

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



# 25-OH Vitamin D total ELISA



DE1971



96



Demeditec Diagnostics GmbH  
Lise-Meitner-Strasse 2  
24145 Kiel – Germany  
[www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)

**TABLE OF CONTENTS/ INHALTSVERZEICHNIS/ ÍNDICE DE CONTENIDOS/ INDICE DEI CONTENUTI/  
TABLE DES MATIÈRES**

1.	INTENDED USE .....	4
2.	CLINICAL BACKGROUND .....	4
3.	PRINCIPLES OF THE METHOD .....	4
4.	REAGENTS PROVIDED .....	5
5.	SUPPLIES NOT PROVIDED .....	6
6.	REAGENT PREPARATION .....	6
7.	STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS .....	6
8.	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION .....	7
9.	PROCEDURE .....	7
10.	CALCULATION OF RESULTS .....	8
11.	TYPICAL DATA .....	8
12.	PERFORMANCE AND LIMITATIONS .....	8
13.	INTERNAL QUALITY CONTROL .....	11
14.	EXPECTED VALUES .....	12
15.	PRECAUTIONS AND WARNINGS .....	12
16.	SUMMARY OF THE PROTOCOL .....	13
1.	VERWENDUNGSZWECK .....	14
2.	KLINISCHER HINTERGRUND .....	14
3.	WIRKUNGSPRINZIP DER METHODE .....	14
4.	MITGELIEFERT REAGENZIEN .....	15
5.	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL .....	16
6.	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN .....	16
7.	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN .....	17
8.	PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG .....	17
9.	DURCHFÜHRUNG .....	17
10.	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....	18
11.	TYPISCHE WERTE .....	18
12.	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK .....	19
13.	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE .....	22
14.	ZU ERWARTENDER BEREICH .....	23
15.	VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN .....	23
16.	ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS .....	24
1.	INSTRUCCIONES DE USO .....	25
2.	INFORMACIÓN CLÍNICA .....	25
3.	PRINCIPIOS DEL MÉTODO .....	25
4.	REACTIVOS SUMINISTRADOS .....	26
5.	MATERIAL NO SUMINISTRADO .....	27
6.	PREPARACIÓN DE REACTIVOS .....	27
7.	ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS .....	28
8.	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	28
9.	PROCEDIMIENTO .....	28
10.	CÁLCULO DE RESULTADOS .....	29
11.	EJEMPLO DE RESULTADOS .....	29
12.	REALIZACIÓN Y LIMITACIONES .....	30
13.	CONTROL DE CALIDAD INTERNO .....	33
14.	VALORES ESPERADOS .....	34
15.	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS .....	34
16.	RESUMEN DEL PROTOCOLO .....	35
1.	USO DEL KIT .....	36
2.	INFORMAZIONI CLINICHE .....	36
3.	PRINCIPIO DEL METODO .....	36
4.	REATTIVI FORNITI .....	37
5.	REATTIVI NON FORNITI .....	39
6.	PREPARAZIONE DEI REATTIVI .....	39
7.	CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI .....	40
8.	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI .....	40
9.	METODO DEL DOSAGGIO .....	40
10.	CALCOLO DEI RISULTATI .....	41
11.	CARATTERISTICHE TIPICHE .....	41
12.	CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO .....	42
13.	CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO .....	45
14.	VALORI ATTESI .....	46
15.	PRECAUZIONI PER L'USO .....	46
16.	SCHEMA DEL DOSAGGIO .....	47

1.	BUT DU DOSAGE .....	48
2.	CONTEXTE CLINIQUE .....	48
3.	PRINCIPES DU DOSAGE .....	48
4.	RÉACTIFS FOURNIS .....	49
5.	MATÉRIEL NON FOURNI .....	50
6.	PRÉPARATION DES RÉACTIFS .....	50
7.	STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES RÉACTIFS .....	51
8.	PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON .....	51
9.	MODE OPÉRATOIRE.....	51
10.	CALCUL DES RÉSULTATS .....	52
11.	DONNÉES TYPES .....	52
12.	PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE.....	53
13.	CÔNTROLE DE QUALITÉ INTERNE.....	56
14.	VALEURS ATTENDUES .....	57
15.	PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS .....	57
16.	RÉSUMÉ DU PROTOCOLE .....	58
	BIBLIOGRAPHY .....	59
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	60

## 1. INTENDED USE

Immunoenzymetric assay for the in vitro quantitative measurement of 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> (25OH-D<sub>2</sub> and 25OH-D<sub>3</sub>) in serum.

## 2. CLINICAL BACKGROUND

Vitamin D is the generic term used to designate Vitamin D<sub>2</sub> or ergocalciferol and Vitamin D<sub>3</sub> or cholecalciferol. Humans naturally produce Vitamin D<sub>3</sub> when the skin is exposed to ultraviolet sun rays.

In the liver mainly, Vitamin D<sub>3</sub> is metabolised into 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25OH D<sub>3</sub>) which is the main form of Vitamin D circulating in the body. 25OH D<sub>3</sub> is a precursor for other Vitamin D metabolites and has also a limited activity by itself. The most active derivative is 1,25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, produced in the kidney (or placenta) by 1-hydroxylation of 25OH D<sub>3</sub>. 25OH Vitamin D stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus and also bone resorption and mineralisation. 25OH Vitamin D might also be active in other tissues responsible for calcium transport (placenta, kidney, mammary gland ...) and endocrine gland (parathyroid glands, beta cells...). Vitamin D<sub>3</sub> and Vitamin D<sub>2</sub> are also available by ingestion through food or dietary supplementation. As Vitamin D<sub>2</sub> is metabolised in a similar way to Vitamin D<sub>3</sub>, both contribute to the overall Vitamin D status of an individual. It is the reason why it is very important to measure both forms of 25OH Vitamin D equally for a correct diagnosis of Vitamin D deficiency, insufficiency or intoxication. Vitamin D deficiency is an important risk factor for rickets, osteomalacia, senile osteoporosis, cancer and pregnancy outcomes. The measurement of both 25OH Vitamin D forms is also required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients. Vitamin D intoxication has been shown to cause kidney and tissue damages.

## 3. PRINCIPLES OF THE METHOD

The Demeditec 25OH Vitamin D Total ELISA is a solid phase Enzyme Linked Immunosorbent Assay performed on microtiterplates. During a first 2 hours incubation step, at room temperature, total 25OH Vitamin D (D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>) present in calibrators, controls and samples is dissociated from binding serum proteins to fix on binding sites of a specific monoclonal antibody. After 1 washing step, a fixed amount of 25OH Vitamin D-labelled with biotin in presence of horseradish peroxidase (HRP), compete with unlabelled 25OH Vitamin D<sub>2</sub> and 25OH Vitamin D<sub>3</sub> present on the binding sites of the specific monoclonal antibody. After a 30 minutes incubation at room temperature, the microtiterplate is washed to stop the competition reaction. The Chromogenic solution (TMB) is added and incubated for 15 minutes. The reaction is stopped with the addition of Stop Solution and the microtiterplate is then read at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is determined colourimetrically by measuring the absorbance, which is inversely proportional to the total 25OH Vitamin D (D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>) concentration.

A calibration curve is plotted and the total 25OH Vitamin D (D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>) concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

**4. REAGENTS PROVIDED**

Reagents	96 Test Kit	Reconstitution
<b>SORB MT</b> Microtiterplate (96 breakable wells) with anti 25OH Vit. D2 and D3 (monoclonal antibodies)	96 wells	<b>Ready for use</b>
<b>CAL 0 LYO</b> Calibrator 0: biological matrix with gentamycin and proclin	1 vial lyophilised	<b>Add 1 ml</b> distilled water
<b>CAL 1 – 5 LYO</b> Calibrators 1-5 (see exact values on QC data sheet) in horse serum with gentamycin and proclin	5 vials lyophilised	<b>Add 1 ml</b> distilled water
<b>CONTROL 1 &amp; 2 LYO</b> Controls N = 2 in human serum with proclin	2 vials lyophilised	<b>Add 1 ml</b> distilled water
<b>INC BUF</b> Incubation Buffer with casein and proclin	1 vial 20 ml	<b>Ready for use</b>
<b>25OH Vit D CONJ 100x</b> 25OH Vit D Concentrated Conjugate	1 vial 0.3 ml	<b>Dilute</b> 100 x with conjugate buffer
<b>CONJ DIL</b> Conjugate Buffer with casein and proclin	1 vial 30 ml	<b>Ready for use</b>
<b>HRP CONJ 200x</b> Concentrated HRP	1 vial 0.2 ml	<b>Dilute</b> 200 x with conjugate buffer
<b>WASH SOLN 200x</b> Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	<b>Dilute</b> 200 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
<b>SUB TMB</b> Chromogenic solution TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 12 ml	<b>Ready for use</b>
<b>STOP SOLN</b> Stop solution HCl 1M	1 vial 12 ml	<b>Ready for use</b>

**Note:**

For dilution of samples having concentrations of 25OH Vitamin D above the highest calibrator concentration, use **CONTROL 1 LYO** or a serum sample with a concentration of 25OH below 25 ng/mL, and above 4.4 ng/mL (limit of quantification of the assay), as measured in this assay. Use **CONTROL 1** or this sample to dilute 2X the out of curve samples. Take the concentration of the **CONTROL 1\*** or the low sample into account when calculating the dilution result.

\* Use the concentration of **CONTROL 1** measured in the same run as the dilution run, not the mean concentration on the QC data sheet for **CONTROL 1!**

**Calculations:**

Sample value = (Measured value – F1\*Measured **CONTROL 1**) / F2

with the following values for F1 and F2:

- Sample diluted 2 times, F1 = 0.5; F2 = 0.5
- Sample diluted 4 times, F1 = 0.75; F2 = 0.25
- Sample diluted 8 times, F1 = 0.875; F2 = 0.125

**Example:**

A sample out of the calibration curve is diluted 4 times with **CONTROL 1**, and is measured at 70 ng/mL. **CONTROL 1** is measured in the same run at 20 ng/mL.

Dilution 4 times, F1 = 0.75; F2 = 0.25

Sample calculated value = (70 – 0.75\*20)/0.25 = 220 ng/mL

No international reference material is available

## 5. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 µl, 150 µl, 200 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Plate shaker (400 rpm)
6. Washer for microtiterplates
7. Microtiterplate reader capable of reading at 450 nm and 650 (bichromatic reading)

## 6. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrator 0:** Reconstitute the Calibrator 0 with 1 ml distilled water.
- B. **Calibrators 1-5:** Reconstitute the Calibrators 1-5 with 1 ml distilled water.
- C. **Controls:** Reconstitute the Controls with 1 ml distilled water.
- D. **Working HRP conjugate solution:**

**! The working HRP conjugate solution is to be prepared during the incubation and minimum 1h45 minutes before its use (cf 9.B.5).**

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

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

Prepare the solution according to the number of used strips, as indicated in the below table: for example for 6 strips (48 wells): 100 µl of concentrated conjugate and 50 µl of concentrated HRP to 10 ml of conjugate buffer. Use a vortex to homogenize. Until its use, keep the working HRP conjugate at room temperature and avoid direct sunlight or use a brown glass vial for its preparation. The preparation of working HRP conjugate is not stable and must be discarded if not used.

Nb of strips	Volume of Conjugate Buffer ( ml )	Volume of Concentrated Conjugate ( µl )	Volume of Concentrated HRP ( µl )
1	3	30	15
2	5	50	25
3	6	60	30
4	8	80	40
5	9	90	45
6	10	100	50
7	12	120	60
8	14	140	70
9	16	160	80
10	18	180	90
11	20	200	100
12	22	220	110

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

## 7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

## 8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- This kit is suitable for serum samples.
- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, **sampling and storage at -20°C is recommended.**
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

## 9. PROCEDURE

### A. Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Perform calibrators, controls and samples in duplicate. Vertical alignment is recommended.
- Use a clean plastic container to prepare the Wash Solution.
- In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
- For the dispensing of the Chromogenic Solution and the Stop Solution avoid pipettes with metal parts.
- High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- **To avoid drift, the time between pipetting of the first calibrator and the last sample must be limited to the time mentioned in section 12 paragraph E (Time delay).**
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- Dispense the Chromogenic Solution within 15 minutes following the washing of the microtiterplate.
- During incubation with Chromogenic Solution, avoid direct sunlight on the microtiterplate.

### B. Procedure

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 50 µl of each Calibrator, Control and Sample into the appropriate wells.
4. Pipette 150 µl of Incubation Buffer into all the wells.
5. Incubate for 2 hours at room temperature, on a plate shaker (400 rpm)  
Prepare the Working HRP conjugate solution during the incubation and minimum 1h 45 minutes before its use.
6. Aspirate the liquid from each well.
7. Wash the plate 3 times by:
  - dispensing 0.35 ml of Wash Solution into each well
  - aspirating the content of each well
8. Pipette 200 µl of the working HRP conjugate solution into each well Incubate the microtiterplate for 30 minutes at room temperature, on a plate shaker (400 rpm)
9. Aspirate the liquid from each well.
10. Wash the plate 3 times by:
  - dispensing 0.35 ml of Wash Solution into each well
  - aspirating the content of each well
11. Pipette 100 µl of the Chromogenic solution into each well within 15 minutes following the washing step.
12. Incubate the microtiterplate for 15 minutes at room temperature, on a plate shaker (400 rpm), avoid direct sunlight.
13. Pipette 100 µl of Stop Solution into each well.
14. Read the absorbances at 450 nm (reference filter 630 nm or 650 nm) within 1 hour and calculate the results as described in section 10.

**10. CALCULATION OF RESULTS**

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

**11. TYPICAL DATA**

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

25OH-ELISA		OD units
Calibrator	0 ng/ml	2.66
	5.3 ng/ml	2.39
	15.0 ng/ml	1.83
	25.7 ng/ml	1.46
	54.3 ng/ml	0.81
	133 ng/ml	0.21

**Note:** 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

**12. PERFORMANCE AND LIMITATIONS****A. Limits of Detection**

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

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

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

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

**B. Specificity**

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

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

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



Substance	25OH Vitamin D (ng/mL)	Concentration of Interferent (mg/dL)	Mean % Variation
Hemoglobin	7.6	250	-0.6%
		500	
	29.3	250	
		500	
	42.5	250	
		500	
Bilirubin Conjugated	6.0	50	-3.4%
		100	
	21.6	50	
		100	
	38.6	50	
		100	
Bilirubin Unconjugated	7.6	50	2.5%
		100	
	29.3	50	
		100	
	42.5	50	
		100	
Triglyceride	7.6	7.5	-4.3%
		125	
		250	
		500	
	29.3	7.5	
		125	
		250	
		500	
	42.5	7.5	
		125	
		250	
		500	
Vitamin C	6.0	1	2.5%
		10	
		100	
	21.6	1	
		10	
		100	
	38.6	1	
		10	
		100	
Biotin	8.7	0.2	4.7%
		2	
		4	
	19.8	0.2	
		2	
		4	
	36.1	0.2	
		2	
		4	
Zemplar	17.6	0.0013	-4.4%
		0.0025	
		0.0050	
	33.5	0.0013	
		0.0025	
		0.0050	

**C. Precision**

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

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

SD: Standard Deviation, CV: Coefficient of variation

**D. Reproducibility**

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

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

**E. Accuracy**

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

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

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

Sample Dilution		Theoretical Concentra- tion (ng/mL)	Measured Concentra- tion (ng/mL)	Slope	Y-Inter- cept	R <sup>2</sup>	Re- cov- ery (%)
1/1		101.8	101.8	1.02	-1.91	>0.98	100
1/2	with a Ctrl 1 meas- ured at 27.1ng/mL	64.4	62.9				98
1/4		45.7	52.0				114
1/8		36.4	34.8				96
1/16		31.7	33.6				106

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

**F. Time delay**

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

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

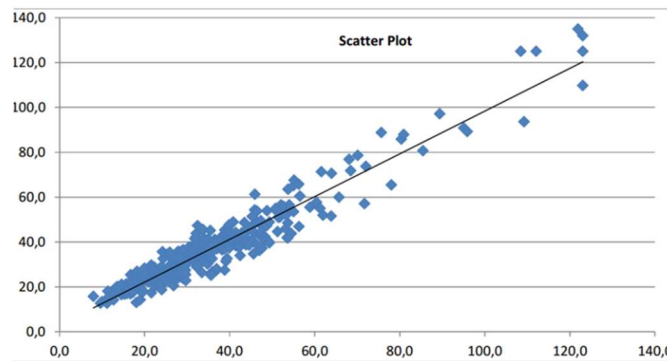
Assay results remain accurate even when incubation buffer is dispensed 10 and 20 minutes after the Calibrator has been added in the coated wells.

**G. Limitations of the test**

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

**H. Method comparison**

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

**13. INTERNAL QUALITY CONTROL**

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the QC data sheet, 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.

**14. EXPECTED VALUES**

Dietary intake, race, season and age are known to affect the normal levels of 25OH Vit D3. Each laboratory should establish its own range based on their local population.

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

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

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

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

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

**15. 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, refer to the MSDS.

**16. SUMMARY OF THE PROTOCOL**

	<b>CALIBRATORS (<math>\mu</math>l)</b>	<b>SAMPLE(S) CONTROLS (<math>\mu</math>l)</b>
Calibrators (0-5) Controls, Samples Incubation Buffer	50 - 150	- 50 150
Incubate for 2 hours at room temperature with continuous shaking at 400 rpm. Prepare the working HRP conjugate during the incubation and minimum 1h 45 minutes before its use. <b>The sequence of preparation is critical, see VII. Reagent Preparation</b> Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 350 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate.		
Working HRP Conjugate	200	200
Incubate for 30 minutes at room temperature with continuous shaking at 400 rpm. Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 350 $\mu$ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at room temperature with continuous shaking at 400 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader. Record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm).		

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Ein immunenzymetrisches Assay für die quantitative in vitro Bestimmung von 25-Hydroxy Vitamin D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub> (25OH-D<sub>2</sub> und 25OH-D<sub>3</sub>) in Serum.

## 2. KLINISCHER HINTERGRUND

Vitamin D ist der allgemeine Ausdruck zur Bezeichnung von Vitamin D<sub>2</sub>, oder Ergocalciferol und Vitamin D<sub>3</sub>, oder Cholecalciferol.

Menschen produzieren Vitamin D<sub>3</sub> auf natürliche Weise, wenn die Haut ultravioletten Sonnenstrahlen ausgesetzt wird. Hauptsächlich wird Vitamin D<sub>3</sub> in der Leber in 25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25OH D<sub>3</sub>) metabolisiert, welches die Hauptform von im Körper zirkulierendem Vitamin D darstellt. 25OH D<sub>3</sub> ist ein Vorläufer für andere Vitamin D Metaboliten und ist in begrenztem Umfang selbst aktiv. Das am meisten aktive Derivat ist 1,25-Hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, welches in den Nieren (oder in der Plazenta) durch eine 1-Hydroxylierung produziert wird. 25OH Vitamin D stimuliert die intestinale Absorption von Kalzium und Phosphor und auch die Knochenresorption und -Mineralisierung. 25OH Vitamin D kann auch in anderen Geweben aktiv für den Kalziumtransport verantwortlich sein (Plazenta, Nieren, Milchdrüsen,...) und für die Endokrinen Drüsen (Nebenschilddrüse, Beta Zellen,...). Vitamin D<sub>3</sub> und Vitamin D<sub>2</sub> werden ebenfalls über die Nahrung oder diätische Ergänzungsmittel verfügbar gemacht. Da Vitamin D<sub>2</sub> auf ähnliche Weise metabolisiert wird wie Vitamin D<sub>3</sub>, tragen auch beide zum Vitamin D Gesamtstatus einer Person bei. Das ist der Grund, warum eine Bestimmung der beiden Formen von 25 OH Vitamin D für eine korrekte Diagnose des Vitamin D Mangels, der Insuffizienz oder der Intoxikation so wichtig ist. Vitamin D Mangel ist ein wichtiger Risikofaktor für Rachitis, Knochenerweichung, altersbedingte Osteoporose, Krebs und Schwangerschaftsvorfällen. Die Messung von beiden Formen von 25OH Vitamin D ist ebenso erforderlich zur Bestimmung der Ursachen von anormalen Konzentrationen von Serum Kalzium Spiegeln bei Patienten. Vitamin D Intoxikationen verursachen Nieren und Gewebeschäden.

## 3. WIRKUNGSPRINZIP DER METHODE

Der Demeditec 25OH Vitamin D Total ELISA ist ein Festphasen ELISA (Enzym gekoppeltes immunabsorbierendes Analysesystem), der auf Mikrotiterplatten durchgeführt wird. Während einer ersten, 2 stündigen Inkubation bei Raumtemperatur, dissoziiert das gesamte 25OH Vitamin D (D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub>), welches in den Kalibratoren, Kontrollen und Proben enthalten ist, von den bindenden Serum Proteinen, um an den Bindungsstellen eines spezifischen monoklonalen Antikörpers anzudocken. Nach einem Waschschritt konkurriert eine bestimmte Menge von, mit Biotin in Gegenwart von Meerrettich Peroxidase (HRP) gelabeltem, 25OH Vitamin D mit ungelabeltem 25OH Vitamin D<sub>2</sub> und 25OH Vitamin D<sub>3</sub>, welche an den Bindungsstellen des spezifischen monoklonalen Antikörpers vorhanden sind. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird die Mikrotiterplatte gewaschen, um die Wettbewerbsreaktion zu stoppen. Die chromogene Lösung (TMB) wird hinzugefügt und 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung gestoppt und die Mikrotiterplatte bei der geeigneten Wellenlänge abgelesen. Der Substratumsatz wird kolorimetrisch durch Messung der Absorption bestimmt, die umgekehrt proportional zu der Gesamtkonzentration von 25OH Vitamin D (D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub>) ist.

Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die Gesamtkonzentrationen von 25OH Vitamin D (D<sub>2</sub> und D<sub>3</sub>) der Proben durch Dosis Interpolation aus der Kalibrationskurve abgelesen.

**4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN**

Reagenz	Quantität	Rekonstitution
<b>SORB MT</b> Mikrotiterplatte (mit abbrechbaren Vertiefungen) mit 96 Vertiefungen beschichtet mit Anti 25OH Vit. D2 und D3 (Monoklonale Antikörper)	96 Vertiefungen	<b>Gebrauchsfertig</b>
<b>CAL 0 LYO</b> Null-Kalibrator: Biologische Matrix mit Gentamycin und Proclin	1 Gefäß lyophil.	1 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>CAL 1 – 5 LYO</b> Kalibratoren 1-5 (genaue Werte auf QC Datenblatt): Pferdeserum mit Gentamycin und Proclin	5 Gefäße lyophil.	1 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>CONTROL 1 &amp; 2 LYO</b> Kontrollen: N = 2 in Humanserum mit Proclin	2 Gefäße lyophil.	1 ml dest. Wasser <b>zugeben</b>
<b>INC BUF</b> Inkubationspuffer mit Kasein und Proclin	1 Gefäß 20 ml	<b>Gebrauchsfertig</b>
<b>25OH Vit D CONJ 100x</b> 25OH Vit. D konzentriertes Konjugat	1 Gefäß 0,3 ml	100 x mit Konjugatpuffer <b>verdünnen</b>
<b>HRP CONJ 200x</b> konzentriertes HRP	1 Gefäß 0,2 ml	200 x mit Konjugatpuffer <b>verdünnen</b>
<b>CONJ DIL</b> Konjugatpuffer mit Kasein und Proclin	1 Gefäß 30 ml	<b>Gebrauchsfertig</b>
<b>WASH SOLN 200x</b> Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 ml	200x mit dest. Wasser (Magnetührer verwenden) <b>verdünnen</b> .
<b>SUB TMB</b> Chromogene Lösung TMB (Tetramethylbenzidin)	1 Gefäß 12 ml	<b>Gebrauchsfertig</b>
<b>STOP SOLN</b> Stopplösung HCL 1M	1 Gefäß 12 ml	<b>Gebrauchsfertig</b>

**Anmerkung:**

Zur Verdünnung von Proben mit Konzentrationen von 25OH Vitamin D über der höchsten Kalibrator-konzentration verwenden Sie **CONTROL 1** oder eine Serumprobe mit einer Konzentration von 25OH unter 25ng/mL und über 4,4ng/mL (Quantifizierungsgrenze des Assay), wie in diesem Assay gemessen. Verwenden Sie **CONTROL 1** oder diese Probe zum 2X Verdünnen der außerhalb der Kurve liegenden Proben. Berücksichtigen Sie bei der Berechnung des Verdünnungsergebnisses die Konzentration von **CONTROL 1** oder der niedrigen Probe.

\* Verwenden Sie die Konzentration von **CONTROL 1**, die im gleichen Lauf wie der Verdünnungslauf gemessen wurde, und nicht die mittlere Konzentration auf dem **CONTROL 1**-Label!

**Berechnungen:**

Probenwert = (Messwert – F1\*Gemessene **CONTROL 1**) / F2

mit den folgenden Werten für F1 und F2:

- Probe 2fach verdünnt, F1 = 0,5; F2 = 0,5
- Probe 4fach verdünnt, F1 = 0,75; F2 = 0,25
- Probe 8fach verdünnt, F1 = 0,875; F2 = 0,125

**Beispiel:**

Eine Probe aus der Kalibrationskurve wird 4fach mit **CONTROL 1** verdünnt und bei 70 ng/mL gemessen. **CONTROL 1** wird im selben Lauf bei 20 ng/mL gemessen.

Verdünnung 4fach, F1 = 0,75; F2 = 0,25

Anhand der Probe ermittelter Wert =  $(70 - 0,75 \cdot 20) / 0,25 = 220$  ng/mL

Es sind keine internationalen Referenzen vorhanden.

## 5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 µl, 150 µl, 200µl und 1 ml (die Benutzung von genauen Pipetten mit Einmalspitzen ist vorgeschrieben)
3. Vortexmixer
4. Magnetrührer
5. Plattenschüttler (400 upm)
6. Mikrotiterplatten Washer
7. Mikrotiterplattenleser, der bei 450 und 650 nm abliest ( bichromatische Ablesung)

## 6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Null-Kalibrator:** Rekonstituieren Sie den Null-Kalibrator mit 1 ml dest. Wasser.
- B. **Kalibratoren 1-5:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren 1-5 mit 1 ml dest. Wasser.
- C. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 1 ml dest. Wasser.
- D. **HRP Konjugat Gebrauchslösung:**

**! Die HRP-Arbeitskonjugatlösung muss während der Inkubation und spätestens 1 h 45 Minuten vor Benutzung bereit werden (siehe X.B.5).**

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

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

Bereiten Sie die Lösung entsprechend der Anzahl der verwendeten Streifen vor, die in der Tabelle unten angegeben: zum Beispiel für 6 Streifen (48 Behälter): 100 µl konzentriertes Konjugat und 50 µl konzentriertes HRP zu 10 ml Konjugatpuffer..

Benutzen Sie einen Vortex zum Homogenisieren.

Bis zur Verwendung lagern Sie das gebrauchsfertige HRP Konjugat bei Raumtemperatur und vermeiden Sie direktes Sonnenlicht oder benutzen Sie ein braunes Glasröhrchen für die Zubereitung. Die Herstellung von gebrauchsfähigem HRP Konjugat ist nicht stabil und muss bei Nichtgebrauch verworfen werden.

Anzahl der Streifen	Volumen des Konjugatpuffers (ml)	Volumen des konzentrierten Konjugats (µl)	Volumen des konzentrierten HRP (µl)
1	3	30	15
2	5	50	25
3	6	60	30
4	8	80	40
5	9	90	45
6	10	100	50
7	12	120	60
8	14	140	70
9	16	160	80
10	18	180	90
11	20	200	100
12	22	220	110

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



## 7. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach Rekonstituierung sind die Kalibratoren und Kontrollen für 8 Wochen bei 2 bis 8°C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei –20°C eingefroren werden für maximal 4 Monate. Vermeiden Sie wiederholte Einfrier- Auftau Zyklen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

## 8. PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG

- Dieser Kit ist für Serumproben geeignet.
- Serumproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, **müssen die Proben bei –20°C aufgehoben werden.**
- Vermeiden Sie wiederholte Einfrier- Auftau Zyklen.

## 9. DURCHFÜHRUNG

### A. Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach Ablaufdatum.
- Vermischen Sie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen nicht. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Führen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben doppelt aus. Vertikale Ausrichtung wird empfohlen.
- Verwenden Sie zur Zubereitung der Waschlösung reinen Kunststoffbehälter.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Verwenden Sie zur Pipettierung der chromogene Lösung und der Stopplösung keine Pipetten mit Metallteilen.
- Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.
- **Zur Vermeidung von Drift muss die Zeit zwischen dem Pipettieren des ersten Kalibrators und der letzten Probe auf die Zeit beschränkt werden, die in Abschnitt 12 Absatz E (Zeitverzögerung) erwähnt wird.**
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- Pipettieren Sie die chromogene Lösung innerhalb von 15 Minuten nach dem Waschen der Mikrotiterplatte.
- Während der Inkubation mit der chromogene Lösung ist die Mikrotiterplatte vor direktem Sonnenlicht zu schützen.

**B. Durchführung**

1. Selektieren Sie die benötigte Anzahl Streifen für den Lauf. Die unbenutzten Streifen sollten im Beutel mit Trockenmittel versiegelt und bei 2-8°C aufbewahrt werden.
2. Sichern Sie die Streifen im Halterahmen.
3. Pipettieren Sie 50 µl von jedem Kalibrator, jeder Kontrolle und Probe in die entsprechenden Vertiefungen.
4. Pipettieren Sie 150 µl Inkubationspuffer in alle Vertiefungen.
5. Inkubieren Sie für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (400 upm) Die HRP Konjugat Gebrauchslösung während der Inkubation und mindestens 1 Std. 45 Min. vor ihrer Verwendung herstellen.
6. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung.
7. Waschen Sie die Platte 3 mal indem Sie:
  - 0,35 ml Waschlösung in jede Vertiefung pipettieren
  - den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen
8. Pipettieren Sie 200 µl der HRP Konjugat Gebrauchslösung in jede Vertiefung. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte für 30 Minuten bei Raumtemperatur, auf einem Plattenschüttler (400 upm).
9. Saugen Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung.
10. Waschen Sie die Platte 3 mal indem Sie:
  - 0,35 ml Waschlösung in jede Vertiefung pipettieren
  - den Inhalt aus jeder Vertiefung absaugen
11. Pipettieren Sie 100 µl der chromogenen Lösung in jede Vertiefung, innerhalb von 15 Minuten nach den Waschschrift.
12. Inkubieren Sie die Mikrotiterplatte für 15 Minuten bei Raumtemperatur, auf einem Plattenschüttler (400 upm), vermeiden Sie direktes Sonnenlicht.
13. Pipettieren Sie 100 µl der Stopplösung in jede Vertiefung.
14. Lesen Sie die Absorption bei 450 nm (Referenzfilter 630 nm oder 650 nm) innerhalb einer Stunde ab und berechnen Sie das Ergebnis, wie in Abschnitt 10 beschrieben.

**10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

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

**11. TYPISCHE WERTE**

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

25OH-EASIA		Absorptionseinheiten
Kalibrator	0 ng/ml	2,66
	5,3 ng/ml	2,39
	15 ng/ml	1,83
	25,7 ng/ml	1,46
	54,3 ng/ml	0,81
	133 ng/ml	0,21

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

**12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK****A. Nachweisgrenzen**

Die Grenzen von Leerwert (LoB), von Nachweis (LoD) und von Quantifizierung (LoQ) wurden in Übereinstimmung mit der CLSI Richtlinie EP17-A bestimmt

LoB wurde durch mehrfache Messung des Leerwertes und durch Kalkulation von 95 Prozent der Verteilung der Testwerte ermittelt. Der Leerwert wurde mit 1,69 ng/ml bestimmt.

Die LoD wurde, wie in der Richtlinie beschrieben kalkuliert. Die LoD wurde mit 2,81 ng/ml bestimmt.

LoQ wurde durch Testung von 5 Proben mit niedrigem Wert in verschiedenen Tests 14 mal ermittelt. LoQ wurde bei einem CV von 20% als 4,39 ng/ml bestimmt.

**B. Spezifität**

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

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

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

Substanz	25OH Vitamin D (ng/ml)	Konzentration von Interferent (mg/dl)	Durchschnittsvariation in %
Hämoglobin	7,6	250	-0,6%
		500	
	29,3	250	
		500	
	42,5	250	
		500	
Bilirubin konjugiert	6,0	50	-3,4%
		100	
	21,6	50	
		100	
	38,6	50	
		100	
Bilirubin unkonjugiert	7,6	50	2,5%
		100	
	29,3	50	
		100	
	42,5	50	
		100	
Triglyzeride	7,6	7,5	-4,3%
		125	
		250	
		500	
	29,3	7,5	
		125	
		250	
		500	
	42,5	7,5	
		125	
		250	
		500	
Vitamin C	6,0	1	2,5%
		10	
		100	
	21,6	1	
		10	
		100	
	38,6	1	
		10	
		100	
Biotin	8,7	0,2	4,7%
		2	
		4	
	19,8	0,2	
		2	
		4	
	36,1	0,2	
		2	
		4	
Zemplar	17,6	0,0013	-4,4%
		0,0025	
		0,0050	
	33,5	0,0013	
		0,0025	
		0,0050	

**C. Präzision**

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

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	5,5 ± 0,4	7,8	A	39	17,7 ± 1,3	7,4
B	35	27,4 ± 1,6	5,7	B	10	26,3 ± 1,2	4,7
C	35	43,0 ± 1,2	2,7	C	10	42,1 ± 1,8	4,3
D	24	81,2 ± 2,0	2,5	D	21	85,4 ± 7,8	9,2

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

**D. Reproduzierbarkeit**

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

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

**E. Genauigkeit**

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

WIEDERFINDUNGSTEST	
Zugeg. 25-OH-Vit.D <sub>3</sub> (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
0	100
25	96
50	92
Zugeg. 25-OH-Vit.D <sub>2</sub> (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
0	100
25	105
50	95

Es wurde eine Probe mit einer über den gesamten messbaren Bereich verteilten Konzentration mit abstandsgleichen Verdünnungen getestet, gemäß des Verdünnungsprotokolls in Kapitel V, um den linearen Bereich des Assays zu ermitteln. Es wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle zusammengefasst:

Proben-verdünnung		Theoretische Konzentration (ng/mL)	Gemessene Konzentration (ng/mL)	Steigung	Schnittpunkt Y-Achse	R <sup>2</sup>	Wiederfindungsrate (%)
1/1	mit einer Probe von 27.1 ng/mL	101.8	101.8	1.02	-1.91	>0.98	100
1/2		64.4	62.9				98
1/4		45.7	52.0				114
1/8		36.4	34.8				96
1/16		31.7	33.6				106

Der lineare Bereich des Assays wurde als zwischen 33,6 ng/mL und 101,8 ng/mL ermittelt.

**F. Zeitverzögerung**

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

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

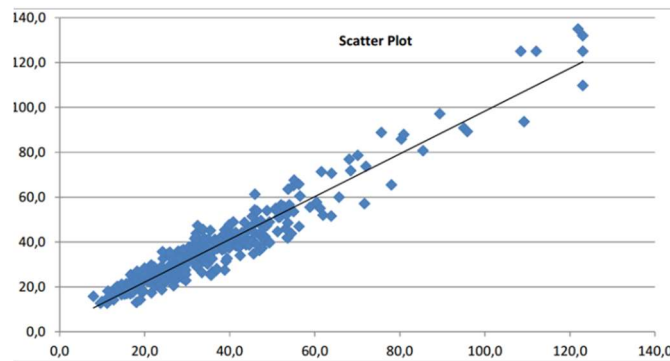
Testergebnisse bleiben genau, selbst wenn der Inkubationspuffer 10 oder 20 Minuten nach dem Kalibrator in die beschichteten Vertiefungen dispensiert wird.

### G. Grenzen der Methodik

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

### H. Methodenvergleich

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



### 13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Wenn die Resultate für Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 sich nicht innerhalb des auf dem QC Datenblatt 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.

**14. ZU ERWARTENDER BEREICH**

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

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

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

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

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

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

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

**15. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN****Sicherheit**

Nur für diagnostische Zwecke.

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

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie den Hautkontakt mit allen Reagenzien, die 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.

**16. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS**

	<b>KALIBRATOREN µl</b>	<b>PROBE(N) KONTROLLEN µl</b>
Kalibratoren (0-5) Proben, Kontrollen Inkubationspuffer	50 - 150	- 50 150
<p>Inkubieren Sie 2 Stunden unter permanentem Schütteln (400 UpM) bei Raumtemperatur. Bereiten Sie das HRP-Arbeitskonjugat während der Inkubation und spätestens 1 h 45 Minuten vor Benutzung.</p> <p><b>Die Reihenfolge der Zubereitung ist wesentlich, siehe VII. Vorbereitung der Reagenzien.</b></p> <p>Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung auf. Waschen Sie 3mal mit 350 µl Waschlösung und entleeren Sie diese.</p>		
HRP Konjugat Gebrauchslösung	200	200
<p>Inkubieren Sie 30 Minuten unter permanentem Schütteln (400 UpM) bei Raumtemperatur. Saugen Sie den Inhalt jeder Vertiefung auf. Waschen Sie 3mal mit 350 µl Waschlösung und entleeren Sie diese.</p>		
Chromogene Lösung	100	100
Inkubieren Sie 15 Minuten unter permanentem Schütteln (400 UpM)		
Stoplösung	100	100
<p>Ablesung auf einem Mikrotiterplatten Lesegerät Notieren Sie die Absorption von jeder Vertiefung bei 450 nm (gegen 630 oder 650 nm)</p>		



## 1. INSTRUCCIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático para la determinación cuantitativa in vitro de la 25-hidroxivitamina D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub> (25OH-D<sub>2</sub> y 25OH-D<sub>3</sub>) en suero.

## 2. INFORMACIÓN CLÍNICA

Vitamina D es el término genérico usado para designar a la vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol y la Vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol. Los humanos producen vitamina D<sub>3</sub> en forma natural cuando la piel está expuesta a los rayos ultravioleta del sol. La vitamina D<sub>3</sub> es metabolizada principalmente en el hígado produciendo 25-Hidroxivitamina D<sub>3</sub> (25OH D<sub>3</sub>) que es la forma principal de vitamina D circulando en el organismo. 25OH D<sub>3</sub> es la precursora para otros metabolitos de la vitamina D y tiene una actividad limitada por sí sola. El derivado más activo es la 1,25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, producida en el riñón (o placenta) por la 1-hidroxilación de 25OHD<sub>3</sub>. La 25OH Vitamina D estimula la absorción intestinal del calcio y el fósforo y también la reabsorción y mineralización ósea. La 25OH Vitamina D también puede estar activa en otros tejidos siendo responsable del transporte de calcio (placenta, riñón, glándula mamaria...) y glándula endocrina (glándula paratiroides, células beta...). La Vitamina D<sub>3</sub> y Vitamina D<sub>2</sub> también están disponibles por ingestión a través de los alimentos o suplementos dietéticos. Como la Vitamina D<sub>2</sub> se metaboliza en forma similar a la Vitamina D<sub>3</sub>, ambas contribuyen al estado general de la Vitamina D de un individuo. Por esta razón es muy importante medir ambos tipos de 25OH Vitamina D de la misma forma para un diagnóstico correcto de deficiencia, insuficiencia o intoxicación. La deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo importante en raquitismo, osteomalacia, osteoporosis senil, cáncer y el resultado del embarazo. La medición de ambos tipos de 25OH Vitaminas D también es necesaria para determinar la causa de concentraciones anormales de calcio en el suero de pacientes. Se ha demostrado que la intoxicación con Vitamina D puede causar daño en el riñón y tejidos

## 3. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

El ELISA 25OH Vitamina D Total de Demeditec es un ensayo competitivo de inmunoabsorción enzimática en fase sólida realizado en microplacas. Durante la primera fase de incubación de dos horas, a temperatura ambiente, la 25OH Vitamina D total (D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>) presente en los calibradores, controles y muestras se disocia de las proteínas séricas y se fija en los sitios de unión de un anticuerpo monoclonal específico. Después de un lavado, una cantidad fija de 25OH Vitamina D marcada con biotina en la presencia de peroxidasa de rábano picante (HRP), compite con 25OH Vitamina D<sub>2</sub> y 25OH Vitamina D<sub>3</sub> no marcadas presentes en el sitio de unión del anticuerpo monoclonal específico. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se lava la microplaca para parar la reacción de competencia. La solución cromogénica (TMB) es añadida e incubada durante 15 minutos. La reacción se para con la adición de la Solución de Parada y después la microplaca se lee a la longitud de onda apropiada. La cantidad de recambio de sustrato es determinada de manera colorimétrica por la medición de la absorbancia, que es inversamente proporcional a la concentración total de 25OH Vitamina D (D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>).

Se dibuja una curva de calibración y el total de las concentraciones de las 25OH Vitaminas D (D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>) de las muestras se determinan por interpolación de dosis usando la curva de calibración.

## 4. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Reconstitución
<b>SORB MT</b> Microplaca (96 pocillos desprendibles) con anti 25OH-Vitamin.D <sub>2</sub> y 25OH-Vitamin.D <sub>3</sub> (anticuerpos monoclonales)	96 pocillos	<b>Listo para uso</b>
<b>CAL 0 LYO</b> Calibrador 0: matriz biológica con gentamicina y proclina	1 vial liofilizado	<b>Añadir 1 ml de agua destilada</b>
<b>CAL 1 – 5 LYO</b> Calibradores 1-5 (mirar los valores exactos en la QC data sheet) en suero de caballo con gentamicina y proclina	5 viales liofilizados	<b>Añadir 1 ml de agua destilada</b>
<b>CONTROL 1 &amp; 2 LYO</b> Controles - N = 2 en suero humano con proclina	5 viales liofilizados	<b>Añadir 1 ml de agua destilada</b>
<b>INC BUF</b> Tampón de incubación con caseína y proclina	1 vial 20 ml	<b>Listo para uso</b>
<b>25OH Vit D CONJ 100x</b> Conjugado concentrado de 25OH Vitamina D	1 vial 0,3 ml	<b>Diluir 100 x con tampón de conjugado</b>
<b>HRP CONJ 200x</b> HRP Concentrado	1 vial 0,2 ml	<b>Diluir 200 x con tampón de conjugado</b>
<b>CONJ DIL</b> Tampón de conjugado con caseína y proclina	1 vial 30 ml	<b>Listo para uso</b>
<b>WASH SOLN 200x</b> Solución de lavado (Tris – HCl)	1 vial 10 ml	<b>Diluir 200 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)</b>
<b>SUB TMB</b> Solución Cromogénica TMB (Tetrametilbencidina)	1 vial 12 ml	<b>Listo para uso</b>
<b>STOP SOLN</b> Solución de Parada: HCl 1M	1 vial 12 ml	<b>Listo para uso</b>

**Nota:**

Para la dilución de muestras que tengan concentraciones de Vitamina D 25OH por encima de la concentración más alta del calibrador, use el **CONTROL 1** o una muestra de suero con una concentración de 25OH por debajo de 25 ng/mL, y por encima de 0,4 ng/mL (límite de cuantificación del ensayo), como se mide en este ensayo. Use el **CONTROL 1** o esta muestra para diluir 2 veces las muestras fuera de la curva. Tenga en cuenta la concentración del **CONTROL 1**\* o la muestra baja al calcular el resultado de la dilución.

\* Use la concentración del **CONTROL 1** medida en la misma corrida que la corrida de dilución, no la concentración media del rótulo del **CONTROL 1**.

**Cálculos:**

Valor de la muestra = (Valor medido – F1\***CONTROL 1** medido) / F2

con los siguientes valores para F1 y F2:

- Muestra diluida 2 veces, F1 = 0,5; F2 = 0,5
- Muestra diluida 4 veces, F1 = 0,75; F2 = 0,25
- Muestra diluida 8 veces, F1 = 0,875; F2 = 0,125

**Ejemplo:**

Una muestra fuera de la curva de calibración se diluy 4 veces con **CONTROL 1**, y se mide a 70 ng/mL.

El **CONTROL 1** se mide en la misma corrida a 20 ng/mL.

Dilución 4 veces, F1 = 0.75; F2 = 0.25

Valor calculado de la muestra = (70 – 0,75\*20)/0,25 = 220 ng/mL

No existe ninguna preparación de referencia internacional.

## 5. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 µl, 150 µl, 200 µl y 1 ml (se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas plásticas)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de placas (400 rpm)
6. Lavador de microplacas
7. Lector de microplacas capaz de leer a 450 nm y 650 nm (lectura bicromática)

## 6. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

**A. Calibrador 0:** Reconstituir Calibrador 0 con 1 ml de agua destilada.

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

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

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

**¡ La solución del conjugado de HRP de trabajo debe prepararse durante la incubación y al menos 1 hora y 45 minutos antes de su uso (véase X.B.5).**

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

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

Prepare la solución conforme al número de tiras utilizadas, según se indica en la tabla siguiente: por ejemplo, para 6 tiras (48 pocillos): 100 µl de conjugado concentrado y 50 µl de HRP concentrado para 10 ml de tampón conjugado.

Usar un agitador vortex para homogenizar.

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

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

Nº de tiras	Volumen del tampón de conjugado (ml)	Volumen de conjugado concentrado (µl)	Volumen de HRP Concentrado (µl)
1	3	30	15
2	5	50	25
3	6	60	30
4	8	80	40
5	9	90	45
6	10	100	50
7	12	120	60
8	14	140	70
9	16	160	80
10	18	180	90
11	20	200	100
12	22	220	110

**E. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 199 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (200x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

## **7. 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.
- Después de reconstituidos los calibradores y controles son estables durante ocho semanas almacenados a 2-8°C. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a -20°C por 4 meses máximo. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad o deterioro

## **8. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

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

## **9. PROCEDIMIENTO**

### **A. Notas de manejo**

- No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad.
- No mezclar reactivos de diferente número de lote.
- Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
- Mezclar concienzudamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente.
- Preparar los calibradores, controles y muestras en duplicado. Se recomienda la alineación vertical.
- Usar un envase plástico limpio para preparar la Solución de Lavado.
- Con el fin de evitar cualquier contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
- Al dispensar la Solución Cromogénica y la Solución de Parada, evitar usar pipetas con partes metálicas.
- El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión.
- Respetar los tiempos de incubación.
- Para evitar deriva, el tiempo entre el pipeteo del primer calibrador y la última muestra debe estar limitado al tiempo mencionado en la sección 12 párrafo E (Demora en el tiempo).
- Preparar la curva de calibración para cada ensayo, no utilizar los datos de ensayos previos.
- Dispensar la Solución Cromogénica dentro de los 15 minutos posteriores al lavado de las microplacas.
- Durante la incubación con Solución Cromogénica, evitar exponer las microplacas la luz solar directa.

**B. Procedimiento**

1. Seleccionar el número requerido de pocillos para el ensayo. Las tiras no utilizadas deben ser selladas en la bolsa con un desecante y guardadas a 2-8°C
2. Fijar las tiras en el marco de sostén.
3. Pipetear 50 µl de cada Calibrador, Control y Muestra diluida en el pocillo apropiado.
4. Pipetear 150 µl de Tampón de incubación en todos los pocillos.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, en un agitador de placas (400 rpm). Prepare la solución de trabajo del conjugado HRP durante la incubación y al menos 1 hora 45 min. antes de su utilización.
6. Aspirar el líquido de cada pocillo.
7. Lavar la placa 3 veces:
  - dispensando 0,35 ml de solución de lavado en cada pocillo
  - aspirando el contenido de cada pocillo
8. Pipetear 200 µl de solución de conjugado HRP de trabajo en cada pocillo. Incubar la microplaca durante 30 minutos a temperatura ambiente, en un agitador de placas (400 rpm)
9. Aspirar el líquido de cada pocillo.
10. Lavar la placa 3 veces:
  - dispensando 0,35 ml de solución de lavado en cada pocillo
  - aspirando el contenido de cada pocillo
11. Pipetear 100 µl de la solución cromogénica en cada pocillo dentro de los de 15 minutos después de la fase de lavado.
12. Incubar la microplaca durante 15 minutos a temperatura ambiente, en un agitador de placas (400 rpm), evitar la luz solar directa.
13. Pipetear 100 µl del Reactivo de Parada en cada pocillo.
14. Leer las absorbancias a 450 nm (filtro de referencia 630 nm o 650 nm) en menos de 1 hora y calcular los resultados como se ha descrito en la sección 10.

**10. 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 por interpolación de los valores de DO de las muestras de la curva de calibración.

**11. EJEMPLO DE RESULTADOS**

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

	<b>25OH-EASIA</b>	<b>unidades DO</b>
Calibrador	0 ng/ml	2,66
	5,3 ng/ml	2,39
	15 ng/ml	1,83
	25,7 ng/ml	1,46
	54,3 ng/ml	0,81
	133 ng/ml	0,21

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

## 12. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

### A. Límites de la detección

El Límite del Blanco (LoB), el Límite de Detección (LoD) y el Límite de Cuantificación (LoQ) se determinaron según la directriz EP17-A del CLSI.

El LoB se calculó midiendo el blanco varias veces y calculando el percentil 95 de la distribución de los valores de la prueba. El cálculo determinó que el LoB fue 1,69 ng/ml.

El LoD se calculó como se describe en la directriz. El cálculo determinó que el LoD fue 2,81 ng/ml.

El LoQ se calculó analizando cinco muestras de baja concentración 14 veces en pruebas diferentes. El cálculo determinó que el LoQ fue 4,39 ng/ml con un CV de 20%.

### B. Especificidad

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

Compuesto y concentración	% Reacción cruzada
25OH-Vitamina D <sub>3</sub> a 10 ng/ml	100
25OH-Vitamina D <sub>2</sub> a 10 ng/ml	86
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D <sub>3</sub> a 200 ng/ml	20
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D <sub>2</sub> a 690 ng/ml	1,9
Vitamina D <sub>3</sub> a 200 ng/ml	2,9
Vitamina D <sub>2</sub> a 200 ng/ml	1,3
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D <sub>3</sub> a 20 ng/ml	>100
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D <sub>3</sub> a 4 ng/ml	>100
3-epi-25OH-Vitamina D <sub>3</sub> a 20 µg/ml	0,1

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

Sustancia	25OH Vitamina D (ng/ml)	Concentración de la sustancia que interfiere (mg/dl)	Variación % promedio
Hemoglobina	7,6	250	-0,6%
		500	
	29,3	250	
		500	
	42,5	250	
		500	
Bilirrubina conjugada	6,0	50	-3,4%
		100	
	21,6	50	
		100	
	38,6	50	
		100	
Bilirrubina no conjugada	7,6	50	2,5%
		100	
	29,3	50	
		100	
	42,5	50	
		100	
Triglicérido	7,6	7,5	-4,3%
		125	
		250	
		500	
	29,3	7,5	
		125	
		250	
		500	
	42,5	7,5	
		125	
		250	
		500	
Vitamina C	6,0	1	2,5%
		10	
		100	
	21,6	1	
		10	
		100	
	38,6	1	
		10	
		100	
Biotina	8,7	0,2	4,7%
		2	
		4	
	19,8	0,2	
		2	
		4	
	36,1	0,2	
		2	
		4	
Zemplar	17,6	0,0013	-4,4%
		0,0025	
		0,0050	
	33,5	0,0013	
		0,0025	
		0,0050	

**C. Precisión**

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

INTRA-ENSAYO				INTER-ENSAYO			
Muestra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Muestra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	24	5,5 ± 0,4	7,8	A	39	17,7 ± 1,3	7,4
B	35	27,4 ± 1,6	5,7	B	10	26,3 ± 1,2	4,7
C	35	43,0 ± 1,2	2,7	C	10	42,1 ± 1,8	4,3
D	24	81,2 ± 2,0	2,5	D	21	85,4 ± 7,8	9,2

SD: Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

**D. Reproducibilidad**

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

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

**E. Exactitud**

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

TEST DE RECUPERACIÓN	
25OH-Vit.D <sub>3</sub> añadido (ng/ml)	Recuperado (%)
0	100
25	96
50	92
25OH-Vit.D <sub>2</sub> añadido (ng/ml)	Recuperado (%)
0	100
25	105
50	95

Se analizó una muestra, con una concentración que se sabe que se distribuye en todo el intervalo de medición, en diluciones equidistantes, de acuerdo con el protocolo de dilución del capítulo V, para determinar el intervalo lineal del ensayo. Se realizó un análisis de regresión lineal. Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

Dilución de la muestra		Concentración teórica (ng/ml)	Concentración medida (ng/ml)	Pendiente	Ordenada en origen	R <sup>2</sup>	Recuperación (%)
1/1	con una muestra a 27,1 ng/ml	101.8	101.8	1.02	-1.91	>0.98	100
1/2		64.4	62.9				98
1/4		45.7	52.0				114
1/8		36.4	34.8				96
1/16		31.7	33.6				106

El intervalo lineal del ensayo fue de 33,6 ng/ml a 101,8 ng/ml.



**F. Tiempo de espera**

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

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

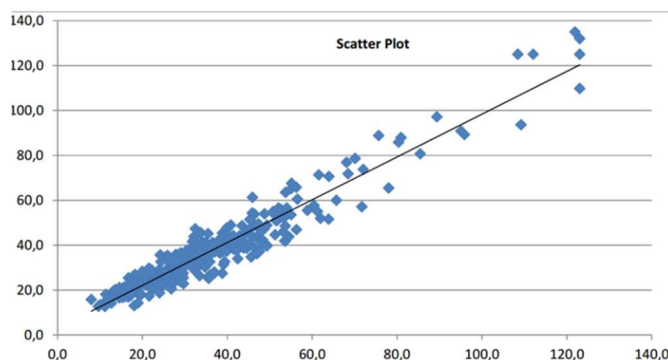
Los resultados del ensayo continúan siendo exactos aun cuando el tampón de incubación se dispensa 10 y 2 minutos después de que se ha añadido el calibrador en los pocillos recubiertos.

**G. Limitaciones de la prueba**

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

**H. Comparación de métodos**

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

**13. CONTROL DE CALIDAD INTERNO**

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la QC data sheet, 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.

**14. VALORES ESPERADOS**

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

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

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

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

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

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

**15. 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 MSDS.

**16. RESUMEN DEL PROTOCOLO**

	<b>CALIBRADORES (<math>\mu</math>l)</b>	<b>MUESTRA(S) CONTROL(ES) (<math>\mu</math>l)</b>
Calibradores (0-5)	50	-
Muestras, controles	-	50
Tampón de incubación	150	150
<p>Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente agitando continuamente a 400 rpm. Prepare el conjugado de HRP de trabajo durante la incubación y al menos 1 hora y 45 minutos antes de su uso.</p> <p><b>La secuencia de preparación es crucial, véase VII. Preparación de los reactivos.</b> Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 350 <math>\mu</math>l de la Solución de Lavado y aspirar.</p>		
Trabajo del conjugado HRP	200	200
<p>Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente agitando continuamente a 400 rpm. Aspirar el contenido de cada pocillo. Lavar 3 veces con 350 <math>\mu</math>l de la Solución de Lavado y aspirar.</p>		
Solución Cromogénica	100	100
<p>Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente agitando continuamente a 400 rpm.</p>		
Solución de Parada	100	100
<p>Leer con un lector de microplacas. Registrar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (contra 630 o 650 nm).</p>		

## 1. USO DEL KIT

Kit immunoenzimetrico per la determinazione quantitativa in vitro della 25-idrossivitaminina D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> (25OH-D<sub>2</sub> e 25OH-D<sub>3</sub>) nel siero.

## 2. INFORMAZIONI CLINICHE

Con il termine "Vitamina D" si intendono genericamente la Vitamina D<sub>2</sub>, o ergocalciferolo, e la Vitamina D<sub>3</sub>, o colecalciferolo. L'esposizione della cute ai raggi ultravioletti induce naturalmente la sintesi di Vitamina D<sub>3</sub> da parte dell'organismo umano. La Vitamina D<sub>3</sub> viene metabolizzata, principalmente nel fegato, a 25-idrossivitaminina D<sub>3</sub> (25OH-D<sub>3</sub>), la principale forma di Vitamina D circolante nell'organismo. La 25OH-D<sub>3</sub> è un precursore di altri metaboliti della Vitamina D, oltre ad avere essa stessa un'attività limitata. Il suo derivato più attivo è la 1,25-idrossivitaminina D<sub>3</sub>, prodotta dal rene (o dalla placenta) in seguito a idrossilazione della 25OH-D<sub>3</sub> in posizione 1. La 25OH-Vitamina D stimola l'assorbimento intestinale sia del calcio che del fosforo, oltre al riassorbimento e alla mineralizzazione delle ossa. La 25OH-Vitamina D può anche essere attiva in altri tessuti responsabili del trasporto del calcio (placenta, rene, ghiandola mammaria, ecc.) e nelle ghiandole endocrine (paratiroidi, beta cellule, ecc.). Le Vitamine D<sub>3</sub> e D<sub>2</sub> sono assimilabili anche da fonti alimentari e dalla supplementazione con integratori alimentari. Poiché la Vitamina D<sub>2</sub> è metabolizzata in modo simile alla Vitamina D<sub>3</sub>, entrambe queste vitamine contribuiscono allo stato complessivo di Vitamina D nell'organismo umano. Questo è il motivo per cui è molto importante misurare ugualmente entrambe le forme di 25OH-Vitamina D per effettuare una corretta diagnosi di carenza, insufficienza o intossicazione da Vitamina D. La carenza di Vitamina D è un importante fattore di rischio per rachitismo, osteomalacia, osteoporosi senile, cancro ed esiti sfavorevoli di una gravidanza. La misurazione di entrambe le forme di 25OH-Vitamina D è indispensabile anche quando è necessario determinare la causa di un'anomala concentrazione sierica di calcio in un paziente. È stato dimostrato che l'intossicazione da Vitamina D causa danni renali e tissutali.

## 3. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit Demeditec 25OH Vitamin D Total ELISA consiste in un saggio immuno-assorbente legato a enzima che si esegue su piastre da microtitolo. Nel corso di una prima fase di incubazione di 2 ore, a temperatura ambiente, la 25OH-Vitamina D totale (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) presente nei calibratori, nei controlli e nei campioni viene dissociata dalle proteine cui è legata nel siero e viene fissata sui siti di legame di un anticorpo monoclonale specifico. Dopo una fase di lavaggio, una quantità fissa di 25OH-Vitamina D marcata con biotina in presenza di perossidasi di rafano (HRP) compete con la 25OH-Vitamina D<sub>2</sub> e con la 25OH-Vitamina D<sub>3</sub> non marcate presenti sui siti di legame dell'anticorpo monoclonale specifico. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la piastra da microtitolo viene lavata per fermare la reazione di competizione. Si procede quindi con l'aggiunta della soluzione cromogena (TMB) e successiva incubazione per 30 minuti. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di Soluzione di arresto; quindi la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda adeguata. La quantità di turnover del substrato viene determinata colorimetricamente misurando l'assorbanza, che è inversamente proporzionale alla concentrazione totale di 25OH-Vitamina D (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>).

Si costruisce poi una curva di calibrazione e si calcolano le concentrazioni totali delle 25OH Vitamine D (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) mediante interpolazione della dose sulla curva di calibrazione.

## 4. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Quantità	Volume di ricostituzione
<b>SORB MT</b> Piastra di microtitolazione (96 pozzetti fragili) con anticorpo monoclonale anti 25OH-Vitamina.D <sub>2</sub> e D <sub>3</sub>	96 pozzetti	Pronte per l'uso
<b>CAL 0 LYO</b> Calibratore 0: matrice biologica con gentamicina e proclina	1 fialone liofilizzati	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
<b>CAL 1 - 5 LYO</b> Calibratori 1-5 (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle QC data sheet) in siero di cavallo con gentamicina e proclina	5 fialoni liofilizzati	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
<b>CONTROL 1 &amp; 2 LYO</b> Controlli N. = 2, in siero umano con proclina	2 fialoni liofilizzati	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
<b>INC BUF</b> Tampone di incubazione con caseina e proclina	1 fialone 20 ml	Pronte per l'uso
<b>25OH Vit D CONJ 100x</b> Coniugato concentrato di 25OH-Vitamina D	1 fialone 0,3 ml	Diluire 100 x con tampone coniugato
<b>HRP CONJ 200x</b> HRP concentrata	1 fialone 0,2 ml	Diluire 200 x con tampone coniugato
<b>CONJ DIL</b> Tampone coniugato con caseina e proclina	1 fialone 30 ml	Pronte per l'uso
<b>WASH SOLN 200x</b> Tampone di lavaggio (Tris – HCl)	1 fialone 10 ml	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
<b>SUB TMB</b> Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 fialone 12 ml	Pronte per l'uso
<b>STOP SOLN</b> Soluzione di arresto: HCl 1M	1 fialone 12 ml	Pronte per l'uso

**Nota:**

Per diluire i campioni con concentrazioni di vitamina D 25OH superiori alla massima concentrazione del calibratore, usare **CONTROL 1** o un campione di siero con concentrazione di 25OH inferiore a 25ng/mL e superiore a 4.4ng/mL (limite di quantificazione dell'analisi), come misurato in questa analisi. Usare **CONTROL 1** o questo campione per diluire 2X i campioni fuori dalla curva. Tenere presente la concentrazione del **CONTROL 1**\* o del campione basso quando si calcola il risultato della diluizione.

\* Usare la concentrazione di **CONTROL 1** misurata nella stessa fase della fase di diluizione, non la concentrazione media sull'etichetta di **CONTROL 1**!

**Calcoli:**

Valore campione = (valore misurato – **CONTROL 1** misurato F1\*) / F2  
con i seguenti valori per F1 e F2:

- campione diluito 2 volte, F1 = 0.5; F2 = 0.5
- campione diluito 4 volte, F1 = 0.75; F2 = 0.25
- campione diluito 8 volte, F1 = 0.875; F2 = 0.125

**Esempio:**

Un campione fuori dalla curva di calibrazione è diluito 4 volte con **CONTROL 1** ed è misurato a 70ng/mL. **CONTROL 1** è misurato nella stessa fase a 20ng/mL.

Diluizione 4 volte, F1 = 0.75; F2 = 0.25

Valore calcolato del campione = (70 – 0.75\*20)/0.25 = 220ng/mL

Non è disponibile alcun materiale di riferimento internazionale.



**5. REATTIVI NON FORNITI**

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

1. Acqua distillata
2. Pipette per dispensare 50 µl, 150 µl, 200µl e 1 ml (si raccomanda l'uso di pipette accurate con puntali di plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex
4. Agitatore magnetico
5. Agitatore per piastre (da 400 rpm)
6. Lavatrice per piastra di microtitolazione
7. Lettore piastra di microtitolazione con una potenza di lettura di 450 nm e 650 nm (lettura bicromatica)

**6. PREPARAZIONE DEI REATTIVI**

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

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

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

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

Preparare la soluzione secondo il numero di strisce utilizzate, come indicato nella tabella sottostante: per esempio per 6 strisce (48 pozzetti): 100 µl di coniugato concentrato e 50 µl di perossidasi di rafano concentrata a 10 ml di Tampone coniugato. Utilizzare un vortex per omogeneizzare. Fino al momento dell'uso, conservare il coniugato di lavoro HRP a temperatura ambiente e al riparo dalla luce diretta o utilizzare un flaconcino di vetro scuro durante la sua preparazione.

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

N. di strisce	Volume di tampone coniugato ( ml )	Volume di coniugato concentrato ( µl )	Volume di HRP concentrata ( µl )
1	3	30	15
2	5	50	25
3	6	60	30
4	8	80	40
5	9	90	45
6	10	100	50
7	12	120	60
8	14	140	70
9	16	160	80
10	18	180	90
11	20	200	100
12	22	220	110

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

## 7. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

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

## 8. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Questo kit è adatto per campioni di siero.
- Conservare i campioni di siero a 2-8 °C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, **si raccomanda di conservare i campioni a -20 °C.**
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.

## 9. METODO DEL DOSAGGIO

### A. Avvertenze generali

- Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.
- Non mescolare reattivi di lotti diversi.
- Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.
- Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione.
- Eseguire calibratori, controlli e campioni in doppio. Si raccomanda l'allineamento verticale.
- Utilizzare un contenitore di plastica pulito per preparare la soluzione di lavaggio.
- Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione.
- Per la distribuzione della soluzione cromogena e la Stop Solution evitare pipette con parti metalliche.
- L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio.
- Rispettare i tempi di incubazione.
- Per evitare derive, l'intervallo tra il pipettaggio del primo calibratore e l'ultimo campione deve essere limitato ai tempi riportati nella sezione 12, paragrafo E (Tempo Trascorso).
- Allestire una curva di calibrazione per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di calibrazione di sedute analitiche precedenti.
- Distribuzione della soluzione cromogena entro 15 minuti dopo il lavaggio della piastra di microtitolazione.
- Durante l'incubazione con la soluzione cromogena evitare la luce diretta del sole sulla piastra di microtitolazione.



**B. Metodo del dosaggio**

1. Selezionare il numero di strisce reagenti necessario per il test. Le strisce inutilizzate devono essere risigillate nel contenitore con un essiccante e conservate a 2-8°C
2. Incastrare le strisce nel supporto a cornice.
3. Pipettare 50 µl di ogni calibratore, controllo e campione nei pozzetti adeguati.
4. Pipettare 150 µl di tampone di incubazione in tutti i pozzetti.
5. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente, su un agitatore per piastre (da 400 rpm)  
Preparare la soluzione di lavoro con coniugato HRP durante l'incubazione e almeno 1 ora e 45 minuti prima dell'uso.
6. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
7. Lavare la piastra 3 volte mediante:
  - erogazione di 0,35 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
  - aspirazione del contenuto di ogni pozzetto
8. Pipettare 200 µl della soluzione di lavoro con coniugato HRP in ogni pozzetto. Incubare la piastra di microtitolazione per 30 minuti a temperatura ambiente, su un agitatore per piastre (da 400 rpm)
9. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
10. Lavare la piastra 3 volte mediante:
  - erogazione di 0,35 ml di soluzione di lavaggio in ogni pozzetto
  - aspirazione del contenuto di ogni pozzetto
11. Pipettare in ogni pozzetto 100 µl di Soluzione Cromogena entro 15 minuti dal termine della fase di lavaggio.
12. Incubare la piastra di microtitolazione per 15 minuti a temperatura ambiente, su un agitatore per piastre (da 400 rpm) evitare la luce diretta del sole.
13. Pipettare 100 µl di soluzione di arresto in ogni pozzetto.
14. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento a 630 nm o 650 nm) entro un'ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione 10.

**10. CALCOLO DEI RISULTATI**

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento impostato su 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Si raccomanda l'utilizzo di metodi computerizzati per costruire la curva di taratura. Il metodo preferito si basa sull'adattamento della curva logistica a 4 parametri.
4. Per interpolazione dei valori di OD dei campioni, determinare le rispettive concentrazioni di 25OH-Vitamina D dalla curva di taratura.

**11. CARATTERISTICHE TIPICHE**

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

25OH-EASIA		Unità OD
Calibratore	0 ng/ml	2,66
	5,3 ng/ml	2,39
	15 ng/ml	1,83
	25,7 ng/ml	1,46
	54,3 ng/ml	0,81
	133 ng/ml	0,21

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

## 12. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

### A. Limiti di rilevazione

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevazione (LoD) e il limite di quantizzazione (LoQ) sono stati stabiliti secondo le linee guida CLSI EP17-A.

Il LoB è stato calcolato misurando più volte il bianco e calcolando il 95° percentile della distribuzione dei valori dei test. Il LoB è risultato essere pari a 1,69 ng/ml.

Il LoD è stato calcolato come descritto nelle linee guida. Il LoD è risultato essere pari a 2,81 ng/ml.

Il LoQ è stato calcolato analizzando per 14 volte in test diversi 5 campioni dai quali erano stati ottenuti valori bassi. Il LoQ è risultato essere pari a 4,39 ng/ml con un CV del 20%.

### B. Specificità

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

Composto e Concentrazione	Reazione crociata (%)
25OH-Vitamina D <sub>3</sub> a 10 ng/ml	100
25OH-Vitamina D <sub>2</sub> a 10 ng/ml	86
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D <sub>3</sub> a 200 ng/ml	20
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D <sub>2</sub> a 690 ng/ml	1,9
Vitamina D <sub>3</sub> a 200 ng/ml	2,9
Vitamina D <sub>2</sub> a 200 ng/ml	1,3
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D <sub>3</sub> a 20 ng/ml	>100
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D <sub>3</sub> a 4 ng/ml	>100
3-epi-25OH-Vitamina D <sub>3</sub> a 20 µg/ml	0,1

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

Sostanza	25OH-Vitamina D (ng/ml)	Concentrazione di interferente (mg/dl)	Variazione % media
Emoglobina	7,6	250	-0,6%
		500	
	29,3	250	
		500	
	42,5	250	
		500	
Bilirubina coniugata	6,0	50	-3,4%
		100	
	21,6	50	
		100	
	38,6	50	
		100	
Bilirubina non coniugata	7,6	50	2,5%
		100	
	29,3	50	
		100	
	42,5	50	
		100	
Trigliceride	7,6	7,5	-4,3%
		125	
		250	
		500	
	29,3	7,5	
		125	
		250	
		500	
	42,5	7,5	
		125	
		250	
		500	
Vitamina C	6,0	1	2,5%
		10	
		100	
	21,6	1	
		10	
		100	
	38,6	1	
		10	
		100	
Biotina	8,7	0,2	4,7%
		2	
		4	
	19,8	0,2	
		2	
		4	
	36,1	0,2	
		2	
		4	
Zemplar	17,6	0,0013	-4,4%
		0,0025	
		0,0050	
	33,5	0,0013	
		0,0025	
		0,0050	

**C. Precisione**

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

INTRA-SAGGIO				INTER-SAGGIO			
Campione	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Campione	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	5,5 ± 0,4	7,8	A	39	17,7 ± 1,3	7,4
B	35	27,4 ± 1,6	5,7	B	10	26,3 ± 1,2	4,7
C	35	43,0 ± 1,2	2,7	C	10	42,1 ± 1,8	4,3
D	24	81,2 ± 2,0	2,5	D	21	85,4 ± 7,8	9,2

SD: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

**D. Riproducibilità**

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

Campione	n	ng/ml		Intra-saggio	Inter-saggio	Inter-die	Inter-Tecnico	Inter-Laboratorio	Totale
1	57	25,5	SD	0,22	0,61	0,98	1,54	2,21	2,59
			CV	0,3%	0,9%	3,8%	6,0%	8,7%	10,2%
2	57	52,9	SD	0,64	1,57	1,11	2,28	4,29	5,19
			CV	0,9%	2,3%	2,1%	4,3%	8,1%	9,8%
3	57	124,9	SD	1,00	1,74	1,84	3,39	4,98	6,25
			CV	1,4%	2,5%	1,5%	2,7%	4,0%	5,0%

**E. Accuratezza**

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

TEST DI RECUPERO	
25OH-Vit.D <sub>3</sub> aggiunta (ng/ml)	Recupero (%)
0	100
25	96
50	92
25OH-Vit.D <sub>2</sub> aggiunta (ng/ml)	Recupero (%)
0	100
25	105
50	95

È stato testato con diluizioni equidistanti un campione con una concentrazione nota da distribuire nell'intervallo misurabile, secondo il protocollo di diluizione al capitolo V, per stabilire l'intervallo lineare dell'analisi. È stata eseguita un'analisi di regressione lineare. I risultati sono riassunti nella tabella seguente:

Diluizione del campione		Concentrazione teorica (ng/mL)	Concentrazione misurata (ng/mL)	Pen- denza	Inter- cetta Y	R <sup>2</sup>	Recu- pero (%)
1/1	con un campione a 27,1ng/mL	101.8	101.8	1.02	-1.91	>0.98	100
1/2		64.4	62.9				98
1/4		45.7	52.0				114
1/8		36.4	34.8				96
1/16		31.7	33.6				106

L'intervallo lineare dell'analisi riscontrato è tra 33,6 ng/mL e 101,8 ng/mL.

**F. Ritardo temporale**

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

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

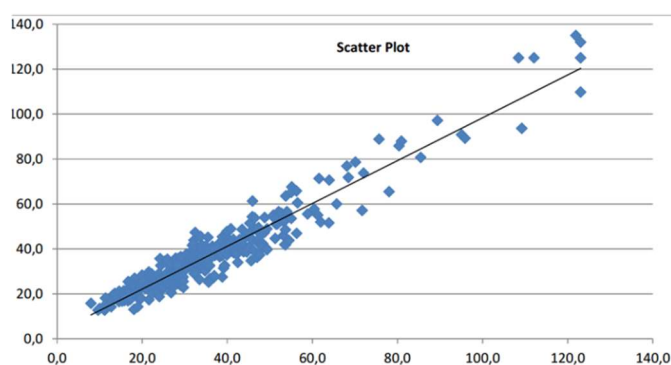
I risultati del saggio rimangono accurati anche quando il campione di incubazione viene aggiunto 10 e 20 minuti dopo l'aggiunta del calibratore nei pozzetti rivestiti.

**G. Limiti del test**

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

**H. Confronto tra metodi**

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

**13. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO**

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

#### 14. VALORI ATTESI

È noto che l'apporto dietetico, la razza, la stagione e l'età influiscono sui normali livelli di 25OH-Vitamina D<sub>3</sub>. Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento in base alla propria popolazione locale.

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

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

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

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

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

#### 15. PRECAUZIONI PER L'USO

##### Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

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

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

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

Non consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Usare indumenti protettivi e guanti monouso. Per ulteriori informazioni, consultare l'MSDS.

**16. SCHEMA DEL DOSAGGIO**

	<b>CALIBRATORE µl</b>	<b>CAMPIONI CONTROLLI µl</b>
Calibratore (0-5)	50	-
Campioni, Controlli	-	50
Tampone di incubazione	150	150
<p>Incubare per 2 ore a temperatura ambiente sotto agitazione continua a 400 rpm. Preparare la soluzione di lavoro coniugata con perossidasi di rafano nel corso dell'incubazione e almeno 1h 45 minuti prima dell'uso. <b>La sequenza di preparazione è fondamentale, cfr. VII.</b> <b>Preparazione del reagente.</b> Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 350 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.</p>		
Soluzione di lavoro con coniugato HRP	200	200
<p>Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione continua a 400 rpm. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 350 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.</p>		
Soluzione chromogena	100	100
<p>Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente sotto agitazione continua a 400 rpm.</p>		
Soluzione di arresto	100	100
<p>Leggere su un lettore per piastra da microtitolazione. Registrare l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (rispetto a 630 o 650 nm).</p>		

## 1. BUT DU DOSAGE

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

## 2. CONTEXTE CLINIQUE

La vitamine D est le terme générique utilisé pour désigner la vitamine D2, ou ergocalciférol, et la vitamine D3, ou cholécalciférol. L'homme produit naturellement de la vitamine D lorsque sa peau est exposée aux ultraviolets des rayons solaires. La vitamine D3 est métabolisée, principalement dans le foie, en 25-hydroxyvitamine D3 (25OH D3) qui est la forme principale de la vitamine D circulante dans le corps. La 25OH D3 est un précurseur d'autres métabolites de la vitamine D et possède en elle-même une activité limitée. Le dérivé le plus actif est la 1,25-hydroxyvitamine D3 produite par le rein (ou le placenta) par 1-hydroxylation de la 25OH D3. La 25OH vitamine D3 stimule l'absorption intestinale à la fois du calcium et du phosphore ainsi que la résorption et la minéralisation de l'os. La 25OH vitamine D peut également être active sur d'autres tissus responsables du transport du calcium (placenta, rein, glande mammaire,...) et sur les glandes endocrines (glandes parathyroïdes, cellules bêta,...). Une autre source de vitamine D3 et de vitamine D2 est l'alimentation ou la prise de suppléments diététiques. La vitamine D2 étant métabolisée par une voie similaire à la vitamine D3, les deux formes de la vitamine contribuent au statut général en vitamine D d'un individu. C'est la raison pour laquelle il est très important de doser les deux formes de la 25OH vitamine D pour un faire diagnostic correct de carence, insuffisance ou intoxication en vitamine D. La carence en vitamine D est un facteur de risque important de rachitisme, ostéomalacie, ostéoporose sénile, cancer et mauvaise évolution de la grossesse. Le dosage des deux formes de la vitamine D est aussi requis pour déterminer la cause d'une concentration anormale de calcium dans le sérum. Il a été démontré qu'une intoxication en vitamine D provoque des dommages aux reins et à d'autres tissus.

## 3. PRINCIPES DU DOSAGE

L'ELISA Demeditec 25OH Vitamin D Total est un essai immunoenzymatique en phase solide réalisé sur des plaques de microtitration. Une première incubation se fait à température ambiante et dure 2 heures. Durant cette étape, la vitamine D 25OH totale (D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>) présente dans les calibrateurs, les contrôles et les échantillons est libérée de sa liaison aux protéines de liaison du sérum et se fixe sur les sites de fixation d'un anticorps monoclonal spécifique. Après 1 étape de lavage, une quantité déterminée de vitamine D 25OH marquée à la biotine entre en compétition avec les vitamines D<sub>2</sub> 25OH et D<sub>3</sub> 25OH non marquées présentes pour les sites de liaison de l'anticorps monoclonal spécifique, en présence de peroxydase de raifort (HRP). Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la plaque de microtitration est lavée afin d'arrêter la réaction de compétition. Une solution chromogène (TMB) est ajoutée et incubée pour 15 minutes. La réaction est arrêtée avec l'addition de Solution d'arrêt et la microplaque est alors lue à la longueur d'onde appropriée. La quantité de remplacement de substrat est déterminée colorimétriquement par la mesure de l'absorbance, qui est inversement proportionnelle à la concentration en vitamine D 25OH totale (D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>).

Une courbe de calibration est tracée et les concentrations en 25OH vitamine D totale (D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>) des échantillons sont déterminées par interpolation de la concentration sur la courbe de calibration.



## 4. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Quantité	Reconstitution
<b>SORB MT</b> Plaques de micro-titration (96 puits cassables) avec l'anti 25OH-Vitamine D <sub>2</sub> et D <sub>3</sub> (anticorps monoclonaux)	96 puits	Prêt à l'emploi
<b>CAL 0 LYO</b> Calibrateur 0 : matrice biologique avec gentamycine et ProClin	1 flacon lyophil.	Ajouter 1 ml d'eau distillée
<b>CAL 1 - 5 LYO</b> Calibrateurs 1-5 (cfr. valeurs exactes sur QC data sheet) dans du sérum de cheval avec gentamycine et ProClin	5 flacons lyophil.	Ajouter 1 ml d'eau distillée
<b>CONTROL 1 &amp; 2 LYO</b> Contrôles - N = 2 dans du sérum humain avec ProClin	2 flacons lyophil.	Ajouter 1 ml d'eau distillée
<b>INC BUF</b> Tampon d'incubation avec caséine et ProClin	1 flacon 20 ml	Prêt à l'emploi
<b>25OH Vit D CONJ 100x</b> Conjugué concentré de la Vit D 25OH	1 flacon 0,3 ml	Diluer 100 x avec du tampon du conjugué
<b>HRP CONJ 200x</b> HRP concentré	1 flacon 0,2 ml	Diluer 200 x avec du tampon du conjugué
<b>CONJ DIL</b> Tampon du conjugué avec caséine et ProClin	1 flacon 30 ml	Prêt à l'emploi
<b>WASH SOLN 200x</b> Solution de Lavage (Tris-HCl)	1 flacon 10 ml	Diluer 200 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
<b>SUB TMB</b> Solution Chromogène TMB (Tetramethylbenzidine)	1 flacon 12 ml	Prêt à l'emploi
<b>STOP SOLN</b> Solution d'arrêt HCl 1M	1 flacon 12 ml	Prêt à l'emploi

**Remarque:**

Pour la dilution des échantillons ayant des concentrations de 25OH Vitamine D supérieures à la plus haute concentration du calibrateur, utiliser le **CONTROL 1** ou un échantillon de sérum avec une concentration de 25OH inférieure à 25ng /mL et supérieure à 4,4ng / mL (limite de quantification du dosage) dans ce test. Utilisez le **CONTROL 1** ou cet exemple pour diluer 2 fois les échantillons hors courbes. Prendre en compte la concentration du **CONTROL 1**\* ou de l'échantillon bas lors du calcul du résultat de la dilution.

\* Utilisez la concentration de **CONTROL 1** mesurée dans le même cycle que la dilution, pas la concentration moyenne sur l'étiquette du **CONTROL 1**!

**Calculs:**

Valeur de l'échantillon = (Valeur mesurée - F1 \* Mesuré **CONTROL 1**) / F2

avec les valeurs suivantes pour F1 et F2:

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

**Exemple:**

Un échantillon hors de la courbe d'étalonnage est dilué 4 fois avec le **CONTROL 1** et mesuré à 70ng/mL. Le **CONTROL 1** est mesuré dans la même série à 20ng / mL.

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

Exemple de valeur calculée = (70 - 0,75 \* 20) / 0,25 = 220 ng / ml

Des références internationales ne sont pas disponibles.

## 5. MATÉRIEL NON FOURNI

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

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 50 µl, 150 µl, 200 µl et 1 ml (il est recommandé d'utiliser des pipettes de précision avec des pointes en plastique à usage unique)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de plaques (400 tpm)
6. Laveur de micro-plaques
7. Lecteur de micro-plaques capable de lire à 450 nm et 650 nm (lecture bichromatique)

## 6. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

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

**! La solution du conjugué HRP de travail doit être préparée pendant l'incubation et au minimum 1h45 avant son utilisation cf X.B.5)**

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

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

Préparer la solution du conjugué HRP de travail pour le nombre de barrettes utilisées, comme le tableau ci-dessous l'indique: par exemple, pour 6 barrettes (48 puits), 100 µl de conjugué concentré et 50 µl de HRP concentrée pour 10 ml de tampon de conjugué.

Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser.

Laisser le conjugué HRP de travail à température ambiante jusqu'à ce qu'il soit utilisé et éviter les rayons direct du soleil ou utiliser une bouteille en verre brun pour sa préparation.

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

Nb de barrettes	Volume de tampon du conjugué ( ml )	Volume de conjugué concentré ( µl )	Volume de HRP concentrée ( µl )
1	3	30	15
2	5	50	25
3	6	60	30
4	8	80	40
5	9	90	45
6	10	100	50
7	12	120	60
8	14	140	70
9	16	160	80
10	18	180	90
11	20	200	100
12	22	220	110

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

## 7. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES RÉACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables huit semaines entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à -20°C pendant 4 mois maximum. Éviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

## 8. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON

- Cette trousse convient pour des échantillons de sérum.
- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, **un stockage à -20°C est recommandé.**
- Éviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

## 9. MODE OPÉRATOIRE

### A. Notes de manipulation

- Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration.
- Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.
- Mélangez tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce.
- Réaliser les calibrateurs, les contrôles et les échantillons en double. Un alignement vertical est recommandé.
- Utiliser un récipient en plastic 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 12 paragraphe E (Délai).**
- Préparer une courbe d'étalonnage pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.
- Distribuer la solution du chromogène dans les 15 minutes après le lavage de la plaque de microtitration.
- Éviter exposition à la lumière du soleil lors de l'incubation avec la solution du chromogène.

**B. Mode opératoire**

1. Sélectionner le nombre de barrettes nécessaire pour la série. Les barrettes non utilisées doivent être cachetées de nouveau dans le sachet avec un dessiccateur et gardées à 2-8°C.
2. Mettre les barrettes dans le cadre de maintien.
3. Pipeter 50 µl de chaque Calibrateur, Contrôle et Échantillon dans les puits appropriés.
4. Pipeter 150 µl de tampon d'incubation dans les puits.
5. Incuber pendant 2 heures à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tpm). Préparer la solution du conjugué HRP de travail pendant l'incubation et au minimum 1h45 avant son utilisation.
6. Aspirer le liquide de chaque puits.
7. Laver la plaque 3 fois en:
  - distribuant 0,35 ml de solution de lavage dans chacun des puits
  - aspirant le contenu de chacun des puits
8. Pipeter 200 µl de la solution du conjugué HRP de travail dans chacun des puits. Incuber la micro-plaque pendant 30 minutes à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tpm).
9. Aspirer le liquide de chaque puits.
10. Laver la plaque 3 fois en:
  - distribuant 0,35 ml de solution de lavage dans chacun des puits
  - aspirant le contenu de chacun des puits
11. Pipeter 100 µl de la solution chromogène dans chaque puits dans les 15 minutes après la phase de lavage.
12. Incuber la micro-plaque pendant 15 minutes à température ambiante, sur un agitateur de plaques (400 tpm), éviter exposition à la lumière du soleil.
13. Pipeter 100 µl de la Solution d'arrêt dans chaque puits.
14. Lire les absorbances à 450 nm (filtre de référence 630 nm ou 650 nm) endéans l'heure et calculer les résultats comme décrits dans la section 10.

**10. CALCUL DES RÉSULTATS**

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

**11. DONNÉES TYPES**

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

25OH-EASIA		Unités DO
Calibrateur	0 ng/ml	2,66
	5,3 ng/ml	2,39
	15 ng/ml	1,83
	25,7 ng/ml	1,46
	54,3 ng/ml	0,81
	133 ng/ml	0,21

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

## 12. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

### A. Limites de détection

La limite du blanc (LoB), la limite de détection et la limite de quantification (LoQ) ont été déterminées en suivant la directive CLSI EP17-A.

La LoB a été calculée en mesurant le blanc plusieurs fois et en calculant le percentile 95 de la distribution des valeurs d'analyse. La LoB calculée est de 1,69 ng/mL.

La LoD a été calculée comme décrit dans la directive. La LoD calculée est de 2,81 ng/mL.

La LoQ a été calculée en testant 14 fois dans des analyses différentes 5 échantillons ayant une valeur faible. La LoQ calculée est de 4,39 ng/mL avec un CV de 20%.

### B. Spécificité

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

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

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

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

Substance	25OH Vitamine D (ng/ml)	Concentration de l'interférent (mg/dl)	Variation moyenne %
Hémoglobine	7,6	250	-0,6%
		500	
	29,3	250	
		500	
	42,5	250	
		500	
Bilirubine conjuguée	6,0	50	-3,4%
		100	
	21,6	50	
		100	
	38,6	50	
		100	
Bilirubine non conjuguée	7,6	50	2,5%
		100	
	29,3	50	
		100	
	42,5	50	
		100	
Triglycérides	7,6	7,5	-4,3%
		125	
		250	
		500	
	29,3	7,5	
		125	
		250	
		500	
	42,5	7,5	
		125	
		250	
		500	
Vitamine C	6,0	1	2,5%
		10	
		100	
	21,6	1	
		10	
		100	
	38,6	1	
		10	
		100	
Biotine	8,7	0,2	4,7%
		2	
		4	
	19,8	0,2	
		2	
		4	
	36,1	0,2	
		2	
		4	
Zemplar	17,6	0,0013	-4,4%
		0,0025	
		0,0050	
	33,5	0,0013	
		0,0025	
		0,0050	

**C. Précision**

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

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Echantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Echantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	24	5,5 ± 0,4	7,8	A	39	17,7 ± 1,3	7,4
B	35	27,4 ± 1,6	5,7	B	10	26,3 ± 1,2	4,7
C	35	43,0 ± 1,2	2,7	C	10	42,1 ± 1,8	4,3
D	24	81,2 ± 2,0	2,5	D	21	85,4 ± 7,8	9,2

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

**D. Reproductibilité**

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

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

**E. Exactitude**

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

TEST DE RECUPÉRATION	
25OH-Vit.D <sub>3</sub> ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
0	100
25	96
50	92
25OH-Vit.D <sub>2</sub> ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
0	100
25	105
50	95

Un échantillon dont la concentration est connue pour être répartie dans toute la gamme mesurable a été testé à des dilutions équidistantes, conformément au protocole de dilution du chapitre V, pour déterminer la gamme linéaire du test. Une analyse de régression linéaire a été effectuée. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Dilution de l'échantillon		Concentration théorique (ng/mL)	Concentration mesurée (ng/mL)	Pente	Y-Intercept	R <sup>2</sup>	Récupération (%)
1/1	avec un échantillon à 27,1 ng / mL	101.8	101.8	1.02	-1.91	>0.98	100
1/2		64.4	62.9				98
1/4		45.7	52.0				114
1/8		36.4	34.8				96
1/16		31.7	33.6				106

La plage linéaire du test est de 33,6 ng / ml à 101,8 ng / ml.

**F. Délai**

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

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

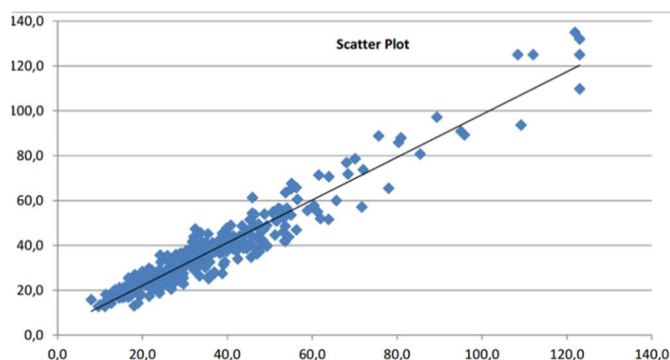
Les résultats de l'essai restent précis même lorsque le tampon d'incubation est distribué 10 et 20 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux puits tapissés

**G. Limites de la procédure**

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

**H. Comparaison de la méthode**

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

**13. CÔNTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE**

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



## 14. VALEURS ATTENDUES

L'alimentation, la race, la saison et l'âge ont une influence sur les taux de 25OH.Vitamin D<sub>3</sub>. normaux. Tous les laboratoires doivent établir leur fourchette à partir de leur population locale.

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

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

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

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

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

## 15. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic in vitro uniquement.

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

Éviter le contact de la peau avec tous les réactifs, la solution d'arrêt contient du 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, se référer à la MSDS.














**16. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE**

	<b>CALIBRATEURS µl</b>	<b>ÉCHANTILLON(S) CONTRÔLE(S) µl</b>
Calibrateurs (0-5) Échantillons, Contrôles Tampon d'incubation	50 - 150	- 50 150
Incuber pendant 2 heures à température ambiante sous agitation continue à 400 tpm. Préparer la solution du conjugué HRP de travail pendant l'incubation et au minimum 1h45 avant son utilisation. <b>La séquence de préparation est critique (cfr VII. PREPARATION DES REACTIFS)</b> Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 350 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Conjugué HRP de travail	200	200
Incuber pendant 30 min à température ambiante sous agitation continue à 400 tpm. Aspirer le contenu de chaque puits. Laver 3 fois avec 350 µl de la Solution de Lavage et aspirer.		
Solution du chromogène	100	100
Incuber pendant 15 min à température ambiante sous agitation continue à 400 tpm.		
Solution d'arrêt	100	100
Lire sur un lecteur de micro-plaques. Enregistrer l'absorbance de chaque puits à 450 nm (contre 630 ou 650 nm)		

**BIBLIOGRAPHY**

1. ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
2. HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
3. HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997) **Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.** Osteoporos. Int., 7:439-443.
5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006) **Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.** Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
6. HOLICK M.F.(2004) **Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.** Am. J. Clin. Nutr., 80:16788S-1688S.
7. HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D.** Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34: 16-19.
8. HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.
9. TAHA N. M. , VIETH R.(2010) **The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status.** Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34: 28-30
10. HOLICK M.F. (2009) **Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application** Ann. Epidemiol., 19:73-78.
11. **National Osteoporosis Foundation. Prevention – Vitamin D**  
<http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitamins>
12. EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta