86 pg / ml.

De LoD werd berekend op 2,38 pg / ml.

B. Specificiteit

Kruisreactiviteit van het antilichaam gebruikt in de Free 25OH Vitamin D ELISA werd bepaald door de leverancier zoals weergegeven in de volgende tabel.

Samenstelling en concentratie	% Kruisreactie
25OH-Vitamine D ₃ , 10 ng/ml	100
25OH-Vitamine D ₂ , 10 ng/ml	86
1, 25 (OH) ₂ -Vitamine D ₃ , 200 ng/ml	20
1, 25 (OH) ₂ -Vitamin D ₂ , 690 ng/ml	1,9
Vitamine D ₃ , 200 ng/ml	2,9
Vitamine D ₂ , 200 ng/ml	1,3
24, 25 (OH) ₂ -Vitamine D ₃ , 20 ng/ml	>100
25OH-Vitamine D ₃ , 10 ng/ml	100
25OH-Vitamine D ₂ , 10 ng/ml	86

Het effect van mogelijk interfererende stoffen op monsters getest met de DIASource Free 25OH Vitamin D ELISA-kit werd geëvalueerd volgens CLSI EP07-A2. Ascorbinezuur, niet-geconjugerd bilirubine, HAMA, reumatoïde factor, hemoglobine, triglyceriden, biotine en cholesterol werden getest in monsters met verschillende concentraties aan vrij 25OH vitamine D. De geteste stoffen hadden geen invloed op de prestaties van de Free 25OH Vitamin D ELISA.

Stof	Concentratie van interfererende stof	Vrij 25OHvitamine D (pg/ml)	Gemiddeld % Interferentie
Ascorbinezuur	[3mg/dl]	6,5	1%
		11,1	-1%
		16,7	0%
Niet-geconjugerd bilirubine	[20mg/dl]	6,6	-6%
		11,2	1%
		15,7	-3%
HAMA	[2µg/ml]	6,6	-5%
		10,5	2%
		15,1	2%
Reumatoïde Factor	[600IU/ml]	6,6	-1%
		10,5	-3%
		15,1	-6%
Hemoglobine	[200mg/dl]	6,9	-8%
		11,2	-8%
		17,0	-10%
Triglyceriden	[37mmol/l]	6,8	-5%
		11,1	-5%
		16,2	-5%
Biotine	[4mg/dl]	6,5	1%

Stof	Concentratie van interfererende stof	Vrij 25OH Vitamine D (pg/ml)	Gemiddeld % Interferentie
		10,6	4%
		15,7	1%
Cholesterol	[13mmol/l]	6,4	0%
		10,6	-1%
		16,8	-3%

C. Precisie

Reproduceerbaarheid en herhaalbaarheidsnauwkeurigheden werden geëvalueerd met twee monsters bij gemiddelde en hoge concentraties. Hun concentraties werden in 10 verschillende runs in tweevoud gemeten voor reproduceerbaarheid en in één run voor reproduceerbaarheidsnauwkeurigheid.

Monster	N	pg/ml		Reproduceerbaarheid Precisie (totaal aantal runs)
Pool 1	20	8.22	SD	0.45
			CV	5.5%
Pool 2	20	29.42	SD	3.00
			CV	10.2%

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

Monster	N	pg/ml		Herhaalbaarheid Precisie (binnen een run)
Pool 1	12	9.02	SD	0.32
			CV	3.5%
Pool 2	12	32.38	SD	0.64
			CV	2.0%

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Tijdsvertraging

De tijdsvertragingstest tussen de laatste kalibrator- en monsterdispensingresultaten wordt getoond in volgende tabel.

TIJDSVERTRAGING					
	0 min (pg/ml)	5 min (pg/ml)	10 min (pg/ml)	15 min (pg/ml)	20 min (pg/ml)
Monster 1	5.60	5.68	5.70	5.46	5.71
Monster 2	13.17	14.70	13.07	14.27	13.38

De analyseresultaten blijven nauwkeurig, zelfs wanneer een monster wordt afgegeven 20 minuten nadat de kalibrator in de beklede putjes is toegevoegd.

E. Beperkingen van de test

- De test is een hulpmiddel bij de diagnose en moet worden gebruikt in combinatie met klinische bevindingen.
- De prestaties van deze assay zijn niet vastgesteld bij pediatrische patiënten.

F. Vergelijking van methoden

De correlatie tussen het resultaat van de analyse van symmetrische dialyse vs. Free 25OH Vitamin D ELISA is 0,9916.

G. Gevalideerd concentratie-interval

Het gevalideerde concentratie-interval van de Free 25OH Vitamin D-test is 2,38 – 34.4 pg/ml Free 25OH Vitamin D.

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de

resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.

- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Controles die azide bevatten zullen de enzymatische reactie beïnvloeden en mogen niet worden gebruikt.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.
- Het wordt aanbevolen dat de Controles standaard getest worden als onbekende stalen om de variabiliteit van de test te meten. De prestaties van de test moeten gevolgd worden met kwaliteitscontrolefiches van de controles.
- Het wordt aanbevolen de curve geselecteerd door de computer visueel na te kijken.

XV. VERWACHTE WAARDEN

Een referentiebereik werd bepaald op basis van 109 ogenschijnlijk gezonde personen. De serummonsters van de individuele patiënten die werden gebruikt, werden in Nederland verkregen van een lokale bloedbank met geïnformeerde toestemming. De monsters werden afgenomen tijdens de zomer. De volgende tabel geeft een overzicht van de resultaten:

	Vrij vitamine D concentratie (pg/ml)
Hoogste vastgestelde concentratie	17,1
Laagste vastgestelde concentratie	<2,4
Mediane vastgestelde concentratie	5,1
Gemiddelde vastgestelde concentratie	5,4

De indeling van de vitamine D-status is gebaseerd op berekeningen uitgevoerd door DIAsource, op basis van de algemeen aanvaarde cut-offwaarden voor de totale hoeveelheid vrij circulerende 25OH-vitamine D, en op basis van het percentage vrij circulerende 25OH-vitamine D, en de lineaire correlatie tussen beide parameters, die in een grote normale populatie is vastgesteld.

Het gebruik van deze cut-offwaarden door de laboratoria gebeurt op hun verantwoordelijkheid aangezien deze waarden nog niet door internationale organisaties zijn vastgelegd. Er bestaat echter ook geen consensus over de totale 25OH-vitamine D-cut-offwaarden.

N = 279 (normale populatie)

Eerste berekeningsmethode, % Vrij circulerende 25OH Vitamine D = 0,020%.

Tweede berekeningsmethode, Vrij circulerende 25OH Vitamine D = 0,138 Totaal 25OH Vitamine D + 1,4 pg/ml

Mediaan van de twee berekeningswijzen:

Niveau	Cut-off gebruikt voor Totaal 25OH Vitamine D (ng/ml)	Voorgestelde cut-off voor Vrij circulerende 25OH Vitamine D (pg/ml)
Tekort	<10	<2,4
Onvoldoende	10-29	2,4-5,8
Voldoende	30-100	>5,8

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serummonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

Vermijd enig contact van de huid met alle reagentia. De Stopoplossing bevat HCl. In geval van contact, grondig wassen met water.

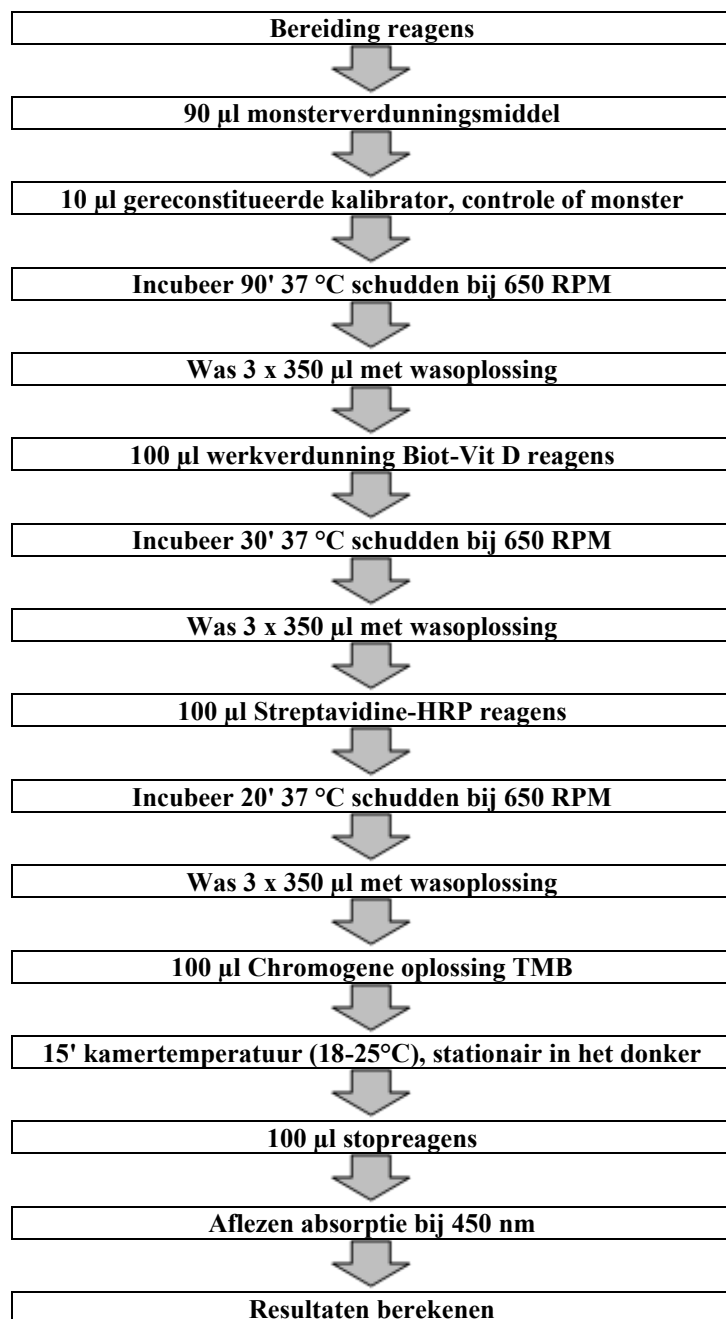
Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkrimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

Voor meer informatie, zie Material Safety Data Sheet (MSDS)

XVII. REFERENTIES

1. BOUILLON R. (2016), Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial genotypic associations, JCEM, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-1104>.
2. SOLLID S.T. (2016), Effects of vitamin D binding protein phenotypes and vitamin D supplementation on serum total 25(OH) D and directly measured free 25(OH)D, Eur. J. Endocrinol. April 1, 174:445-452.
3. TANGPRICHA V. (2015), Free 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Cystic Fibrosis, Am. J. Med. Sci. 2015 Nov;350(5):374-9.
4. ALOIA J. (2015), Free 25(OH)D and the Vitamin D Paradox in African Americans, J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015 Jul 10:JC20152066.
5. SCHWARTZ J.B. (2014), A comparison of direct and calculated free 25(OH) Vitamin D levels in clinical populations, J. Clin. Endocrinol. Metab., 99(5):1631-7.
6. BIKLE D. (2013), Variability in free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., S09600760.
7. BIKLE D., Gee E, Halloran B, Haddad JG. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. J Clin Invest 1984;74:1966-71.
8. VAN HOOFF H.J., Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. Anal Biochem. 1998 May 1;258(2):176-83.

XVIII. SAMENVATTING PROTOCOL





Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

Free 25OH Vitamin D ELISA

I. VERWENDUNGSZWECK

Der DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA ist ein in vitro diagnostisches Medizinprodukt, das von medizinischem Fachpersonal zur quantitativen Messung von freiem 25OH Vitamin D in Humanserum verwendet werden kann und für Screening- und Überwachungszwecke verwendet werden kann.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA Kit
- B. **Katalognummer :** KAPF1991 : 96 tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgium.

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

Aufgrund der hydrophoben Natur zirkulieren 25OH Vitamin D und andere Vitamin D-Metaboliten auf bindenden Proteinen. Etwa 90 % des gesamten zirkulierenden 25OH-Vitamins D sind an das so genannte VDBP oder DBP gebunden. Die restlichen 10 % sind an Albumin, das Hauptprotein des Humanplasmas, gebunden. Obwohl die Affinität von Albumin gegenüber 25OH Vitamin D viel geringer ist als die Affinität von VDBP, gleicht die hohe Konzentration von Albumin diesen Unterschied aus. Eine winzige Fraktion, die 0,04 % der gesamten 25OH-Vitamin-D-Konzentration ausmacht, zirkuliert als freie Form.


Die Umwandlung von 25OH Vitamin D in das biologisch aktive 1,25(OH)₂ Vitamin D findet in den Zellen statt und erfordert daher die Internalisierung von 25OH Vitamin D aus der extrazellulären Flüssigkeit. Wahrscheinlich sind verschiedene Transportmechanismen beteiligt, und einige von ihnen beinhalten die Konzentration des freien Liganden als einen der wichtigen Parameter. In diesen Fällen bezieht sich der Anteil des freien 25OH-Vitamins D auf die biologische Aktivität von Vitamin D und spiegelt daher möglicherweise die physiologische Wirkung von Vitamin D besser wider als die Gesamtkonzentration von 25OH-Vitamin D.

Die Fraktion des freien 25OH-Vitamins D stellt etwa 0,04 % der Gesamtkonzentration von 25OH-Vitamin D dar. Dieser Prozentsatz ist jedoch nicht konstant und variiert je nach den verschiedenen Bedingungen. Obwohl der Albuminspiegel bei Individuen tendenziell stabil ist, kann die VDBP-Konzentration unter verschiedenen Bedingungen schwanken und somit den Anteil des freien 25OH-Vitamins D beeinflussen. Eine Schwangerschaft führt zu einem Anstieg des VDBP-Spiegels um etwa 50 %, während z. B. Leberversagen und chronische Nierenerkrankungen ebenfalls zu einem Rückgang der VDBP-Konzentration um etwa 50 % führen. Im Falle einer erhöhten Konzentration an bindenden Proteinen ist der Anteil an freiem 25OH-Vitamin D niedriger, und umgekehrt im Falle einer niedrigen Konzentration an bindenden Proteinen. Unter diesen und den später aufgeführten Bedingungen kann die Messung des freien 25OH-Vitamins D ein besserer Marker für die Vitamin-D-Aktivität sein als die klassische Messung des gesamten 25OH-Vitamins D. Neben variablen Konzentrationen gibt es VDBP auch in verschiedenen polymorphen Formen. Die Affinität der verschiedenen VDBP-Formen zu 25OH Vitamin D kann unterschiedlich sein, obwohl dies noch diskutiert wird. Eine polymorphe Form mit einer hohen Affinität für 25OH-Vitamin D wird den Anteil des verfügbaren freien 25OH-Vitamins D verringern. Umgekehrt führt eine VDBP-Form mit niedriger Affinität zu höheren Gehalten an freiem 25OH-Vitamin D.

IV. GRUNDSÄTZE DES VERFAHRENS

Der ELISA für freies 25-OH-Vitamin-D basiert auf einem zweistufigen Immunoassayverfahren, das mit einer Mikrotiterplatte durchgeführt wird. Während des ersten Inkubationsschritts wird freies 25-OH-Vitamin D [25(OH)Vitamin D2 und D3] an den Anti-Vitamin-D-Antikörper gebunden, mit dem die Mikrotiterplattenwells beschichtet sind. Das in vivo Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem 25-OH-Vitamin D wird geringfügig gestört. Nach dem Waschen wird in jeden Well eine festgelegte Menge an biotinyliertem 25-OH-Vitamin D gegeben. Das ungebundene biotinylierte 25-OH-Vitamin D wird durch das Waschen entfernt und ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat hinzugegeben. Im nächsten Schritt wird chromogenes TMB-Substrat hinzugefügt. Die Reaktion wird schließlich durch Hinzugabe von Stopplösung gestoppt, und die Absorption [A450nm] wird mit einem Platten-Spektrophotometer gemessen. Die Konzentration des freien 25-OH-Vitamin D (pg/ml) in der Probe ist umgekehrt proportional zur Absorption in jedem Probenwell.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests Kit	Rekonstitution
 Mit Anti-Vitamin-D-Antikörper beschichtete Platte Mit monoklonalem anti-25-OH-D2/D3 Maus-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte.	96 Wells	gebrauchsfertig
[DIL SPE] Probenverdünnung Probenverdünnungsmittel mit einem Fluortensid und ProClin.	1 Fläschche 14 ml	gebrauchsfertig
[Ag BIOT CONC] 100x Biot-Vit D Reagenz Biotinyliertes 25-OH-Vitamin D in Konservierungspuffer.	1 Fläschche 250 µl	100 x mit Biot-Vit D Verdünnungspuffer verdünnen
[SAV HRP] Streptavidin-HRP Reagenz Peroxidase-konjugiertes Streptavidin mit ProClin.	1 Fläschche 14 ml	gebrauchsfertig
[CAL N] Kalibratoren ; N = 1 to 6 Lyophilisiertes, mit 25-OH-Vitamin D angereichertes Vitamin-D-depletiertes Humanserum mit ProClin und BND. (siehe genauen Wert auf dem Fläschchenetikett)	6 Fläschchen lyophilisiert	250 µl destilliertem Wasser hinzufügen
[CONTROL 1] Kontrolle 1 Lyophilisiertes normales Humanserum mit ProClin und BND. (siehe genauen Wert auf dem Fläschchenetikett)	1 Fläschche lyophilisiert	250 µl destilliertem Wasser hinzufügen
[CONTROL 2] Kontrolle 2 Lyophilisiertes, mit 25-OH-Vitamin D angereichertes Humanserum mit ProClin und BND. (siehe genauen Wert auf dem Fläschchenetikett)	1 Fläschche lyophilisiert	250 µl destilliertem Wasser hinzufügen
[WASH SOLN CONC] Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Fläschche 10 ml	200x mit destilliertem Wasser verdünnen. Verwenden Sie einen Magnetrührer.
[CHROM TMB] Chromogene Lösung TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Fläschche 14 ml	gebrauchsfertig

Reagenzien	96 Tests Kit	Rekonstitution
[STOP SOLN] Stopplösung 1M HCl.	1 Fläschche 14 ml	gebrauchsfertig
[Ag BIOT SOLN] Biot-Vit D Verdünnungspuffer Puffer mit ProClin und BND.	1 Fläschche 14,5 ml	gebrauchsfertig

VI. NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN

Das folgende Material ist erforderlich, aber nicht im Kit enthalten:

- Destilliertes Wasser
- Kalibrierte Pipetten für die Abgabe von 10 µl, 35 µl - 250 µl, 3500 µl - 5000 µl (Die Verwendung genauer Pipetten mit Einweg-Kunststoffspitzen wird empfohlen.)
- Vortex-Mischer
- Magnetrührwerk
- Schüttelinkubator für 37 °C und 650 U/min.
- Mikrotiterplatten Washer
- Mikrotiterplattenleser, der bei 450 und 650 nm abliest (bichromatische Ablesung)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Mindestens 30 Minuten vor Gebrauch alle Reagenzien auf Raumtemperatur (18-25°C)bringen.

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 250 µl destilliertem Wasser. und 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stehen lassen. Nach der Rekonstitution gut durchmischen und sicherstellen, dass alle Lyophilisate rekonstituiert wurden.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 250 µl destilliertem Wasser. und 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) stehen lassen. Nach der Rekonstitution gut durchmischen und sicherstellen, dass alle Lyophilisate rekonstituiert wurden.
- Arbeitswaschlösung:** Bereiten Sie eine ausreichende Menge Arbeitswaschlösung vor, indem Sie 199 Volumenteile destilliertes Wasser zu einem Volumen 200-fach konzentrierter Waschlösung hinzufügen. Zum Homogenisieren einen Magnetrührer verwenden. Entsorgen Sie nicht verwendete Gebrauchswaschlösung am Ende des Tages.
- Biot-Vit D-Arbeitslösung:** Ein für die Anzahl der verwendeten Streifen ausreichendes Volumen Arbeitsverdünnung vorbereiten, indem 100x konzentriertes Biot-Vit D-Reagenz mit Biot-Vit D-Verdünnungspuffer gemischt wird (siehe nachfolgende Tabelle): zum Beispiel für 6 Streifen (48 Wells): 60 µl 100x konzentriertes Biot-Vit D-Reagenz in 6,0 ml Biot-Vit D Verdünnungspuffer geben.
Zur Vorbereitung einen geeigneten PP-Behälter verwenden.
Die Herstellung der funktionierenden Biot-Vit D-Lösung ist nicht stabil und muss verworfen werden, wenn sie nicht verwendet wird.

Anzahl Streifen	100x Biot-Vit D Reagenz (µl)	Biot-Vit D Verdünnungspuffer (ml)
3	35	3,5
4	40	4,0
5	50	5,0
6	60	6,0
7	70	7,0
8	80	8,0
9	90	9,0
10	100	10,0
11	110	11,0
12	120	12,0

Alle anderen im Lieferumfang enthaltenen Reagenzien sind gebrauchsfertig. Während der Inkubation Platte nicht verschließen.

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.
- Das Streptavidin-HRP Reagenz und das Chromogene Lösung TMB vor Licht schützen.

- Verdünntes Biotin-Vit D-Reagenz nicht lagern, nur die gewünschte Menge verdünnen.
- Den geöffneten Folienbeutel mit der Mikrotiterplatte und dem Trockenmittel wieder verschließen (bei 2-8 °C maximal 2 Wochen stabil).
- Nach Rekonstituierung sind die Kalibratoren und Verträge für 2 Wochen bei 2 bis 8 °C stabil.
- Nicht verwendete Gebrauchswaschlösung sollte am Ende des Tages entsorgt werden.

Kitkomponenten	Stabilität nach Anbruch
Mit Anti-Vitamin-D -Antikörper beschichtete Platte	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C
Probenverdünnung	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C
100x Biot-Vit D Reagenz	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C
Streptavidin-HRP Reagenz	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C
Kalibrator 1-6	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C
Kontrolle 1-2	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C
Arbeitswaschlösung	1 Tag bei Raumtemperatur.
Chromogene Lösung TMB	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C
Stopp-Reagenz	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C
Biot-Vit D Verdünnungspuffer	Maximal 2 Wochen bei 2-8 °C

IX. PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

- Dieses Kit ist für Serumproben geeignet.
- Serumproben müssen bei 2 - 8 °C aufbewahrt werden.
- Wenn der Test nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt wird, wird eine Probenahme und Lagerung bei -20 °C empfohlen.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden. Nach dem Auftauen und vor der Durchführung des Tests die Proben gut durchmischen.

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 (18-25°C). 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 D (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 chromogene Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

Jeder Brunnen kann nur einmal verwendet werden.

B. Durchführung

1. Wählen Sie die gewünschte Anzahl von Streifen für den Lauf. Die nicht verwendeten Streifen sollten mit einem Trockenmittel im Beutel wieder verschlossen und bei 2 - 8 °C gelagert werden.
2. Befestigen Sie die Streifen im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie 90 µl Probenverdünnungsmittel in alle Vertiefungen.
4. Pipettieren Sie 10 µl jedes rekonstituierten Kalibrators, jeder Kontrolle oder Probe doppelt in die entsprechenden Vertiefungen (verwenden Sie für jeden Kalibrator, jede Kontrolle oder Probe eine neue Pipettenspitze).
5. Die Platte 90 Minuten bei 37 °C inkubieren und mit 650 U/min schütteln.
6. Die Platte 3 Mal mit 350 µl funktionierende Waschlösung.
7. Pipettieren Sie 100 µl Biot-Vit D-Arbeitslösung in alle Vertiefungen.
8. Die Platte 30 Minuten bei 37 °C inkubieren und mit 650 U/min schütteln.
9. Die Platte 3 Mal mit 350 µl funktionierende Waschlösung.
10. Pipettieren Sie 100 µl Streptavidin-HRP-Reagenz in alle Vertiefungen.
11. Die Platte 20 Minuten bei 37 °C inkubieren und mit 650 U/min schütteln.
12. Die Platte 3 Mal mit 350 µl funktionierende Waschlösung.
13. Pipettieren Sie 100 µl des Chromogene Lösung TMB in alle Vertiefungen.
14. Die Platte 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren, nicht bewegen und vor Licht schützen.
15. Pipettieren Sie 100 µl des Stop-Reagens in die gesamte Vertiefung.

16. Lesen Sie die Absorption bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb von 5 Minuten 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 freien 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.

Free 25OH Vitamin D ELISA		Absorptionseinheiten
Kalibrator	0,9 pg/ml	2,16
	3,1 pg/ml	1,71
	6,5 pg/ml	1,21
	11,6 pg/ml	0,83
	23,2 pg/ml	0,45
	40,3 pg/ml	0,23

Bemerkung: 1 pg/ml = 2,5 pmol/l

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN

A. Nachweisgrenzen

Die Grenzwertgrenze (LoB) und die Nachweisgrenze (LoD) wurden durch Umrechnung von MOD in pg/ml-Werte mit der Standardkurvengleichung bestimmt. Der LoB wurde zu 1,86 pg / ml berechnet.

Die LoD wurde zu 2,38 pg / ml berechnet.

B. Spezifität

Die vom Lieferanten bestimmte Kreuzreaktivität des für den ELISA-Assay zur Bestimmung von freiem 25-OH-Vitamin D verwendeten Antikörpers ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Verbindung und Konzentration	% Kreuzreaktion
25-OH-Vitamin D3 bei 10 ng/ml	100
25-OH-Vitamin D2 bei 10 ng/ml	86
1, 25 (OH)2-Vitamin D3 bei 200 ng/ml	20
1, 25 (OH)2-Vitamin D2 bei 690 ng/ml	1,9
Vitamin D3 bei 200 ng/ml	2,9
Vitamin D2 bei 200 ng/ml	1,3
24, 25 (OH)2-Vitamin D3 bei 20 ng/ml	>100
25, 26 (OH)2-Vitamin D3 bei 4 ng/ml	>100
3-epi-25-OH-Vitamin D3 bei 20 µg/ml	0,1

Die Auswirkung potenziell störender Substanzen auf die die mit dem DIASource Free 25OH Vitamin D ELISA-Kit getesteten Proben wurde gemäß CLSI EP07-A2 untersucht. Ascorbinsäure, unkonjugiertes Bilirubin, HAMA, Rheumafaktor, Hämoglobin, Triglyceride, Biotin und Cholesterin wurden in Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen von freiem 25-OH-Vitamin D untersucht. Die untersuchten Substanzen beeinträchtigten die Leistung des ELISA für freies 25-OH-Vitamin D nicht.

Substanzen	Konzentration von	Freies 25-OH-Vitamin D (pg/ml)	Durchschnittliche Interferenz in %
Ascorbinsäure	[3mg/dl]	6,5	1%
		11,1	-1%
		16,7	0%
Unkonjugiertes Bilirubin	[20mg/dl]	6,6	-6%
		11,2	1%
		15,7	-3%
HAMA	[2µg/ml]	6,6	-5%
		10,5	2%
		15,1	2%

Substanzen	Konzentration von	Freies 25-OH-Vitamin D (pg/ml)	Durchschnittliche Interferenz in %
Rheumafaktor	[600IU/ml]	6,6	-1%
		10,5	-3%
		15,1	-6%
Hämoglobin	[200mg/dl]	6,9	-8%
		11,2	-8%
		17,0	-10%
Triglyceride	[37mmol/l]	6,8	-5%
		11,1	-5%
		16,2	-5%
Biotin	[4mg/dl]	6,5	1%
		10,6	4%
		15,7	1%
Cholesterol	[13mmol/l]	6,4	0%
		10,6	-1%
		16,8	-3%

C. Präzision

Die Reproduzierbarkeit und die Wiederholpräzision wurden mit zwei Proben in mittleren und hohen Konzentrationen bewertet. Ihre Konzentrationen wurden in 10 verschiedenen Läufen in zweifacher Ausführung für die Reproduzierbarkeit und in einem einzigen Lauf für die Wiederholpräzision gemessen.

Probe	N	pg/ml		Reproduzierbarkeit Präzision (Gesamtdurchläufe)
Pool 1	20	8.22	SD	0.45
			CV	5.5%
Pool 2	20	29.42	SD	3.00
			CV	10.2%

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

Probe	N	pg/ml		Reproduzierbarkeit Präzision (innerhalb eines Laufs)
Pool 1	12	9.02	SD	0.32
			CV	3.5%
Pool 2	12	32.38	SD	0.64
			CV	2.0%

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Zeitverzögerung

Die Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

ZEITVERZÖGERUNG					
	0 min (pg/ml)	5 min (pg/ml)	10 min (pg/ml)	15 min (pg/ml)	20 min (pg/ml)
Probe 1	5.60	5.68	5.70	5.46	5.71
Probe 2	13.17	14.70	13.07	14.27	13.38

Die Testergebnisse bleiben auch dann genau, wenn eine Probe 20 Minuten nach dem Hinzufügen des Kalibrators in die beschichteten Vertiefungen abgegeben wird.

E. 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.

F. Methodenvergleich

Die Korrelation zwischen dem Analyseergebnis der Dialyserate und freiem 25-OH-Vitamin D ELISA beträgt 0,9916.

G. Validiertes Konzentrationsintervall

Das validierte Konzentrationsintervall des Assays für freies 25-OH-Vitamin D liegt zwischen 2,38 und 34.4 pg/ml freiem 25-OH-Vitamin D.

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 zufrieden stellende 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. ERWARTETE WERTE

Nahrungsaufnahme, Rasse, Jahreszeit und Alter haben einen Einfluss auf die Normalwerte des 25OH-Vitamin D.

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

Es wurde ein Referenzbereich auf Grundlage von 109 offensichtlich gesunden Menschen festgelegt. Die verwendeten Patientenserumproben wurden mit informierter Einwilligung von einer lokalen Blutbank in den Niederlanden bezogen. Die Proben wurden im Sommer entnommen. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst:

	Konzentration an freiem Vitamin D (pg/ml)
Höchste beobachtete Konzentration	17,1
Niedrigste beobachtete Konzentration	<2,4
Mittlere beobachtete Konzentration	5,1
Durchschnittliche beobachtete Konzentration	5,4

Die Einstufung des Vitamin D-Status wurde auf der Grundlage der von DIAsource durchgeführten Berechnungen anhand der allgemein akzeptierten Grenzwerte für das gesamte 25OH-Vitamin D und des prozentualen Anteils an freiem 25OH-Vitamin D sowie der linearen Korrelation zwischen beiden Parametern, die in einer großen Normalpopulation ermittelt wurde, festgelegt.

Diese Grenzwerte sollen von den Laboratorien in eigener Verantwortung verwendet werden, da sie von den internationalen Gesellschaften noch nicht festgelegt worden sind. Allerdings gibt es auch keinen Konsens über die gesamten Grenzwerte für 25OH-Vitamin-D.

N = 279 (Normalpopulation)

Erste Berechnungsmethode, % Freies 25OH Vitamin D = 0.020 %

Zweite Berechnungsmethode, Freies 25OH Vitamin D = 0.138 Gesamt 25OH Vitamin D + 1.4 pg/ml

Mittelwert der beiden Berechnungsmethoden:

Menge	Grenzwert verwendet für Gesamt 25OH Vitamin D (ng/ml)	Vorgeschlagener Grenzwert für Freies 25OH Vitamin D (pg/ml)
Mangel	<10	<2,4
Unzulänglichkeit	10-29	2,4-5,8
Ausreichend	30-100	>5,8

XVI. VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE

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 Stopplösung enthält HCl. Im Kontaktfall muss sorgfältig mit Wasser abgewaschen werden.

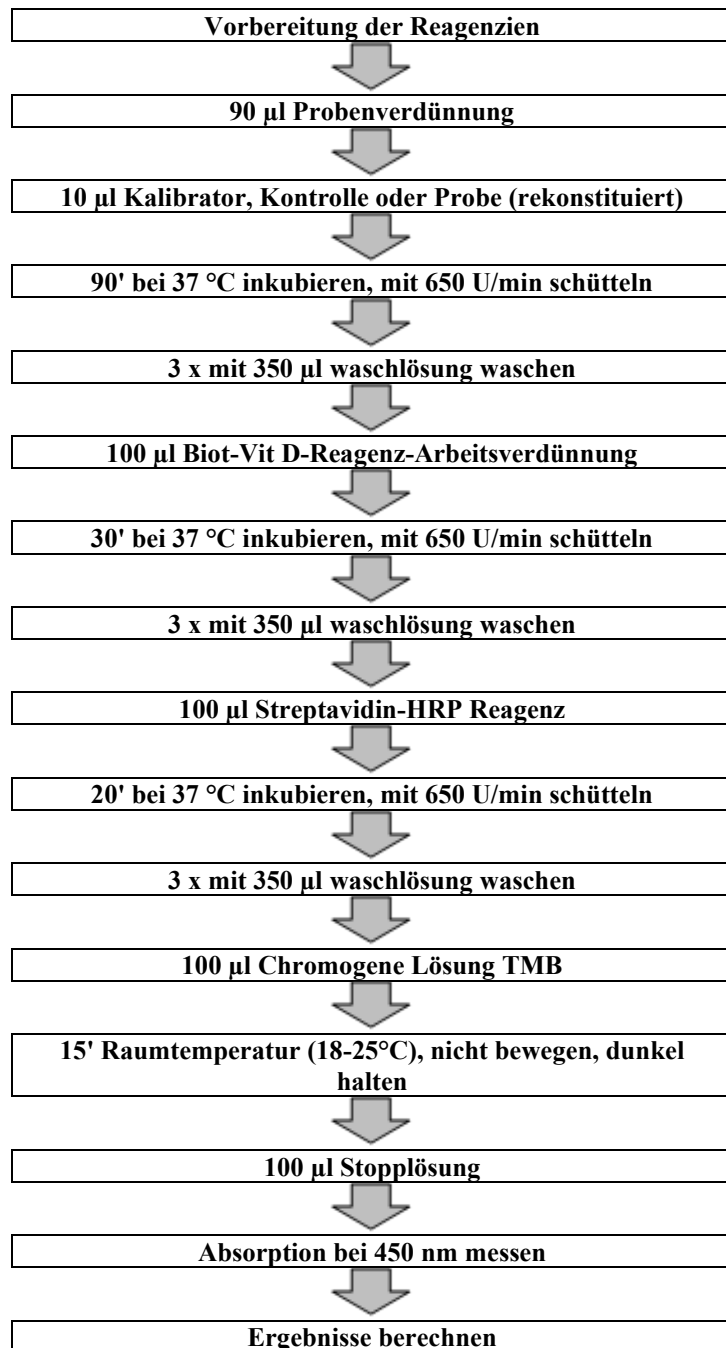
Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).

XVII. LITERATUR

1. BOUILLON R. (2016), Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial genotypic associations, JCEM, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-1104>.
2. SOLLID S.T. (2016), Effects of vitamin D binding protein phenotypes and vitamin D supplementation on serum total 25(OH) D and directly measured free 25(OH)D, Eur. J. Endocrinol. April 1, 174:445-452.
3. TANGPRICHA V. (2015), Free 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Cystic Fibrosis, Am. J. Med. Sci. 2015 Nov;350(5):374-9.
4. ALOIA J. (2015), Free 25(OH)D and the Vitamin D Paradox in African Americans, J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015 Jul 10:JC20152066.
5. SCHWARTZ J.B. (2014), A comparison of direct and calculated free 25(OH) Vitamin D levels in clinical populations, J. Clin. Endocrinol. Metab., 99(5):1631-7.
6. BIKLE D. (2013), Variability in free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., S09600760.
7. BIKLE D., Gee E, Halloran B, Haddad JG. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. J Clin Invest 1984;74:1966-71.
8. VAN HOOFF H.J., Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. Anal Biochem. 1998 May 1;258(2):176-83.

XVIII. PROTOKOLLZUSAMMENFASSUNG





Leer el protocolo completo antes de usar.

Free 25OH Vitamin D ELISA

I. USO PREVISTO

El DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA es un dispositivo médico de diagnóstico in vitro destinado a ser utilizado por profesionales de la salud para la medición cuantitativa de 25OH Vitamina D libre en suero humano y puede usarse para fines de detección y monitoreo.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource Free 25OH Vitamin D ELISA Kit
- B. Número de Catálogo:** KAPF1991 : 96 tests
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2 B-1348 Louvain-la Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84 99 11

Fax : +32 (0)10 84 99 90

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

Debido a su naturaleza hidrófoba, la 25-hidroxivitamina D y otros metabolitos de la vitamina D se transportan a través de proteínas de unión. Aproximadamente el 90 % del total de 25-hidroxivitamina D circulante está unido a las denominadas VDBP o DBP. El 10 % restante está unido a la albúmina, la proteína principal del plasma sanguíneo humano. Aunque la afinidad de la albúmina hacia la 25-hidroxivitamina D es mucho menor que la afinidad de la VDBP, la alta concentración de albúmina compensa esta diferencia. Una pequeña fracción que representa el 0,04 % de la concentración total de 25-hidroxivitamina D circula de forma libre.


La conversión de la 25-hidroxivitamina D en 1,25-dihidroxivitamina D biológicamente activa tiene lugar en las células y, por lo tanto, requiere la entrada de la 25-hidroxivitamina D procedente del líquido extracelular. Es probable que participen distintos mecanismos de transporte y que algunos de ellos implique la concentración del ligando libre como uno de los parámetros importantes. En estos casos, la fracción de 25-hidroxivitamina D libre se relaciona con la actividad biológica de la vitamina D y, por lo tanto, puede reflejar mejor la acción fisiológica de la vitamina D que la concentración total de 25-hidroxivitamina D.

La fracción de 25-hidroxivitamina D libre representa aproximadamente el 0,04 % de la concentración total de 25-hidroxivitamina D. Sin embargo, este porcentaje no es constante y varía dependiendo de diversas condiciones. Aunque el nivel de albúmina tiende a ser estable entre personas, la concentración de la VDBP puede fluctuar dependiendo de varias circunstancias, por lo tanto, influye en la fracción de 25-hidroxivitamina D libre. Durante el embarazo se produce un aumento de aproximadamente el 50 % en los niveles de VDBP mientras que, por ejemplo, la insuficiencia hepática y la enfermedad renal crónica producen una disminución de aproximadamente el 50 % en la concentración de VDBP. En el caso de una concentración elevada de proteínas de unión, la fracción de 25-hidroxivitamina D libre será menor y al revés en el caso de una concentración menor de proteínas unión. En estas circunstancias, y en las circunstancias que se indican más adelante, la medición de la 25-hidroxivitamina D libre puede ser un mejor marcador de la actividad de la vitamina D que la medición clásica de la 25-hidroxivitamina D total. Además de las concentraciones variables, la VDBP también existe como diferentes formas polimórficas. La afinidad de las diferentes formas de VDBP hacia la 25-hidroxivitamina D puede variar, aunque esto todavía está en debate. Una forma polimórfica con una alta afinidad por la 25-hidroxivitamina D disminuirá la fracción de 25-hidroxivitamina D libre disponible. Por el contrario, una forma de VDBP de baja afinidad dará como resultado niveles más altos de 25-hidroxivitamina D libre.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El ELISA 25OH vitamina D libre ELISA se basa en un procedimiento de inmunoensayo en dos etapas, realizado en una placa de microtitulación. Durante la primera etapa de incubación, se une el 25OH vitamina D libre [25(OH)Vitamina D2 y D3] al anticuerpo antivitaminas D recubierto en el pocillo de la placa de microtitulación. El equilibrio in vivo entre el 25OH vitamina D libre y unido se altera mínimamente. Después del lavado, se agrega a cada pocillo una cantidad fija de 25OH vitamina D biotinilada. El 25OH vitamina D biotinilada no unida se elimina por lavado y se agrega un conjugado de estreptavidina peroxidasa. En un siguiente paso, se agrega sustrato cromogénico TMB. Finalmente, la reacción se detiene mediante la adición de un reactivo de parada y la absorbancia [A450nm] se mide usando un espectrofotómetro de placa. La concentración de 25OH vitamina D libre (pg/ml) en la muestra es inversamente proporcional a la absorbancia en cada pocillo de muestra.

V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Reconstitución
 Placa recubierta de antivitaminas D Placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-25OH D2/D3 de ratón.	96 pocillos	Listo para usar
[DIL SPE] Diluyente de muestra Diluyente de muestra, que contiene un fluorosurfactante y Proclin.	1 vial 14 ml	Listo para usar
[Ag BIOT CONC] Reactivo 100x Biot-Vit D 25OH vitamina D biotinilada en tampón de conservación.	1 vial 250 µl	Diluir 100 x con tampón de dilución Biot-Vit D
[SAV HRP] Reactivo de estreptavidina-HRP Estreptavidina conjugada con peroxidasa, que contiene Proclin.	1 vial 14 ml	Listo para usar
[CAL N] Calibradores ; N = 1 to 6 25OH vitamina D liofilizada adicionada en suero humano con dosis reducida de vitamina D que contiene Proclin y BND. (ver valor exacto en la etiqueta del vial)	6 viales liofilizados	Añadir 250 µl de agua destilada.
[CONTROL 1] Control 1 Suero humano normal liofilizado que contiene Proclin y BND. (ver valor exacto en la etiqueta del vial)	1 vial liofilizados	Añadir 250 µl de agua destilada.
[CONTROL 2] Control 2 Suero humano enriquecido con 25OH vitamina D liofilizada que contiene Proclin y BND. (ver valor exacto en la etiqueta del vial)	1 vial liofilizados	Añadir 250 µl de agua destilada.
[WASH SOLN CONC] Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	Diluir 200x con agua destilada. Utilice un agitador magnético
[CHROM TMB] Solución cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)	1 vial 14 ml	Listo para usar
[STOP SOLN] Reactivo de parada ; 1M HCl.	1 vial 14 ml	Listo para usar
[Ag BIOT SOLN] Tampón de dilución Biot-Vit D Tampón que contiene Proclin y BND.	1 vial 14,5 ml	Listo para usar

VI. MATERIALES NO SUMINISTRADOS

Se requiere el siguiente material, pero no se proporciona en el kit:

- Agua destilada
- Pipetas calibradas para la entrega de 10 µl, 35 µl - 250 µl, 3500 µl - 5000 µl (se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas de plástico desechables).
- mezclador de vórtice
- agitador magnético
- Incubadora de agitación de placas a 37 °C y 650 RPM.
- Lavador de microplacas
- Lector de microplacas capaz de leer a 450 nm y 650 nm (lectura bicromática)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Ponga todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) al menos 30 minutos antes de su uso.

- Calibradores:** reconstituya los calibradores con 250 µl de agua destilada y déjelos reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Después de la reconstitución, mezcle bien y asegúrese de que todo el material liofilizado ha sido reconstituido.
- Controles:** reconstituya los controles con 250 µl de agua destilada y déjelos reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Después de la reconstitución, mezcle bien y asegúrese de que todo el material liofilizado ha sido reconstituido.
- Solución de lavado de trabajo:** Prepare un volumen adecuado de solución de lavado de trabajo agregando 199 volúmenes de agua destilada a un volumen de solución de lavado concentrada 200x.
Utilice un agitador magnético para homogeneizar. Deseche la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.
- Solución de trabajo Biot-Vit D:** Prepare un volumen adecuado de dilución de trabajo del reactivo Biot-Vit D mezclando 100x del reactivo Biot-Vit D concentrado con el tampón de dilución Biot-Vit D según el número de tiras utilizadas, tal y como se indica en la siguiente tabla: por ejemplo, para 6 tiras (48 pocillos): se añaden 60 µl de reactivo Biot-Vit D 100x concentrado a 6,0 ml de tampón de dilución Biot-Vit D.
Use un contenedor de PP apropiado para la preparación.
La preparación de la solución de trabajo Biot-Vit D no es estable y debe descartarse si no se usa.

N.º de tiras	Reactivo 100x Biot-Vit D (µl)	Tampón de dilución Biot-Vit D (ml)
3	35	3,5
4	40	4,0
5	50	5,0
6	60	6,0
7	70	7,0
8	80	8,0
9	90	9,0
10	100	10,0
11	110	11,0
12	120	12,0

Todos los demás reactivos proporcionados están listos para usar. No use un sellador de placas durante los pasos de incubación.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Proteja el reactivo estreptavidina-HRP y el Solución cromogénica TMB de la luz.
- No almacene el reactivo Biotin-Vit D diluido, diluya solo la cantidad requerida.
- Una vez abierta, vuelva a cerrar la bolsa de aluminio que contiene la placa de microtitulación con desecante (estable durante un máximo de 2 semanas a 2-8 °C).
- Después de reconstituidos los calibradores y controles son estables durante 2 semanas almacenados a 2-8°C.
- La solución de lavado de trabajo no utilizada debe desecharse al final del día.

Componente del kit	Estabilidad en uso
Placa recubierta de antivitaminas D	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C
Diluyente de muestra	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C
Reactivo 100x Biot-Vit D	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C
Reactivo estreptavidina-HRP	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C
Calibrador 1-6	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C
Control 1-2	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C
Solución de lavado de trabajo	1 día a temperatura ambiente.
Solución cromogénica TMB	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C

Componente del kit	Estabilidad en uso
Parar reactivo	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C
Tampón de dilución Biot-Vit D	Máximo de 2 semanas a 2-8 °C

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Este kit es adecuado para muestras de suero..
- Las muestras de suero deben mantenerse a 2 - 8 ° C.
- Si la prueba no se realiza dentro de las 24 horas, se recomienda tomar muestras y almacenarlas a -20 ° C.
- Evite ciclos repetidos de congelación-descongelación. Mezcle bien las muestras después de la descongelación y antes de la prueba.

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 (18-25°C) 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 mejorará 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 D (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 a la luz solar directa.

Cada pozo solo se puede usar una vez.

B. Procedimiento

1. Seleccione el número requerido de tiras para la ejecución. Las tiras no utilizadas deben volverse a sellar en la bolsa con un desecante y almacenarse a 2-8 ° C.
2. Asegure las tiras en el marco de sujeción.
3. Pipetee 90 µl de diluyente de muestra en todos los pocillos.
4. Pipetee 10 µl de cada Calibrador reconstituido, Control reconstituido o muestra por duplicado en los pocillos apropiados (use una nueva punta de pipeta para cada Calibrador, Control o muestra).
5. Incube la placa 90 minutos a 37 °C, agitando a 650 RPM.
6. Lave la placa 3 veces con 350 µl de solución de lavado de trabajo.
7. Pipetee 100 µl de solución de Biot-Vit D en todos los pocillos.
8. Incube la placa 30 minutos a 37 °C, agitando a 650 RPM.
9. Lave la placa 3 veces con 350 µl de solución de lavado de trabajo.
10. Pipetee 100 µl de reactivo de estreptavidina-HRP en todos los pocillos.
11. Incube la placa 20 minutos a 37 °C, agitando a 650 RPM.
12. Lave la placa 3 veces con 350 µl de solución de lavado de trabajo.
13. Pipetee 100 µl del Solución cromogénica TMB en todos los pocillos.
14. Incube la placa 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C), estática y protegida de la luz.
15. Pipetee 100 µl del reactivo de parada en todo el pozo.
16. Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) ante de 5 minutos 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 dada por la función logística de 4 parámetros. Eliminar los valores que son claramente atípicos
4. Determinar las concentraciones de 25OH Vitamina D libre 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.

Free 25OH Vitamin D ELISA		unidades DO
Calibrador	0,9 pg/ml	2,16
	3,1 pg/ml	1,71
	6,5 pg/ml	1,21
	11,6 pg/ml	0,83
	23,2 pg/ml	0,45
	40,3 pg/ml	0,23

Nota: 1 pg/ml = 2,5 pmol/l

XIII. RENDIMIENTO Y LIMITACIONES

A. Límites de detección

El límite de blanco (LoB) y el límite de detección (LoD) convirtiendo mOD en valores de pg/ml con la ecuación de la curva estándar.

Se calculó que el LoB era 1,86 pg / ml.

La LoD se calculó en 2,38 pg / ml.

B. Especificidad

La reactividad cruzada del anticuerpo utilizado en el ELISA 25OH vitamina D libre fue determinada por el proveedor, tal y como se muestra en la siguiente tabla.

Compuesto y concentración	% de reacción cruzada
25OH-Vitamina D3 a 10 ng/ml	100
25OH-Vitamina D2 a 10 ng/ml	86
1, 25 (OH)2-Vitamina D3 a 200 ng/ml	20
1, 25 (OH)2-Vitamina D2 a 690 ng/ml	1,9
25OH-Vitamina D3 a 10 ng/ml	2,9
25OH-Vitamina D2 a 10 ng/ml	1,3
1, 25 (OH)2-Vitamina D3 a 200 ng/ml	>100
1, 25 (OH)2-Vitamina D2 a 690 ng/ml	>100
Vitamina D3 a 200 ng/ml	0,1

Se evaluó el efecto de posibles sustancias interferentes en muestras probadas en el kit DIASource Free 25OH vitamina D ELSIA de acuerdo con CLSI EP07-A2. Se analizaron ácido ascórbico, bilirrubina no conjugada, HAMA (anticuerpos humanos antirratón), factor reumatoide, hemoglobina, triglicéridos, biotina y colesterol en muestras con diferentes concentraciones de 25OH vitamina D libre. Las sustancias probadas no afectaron al rendimiento del ELISA 25OH vitamina D libre.

Sustancias	Concentración de interferentes	25OH vitamina D (pg/mL)	% de interferencia promedio
Ácido ascórbico	[3mg/dl]	6,5	1%
		11,1	-1%
		16,7	0%
Bilirrubina no conjugada	[20mg/dl]	6,6	-6%
		11,2	1%
		15,7	-3%
HAMA	[2µg/ml]	6,6	-5%
		10,5	2%
		15,1	2%
Factor reumatoide	[600IU/ml]	6,6	-1%
		10,5	-3%
		15,1	-6%
Hemoglobina	[200mg/dl]	6,9	-8%
		11,2	-8%
		17,0	-10%
Triglicéridos	[37mmol/l]	6,8	-5%
		11,1	-5%
		16,2	-5%
Biotina	[4mg/dl]	6,5	1%
		10,6	4%
		15,7	1%
Colesterol	[13mmol/l]	6,4	0%
		10,6	-1%
		16,8	-3%

C. Precisión

Las precisiones de reproducibilidad y repetibilidad se evaluaron con dos muestras a concentraciones media y alta. Sus concentraciones se midieron en 10 series diferentes por duplicado para la reproducibilidad y en una sola serie para la precisión de repetibilidad.

Muestra	N	pg/ml		Reproducibilidad Precisión (Total de ejecuciones)
Grupo 1	20	8.22	SD	0.45
			CV	5.5%
Grupo 2	20	29.42	SD	3.00
			CV	10.2%

SD: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

Muestra	N	pg/ml		Repetibilidad Precisión (dentro de una serie)
Grupo 1	12	9.02	SD	0.32
			CV	3.5%
Grupo 2	12	32.38	SD	0.64
			CV	2.0%

SD: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Tiempo de retardo

La prueba de tiempo de retardo entre el último Calibrador y los resultados de dispensación de muestras se presenta en la siguiente tabla.

RETADOR DE TIEMPO					
	0 min (pg/ml)	5 min (pg/ml)	10 min (pg/ml)	15 min (pg/ml)	20 min (pg/ml)
Muestra 1	5.60	5.68	5.70	5.46	5.71
Muestra 2	13.17	14.70	13.07	14.27	13.38

Los resultados del ensayo siguen siendo precisos incluso cuando se dispensan muestras 20 minutos después de que se haya agregado el Calibrador en los pocillos recubiertos.

E. 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.

F. Comparación de métodos

La correlación entre el resultado del análisis de la velocidad de diálisis frente al ELISA 25OH vitamina D libre es de 0,9916.

G. Intervalo de concentración validado

El intervalo de concentración validado del ensayo de 25OH vitamina D libre es de 2,38 a 34,4 pg/ml de 25OH vitamina D libre.

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.

XV. VALORES ESPERADOS

La alimentación, la raza, la estación y la edad pueden influenciar los niveles normales de 25OH.Vitamina D.

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basado en su población local.

Se ha establecido un rango de referencia basado en 109 individuos aparentemente sanos. Las muestras de suero de pacientes individuales utilizadas se obtuvieron en los Países Bajos, en un banco de sangre local con consentimiento informado. Las muestras se recogieron durante el verano. La siguiente tabla proporciona un resumen de los resultados:

	Concentración de vitamina D libre (pg/ml)
Concentración más alta observada	17,1
Concentración más baja observada	<2,4
Concentración media observada	5,1
Concentración media observada	5,4

Se ha establecido la clasificación del estado de la vitamina D basándose en los cálculos realizados por DIAsource, a partir de los valores de corte comúnmente aceptados para la 25-hidroxivitamina D total y en el % de 25-hidroxivitamina D libre y en la correlación lineal entre ambos parámetros, establecida en un gran número de población normal.

los laboratorios deben utilizar estos límites bajo sus propia responsabilidad, ya que las sociedades internacionales aun no lo han establecido. Dicho esto, tampoco hay consenso sobre los valores de corte totales de la 25-hidroxivitamina D.

N = 279 (población normal)

Primer método de cálculo, % de 25-hidroxivitamina D libre = 0,020 %

Segundo método de cálculo, 25-hidroxivitamina D libre = 0,138 25-hidroxivitamina D total + 1,4 pg/ml

Media de los dos métodos de cálculo:

Nivel	Valores de corte usados 25-hidroxivitamina D total (ng/ml)	Valor de corte propuesto 25-hidroxivitamina D libre (pg/ml)
Deficiente	<10	<2,4
Insuficiente	10-29	2,4-5,8
Suficiente	30-100	>5,8

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 sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAFÍA

1. BOUILLON R. (2016), Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial genotypic associations, JCEM, <http://dx.doi.org/10.1210/jc.2016-1104>.
2. SOLLID S.T. (2016), Effects of vitamin D binding protein phenotypes and vitamin D supplementation on serum total 25(OH) D and directly measured free 25(OH)D, Eur. J. Endocrinol. April 1, 174:445-452.
3. TANGPRICHA V. (2015), Free 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Cystic Fibrosis, Am. J. Med. Sci. 2015 Nov;350(5):374-9.
4. ALOIA J. (2015), Free 25(OH)D and the Vitamin D Paradox in African Americans, J. Clin. Endocrinol. Metab. 2015 Jul 10:JC20152066.
5. SCHWARTZ J.B. (2014), A comparison of direct and calculated free 25(OH) Vitamin D levels in clinical populations, J. Clin. Endocrinol. Metab., 99(5):1631-7.
6. BIKLE D. (2013), Variability in free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations, J. Steroid Biochem. Mol. Biol., S09600760.
7. BIKLE D., Gee E, Halloran B, Haddad JG. Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. J Clin Invest 1984;74:1966-71.
8. VAN HOOFF H.J., Swinkels LM, Ross HA, Sweep CG, Benraad TJ. Determination of non-protein-bound plasma 1,25-dihydroxyvitamin D by symmetric (rate) dialysis. Anal Biochem. 1998 May 1;258(2):176-83.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

