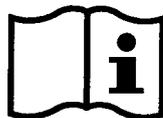


Product information



User's Manual



Distribuito in ITALIA da
Li StarFish S.r.l.
Via Cavour, 35
20063 Cernusco S/N (MI)
telefono 02-92150794
info@listarfish.it
www.listarfish.it

25-OH Vitamin D total ELISA

Enzyme immunoassay for the quantitative measurement of
25-hydroxyvitamin D2 and D3 (25OH-D2 and 25OH-D3) in serum



DE1971



96 wells

1. INTENDED USE

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

2. CLINICAL BACKGROUND

Vitamin D is the generic term used to designate Vitamin D₂ or ergocalciferol and Vitamin D₃ or cholecalciferol. Humans naturally produce Vitamin D₃ when the skin is exposed to ultraviolet sun rays.

In the liver mainly, Vitamin D₃ is metabolised into 25-Hydroxyvitamin D₃ (25OH D₃) which is the main form of Vitamin D circulating in the body. 25OH D₃ is a precursor for other Vitamin D metabolites and has also a limited activity by itself. The most active derivative is 1,25-hydroxyvitamin D₃, produced in the kidney (or placenta) by 1-hydroxylation of 25OH D₃. 25OH Vitamin D stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus and also bone resorption and mineralisation. 25OH Vitamin D might also be active in other tissues responsible for calcium transport (placenta, kidney, mammary gland ...) and endocrine gland (parathyroid glands, beta cells...). Vitamin D₃ and Vitamin D₂ are also available by ingestion through food or dietary supplementation. As Vitamin D₂ is metabolised in a similar way to Vitamin D₃, both contribute to the overall Vitamin D status of an individual. It is the reason why it is very important to measure both forms of 25OH Vitamin D equally for a correct diagnosis of Vitamin D deficiency, insufficiency or intoxication. Vitamin D deficiency is an important risk factor for rickets, osteomalacia, senile osteoporosis, cancer and pregnancy outcomes. The measurement of both 25OH Vitamin D forms is also required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients. Vitamin D intoxication has been shown to cause kidney and tissue damages.

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 (D₂ and D₃) 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 D₂ and 25OH Vitamin D₃ 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 (D₂ and D₃) concentration.

A calibration curve is plotted and the total 25OH Vitamin D (D₂ and D₃) concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

4. REAGENTS PROVIDED

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

Note:

For dilution of samples having concentrations of 25OH Vitamin D above the highest calibrator concentration, use **CONTROL 1** or a serum sample with a concentration of 25OH below 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 ₃ at 10 ng/mL	100
25OH-Vitamin D ₂ at 10 ng/mL	86
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	20
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₂ at 690 ng/mL	1.9
Vitamin D ₃ at 200 ng/mL	2.9
Vitamin D ₂ at 200 ng/mL	1.3
24,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 20 ng/mL	>100
25,26(OH) ₂ -Vitamin D ₃ at 4 ng/mL	>100
3-epi-25OH-Vitamin D ₃ at 20 µg/mL	0.1

The effect of potential interfering substances on samples using the 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:

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

E. Accuracy

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

RECOVERY TEST	
Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Recovery (%)
0	100
25	96
50	92
Added 25OH-Vit.D ₂ (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 Concentration (ng/mL)	Measured Concentration (ng/mL)	Slope	Y-Intercept	R ²	Recovery (%)
1/1		101.8	101.8	1.02	-1.91	>0.98	100
1/2	with a Ctrl 1 measured 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

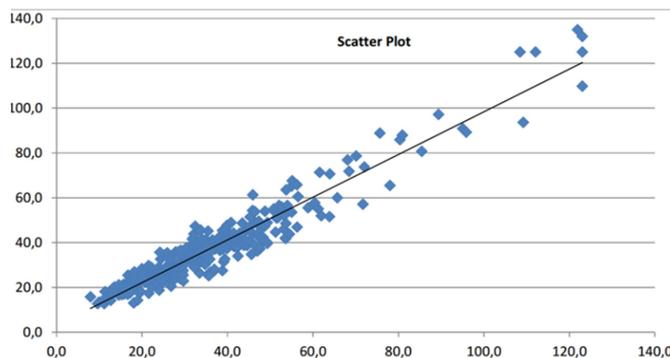
Assay results remain accurate even when incubation buffer is dispensed 10 and 20 minutes after the Calibrator has been added in the coated wells.

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

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

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

	CALIBRATORS (μl)	SAMPLE(S) CONTROLS (μl)
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. The sequence of preparation is critical, see VII. Reagent Preparation Aspirate the contents of each well. Wash 3 times with 350 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Working HRP Conjugate	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 μ l of Wash Solution and aspirate.		
Chromogenic Solution	100	100
Incubate for 15 min at room temperature with continuous shaking at 400 rpm.		
Stop Solution	100	100
Read on a microtiterplate reader. Record the absorbance of each well at 450 nm (versus 630 or 650 nm).		

1. USO DEL KIT

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

2. INFORMAZIONI CLINICHE

Con il termine "Vitamina D" si intendono genericamente la Vitamina D₂, o ergocalciferolo, e la Vitamina D₃, o colecalciferolo. L'esposizione della cute ai raggi ultravioletti induce naturalmente la sintesi di Vitamina D₃ da parte dell'organismo umano. La Vitamina D₃ viene metabolizzata, principalmente nel fegato, a 25-idrossivitamina D₃ (25OH-D₃), la principale forma di Vitamina D circolante nell'organismo. La 25OH-D₃ è un precursore di altri metaboliti della Vitamina D, oltre ad avere essa stessa un'attività limitata. Il suo derivato più attivo è la 1,25-idrossivitamina D₃, prodotta dal rene (o dalla placenta) in seguito a idrossilazione della 25OH-D₃ in posizione 1. La 25OH-Vitamina D stimola l'assorbimento intestinale sia del calcio che del fosforo, oltre al riassorbimento e alla mineralizzazione delle ossa. La 25OH-Vitamina D può anche essere attiva in altri tessuti responsabili del trasporto del calcio (placenta, rene, ghiandola mammaria, ecc.) e nelle ghiandole endocrine (paratiroidi, beta cellule, ecc.). Le Vitamine D₃ e D₂ sono assimilabili anche da fonti alimentari e dalla supplementazione con integratori alimentari. Poiché la Vitamina D₂ è metabolizzata in modo simile alla Vitamina D₃, entrambe queste vitamine contribuiscono allo stato complessivo di Vitamina D nell'organismo umano. Questo è il motivo per cui è molto importante misurare ugualmente entrambe le forme di 25OH-Vitamina D per effettuare una corretta diagnosi di carenza, insufficienza o intossicazione da Vitamina D. La carenza di Vitamina D è un importante fattore di rischio per rachitismo, osteomalacia, osteoporosi senile, cancro ed esiti sfavorevoli di una gravidanza. La misurazione di entrambe le forme di 25OH-Vitamina D è indispensabile anche quando è necessario determinare la causa di un'anomala concentrazione sierica di calcio in un paziente. È stato dimostrato che l'intossicazione da Vitamina D causa danni renali e tissutali.

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 (D₂ e D₃) 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 D₂ e con la 25OH-Vitamina D₃ 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 (D₂ e D₃). Si costruisce poi una curva di calibrazione e si calcolano le concentrazioni totali delle 25OH Vitamine D (D₂ e D₃) mediante interpolazione della dose sulla curva di calibrazione.

4. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Quantità	Volume di ricostituzione
SORB MT Piastra di microtitolazione (96 pozzetti fragili) con anticorpo monoclonale anti 25OH-Vitamina.D ₂ e D ₃	96 pozzetti	Pronte per l'uso
CAL 0 Calibratore 0: matrice biologica con gentamicina e proclina	1 fialone liofilizzati	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
CAL 1 – 5 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
CONTROL 1 & 2 Controlli N. = 2, in siero umano con proclina	2 fialoni liofilizzati	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
INC BUF Tampone di incubazione con caseina e proclina	1 fialone 20 ml	Pronte per l'uso
25OH Vit D CONJ 100x Coniugato concentrato di 25OH-Vitamina D	1 fialone 0,3 ml	Diluire 100 x con tampone coniugato
HRP CONJ 200x HRP concentrata	1 fialone 0,2 ml	Diluire 200 x con tampone coniugato
CONJ DIL Tampone coniugato con caseina e proclina	1 fialone 30 ml	Pronte per l'uso
WASH SOLN 200x Tampone di lavaggio (Tris – HCl)	1 fialone 10 ml	Diluire 200 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
SUB TMB Soluzione Cromogena TMB (tetrametilbenzidina)	1 fialone 12 ml	Pronte per l'uso
STOP SOLN 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 ₃ a 10 ng/ml	100
25OH-Vitamina D ₂ a 10 ng/ml	86
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₃ a 200 ng/ml	20
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₂ a 690 ng/ml	1,9
Vitamina D ₃ a 200 ng/ml	2,9
Vitamina D ₂ a 200 ng/ml	1,3
24,25(OH) ₂ -Vitamina D ₃ a 20 ng/ml	>100
25,26(OH) ₂ -Vitamina D ₃ a 4 ng/ml	>100
3-epi-25OH-Vitamina D ₃ 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.

Demeditec 25-OH Vitamin D total ELISA DE1971

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 ₃ aggiunta (ng/ml)	Recupero (%)
0	100
25	96
50	92
25OH-Vit.D ₂ 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)	Pendenza	Intercetta Y	R ²	Recupero (%)
1/1		101.8	101.8	1.02	-1.91	>0.98	100
1/2	con un campione a 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

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

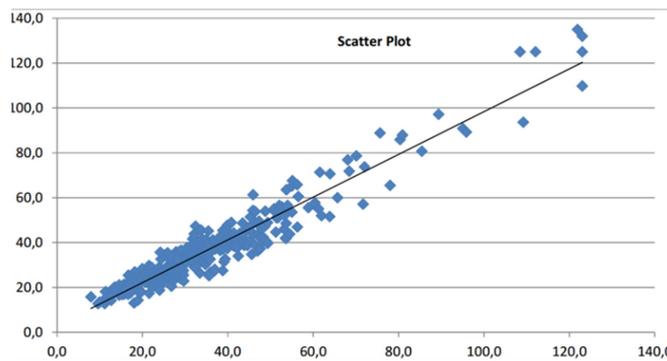
I risultati del saggio rimangono accurati anche quando il campione di incubazione viene aggiunto 10 e 20 minuti dopo l'aggiunta del calibratore nei pozzetti rivestiti.

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 D₃. Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento in base alla propria popolazione locale.

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

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

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

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

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

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

	CALIBRATORE µl	CAMPIONI CONTROLLI µl
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. La sequenza di preparazione è fondamentale, cfr. VII. Preparazione del reagente. Aspirare il contenuto di ogni pozzetto. Lavare 3 volte con 350 µl di soluzione di lavaggio e aspirare.</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>		

17. BIBLIOGRAPHY

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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	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	Ussage 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 Cat.
	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	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	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>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore