



Instructions for Use

25OH Vitamin D total RIA

IVD



REF RIA-5292

Σ 96



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE.....	3
2	CLINICAL BACKGROUND	3
3	PRINCIPLES OF THE METHOD	3
4	REAGENTS PROVIDED.....	4
5	SUPPLIES NOT PROVIDED	4
6	REAGENT PREPARATION	4
7	STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS	5
8	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
9	PROCEDURE	5
10	CALCULATION OF RESULTS.....	6
11	TYPICAL DATA.....	6
12	PERFORMANCE AND LIMITATIONS	6
13	INTERNAL QUALITY CONTROL.....	7
14	EXPECTED VALUES.....	8
15	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
1	VERWENDUNGSZWECK.....	9
2	KLINISCHER HINTERGRUND	9
3	GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG	9
4	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	10
5	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	10
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	10
7	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	11
8	PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG	11
9	DURCHFÜHRUNG	11
10	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	12
11	TYPISCHE WERTE	12
12	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK	12
13	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	13
14	ZU ERWARTENDER BEREICH.....	14
15	VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN.....	14
1	USO DEL KIT.....	15
2	INFORMAZIONI CLINICHE	15
3	PRINCIPIO DEL METODO	15
4	REATTIVI FORNITI.....	16
5	REATTIVI NON FORNITI.....	16
6	PREPARAZIONE DEI REATTIVI	16
7	CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI	17
8	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	17
9	METODO DEL DOSAGGIO	17
10	CALCOLO DEI RISULTATI	18
11	CARATTERISTICHE TIPICHE.....	18
12	CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO.....	18
13	CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO	19
14	VALORI ATTESI.....	20
15	PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI	20

1	INSTRUCCIONES DE USO.....	21
2	INFORMACIÓN CLÍNICA.....	21
3	PRINCIPIOS DEL MÉTODO.....	21
4	REACTIVOS SUMINISTRADOS.....	22
5	MATERIAL NO SUMINISTRADO.....	22
6	PREPARACIÓN DE REACTIVOS.....	22
7	ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS.....	23
8	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	23
9	PROTOCOLO.....	23
10	CALCULO DE RESULTADOS.....	24
11	EJEMPLO DE RESULTADOS.....	24
12	REALIZACIÓN Y LIMITACIONES.....	24
13	CONTROL DE CALIDAD INTERNO.....	25
14	VALORES ESPERADOS.....	26
15	PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS.....	26
16	LITERATURE.....	27
	SYMBOLS USED.....	28

1 INTENDED USE

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

2 CLINICAL BACKGROUND

Vitamin D is the generic term used to designate Vitamin D3 or cholecalciferol and Vitamin D2 or ergocalciferol. 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 (25-OH-D3) which is the main form of Vitamin D circulating in the body.

25-OH-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 α -hydroxylation of 25-OH-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

At first calibrators, controls and samples (serum) are incubated with the incubation buffer, directly in coated tubes for 2 hours at room temperature, on a shaker, to release 25OH Vitamin D3 and 25OH Vitamin D2 from Vitamin D Binding Protein (DBP).

Then, without washing steps, a fixed amount of ¹²⁵I labelled 25OH Vitamin D is added in each tube to compete with the 25OH Vitamin D3 and 25OH Vitamin D2 from samples, controls or calibrators, for a fixed amount of a specific monoclonal antibody sites immobilized to the lower and inner surface of plastic tubes.

After 1 hour incubation at room temperature on a tube shaker, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed twice and aspirated again. A calibration curve is plotted and the total 25OH Vitamin D (D3 and D2) concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

4 REAGENTS PROVIDED

Symbol	Reagents	96 Test Kit	Reconstitution
TUBES	Tubes coated with Mab anti 25OH Vit D3 and D2	2 x 48	Ready for use
Ag ¹²⁵I	¹²⁵ Iodine labelled 25OH Vit D (HPLC grade).	1 vial 160 kBq lyophilised	Add 6 mL of Tracer Buffer
CAL 0	Calibrator 0: in horse serum and phosphate buffer with gentamycin.	1 vial lyophilised	Add 0.5 mL distilled water
CAL N	Calibrators 1-5 in horse serum (see exact values on vial labels)	5 vials lyophilised	Add 0.5 mL distilled water
DIL SPE	Specimen diluent in horse serum	1 vial lyophilised	Add 1 mL distilled water
WASH SOLN CONC	Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 mL	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N	Controls - N = 2 in human plasma with Proclin	2 vials lyophilised	Add 0.5 mL distilled water
TRACER BUF	Tracer Buffer with casein, gentamycin and red dye	1 vial 7 mL	Ready for use
INC BUF	Incubation Buffer with casein and Proclin.	1 vial 55 mL	Ready for use

Note : Use Specimen diluent for dilution of samples with values above the highest calibrator before pre-treatment step. 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: 25 µL, 50 µL, 500 µL and 1 mL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Tube shaker (300 to 700 rpm)
6. 5 mL automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system
8. Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

6 REAGENT PREPARATION**A. Calibrators:**

Reconstitute the calibrators with 0.5 mL distilled water.

B. Controls:

Reconstitute the controls with 0.5 mL distilled water.

C. Tracer:

Reconstitute the lyophilised tracer precisely with 6 mL of the Tracer Buffer.

D. Specimen diluent:

Reconstitute the lyophilised diluent with 1 mL distilled water.

E. Working Wash solution:

Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash solution (70x). 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 °C - 8 °C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 °C - 8 °C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20 °C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable, if kept in the original well-closed vial at 4 °C for maximum one week or at -20 °C (with one thawing) until the tracer expiry date.
- 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 °C - 8 °C.

If the test is not run within 24 hours, samples storage at -20 °C is recommended.

Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

9 PROCEDURE

9.1 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.
- Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

9.2 Procedure

The Incubation Buffer must be brought to room temperature before beginning incubation.

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample.
For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Dispense 25 µL of calibrator or control or sample.
3. Dispense 500 µL of Incubation Buffer into each tube, except those for total counts.
4. Incubate for 2 hours at room temperature (24 °C ± 4 °C) on a tube shaker (300 to 700 rpm).

Be careful : don't aspirate and don't wash tubes before dispensing the tracer.

5. Dispense 50 µL of ¹²⁵Iodine labelled 25OH Vitamin D into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
6. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
7. Incubate for 1 hour at room temperature (24 °C ± 4 °C) on a tube shaker (300 to 700 rpm).
8. Aspirate the content of each tube (except total counts). Be sure that the tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
9. Wash tubes with 2 mL Working Wash solution (except total counts) and aspirate. Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
10. Wash tubes again with 2 mL Wash solution (except total counts) and aspirate.
11. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
12. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

10 CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of 25OH vitamin D concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B₀ (%)) values, determine the total 25OH vitamin D concentrations of the samples from the calibration curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 25 OH vitamin D (B₀/T) must be checked.

11 TYPICAL DATA

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

25OH Vitamin D total		cpm	B/Bo (%)
Total count		52033	
Calibrator	0.0 ng/mL	17721	100.0
	10 ng/mL	11022	62.2
	20 ng/mL	6826	38.5
	40 ng/mL	3446	19.4
	60 ng/mL	1469	8.3
	100 ng/mL	592	3.3

Note : 1 ng/mL = 2.5 pmol/mL

12 PERFORMANCE AND LIMITATIONS

12.1 Detection Limit

The LoB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank several times and was calculated as the mean - 1.65 standard deviations of the distribution of these values. The LoB was calculated to be 1.2 pg/mL.

The LoD (limit of detection) was calculated as the LoB - 1.65 standard deviations of a low concentration sample tested in 10 different run. The LoD was calculated to be 5.67 pg/mL.

The LoQ (Limit of Quantitation) was calculated by testing 5 samples of low values 10 times. The LoQ was calculated to be 7 pg/mL.

12.2 Specificity

The percentage of cross reaction was determined by testing sera with spiked and unspiked cross reactants. The results are summarized in the following table:

Compound	Cross-Reactivity (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	86
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	2.6
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	2.1
Vitamin D3	0.8
Vitamin D2	0.1
3-epi-25 hydroxy Vitamin D3	0.4
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	≥100
25,26(OH) ₂ -Vitamin D3	≥100

The assay performance is not affected by hemolysis (5 g/L hemoglobin tested) and by bilirubinemia (0.5 g/L bilirubin tested). Bilirubin conjugate (1 g/L tested), triglycerides (2 g/L tested) and ascorbic acid (Vitamin C) (1 g/L) don't interfere with this assay.

12.3 Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	<X> ± SD (ng/mL)	C.V. (%)	Sample	N	<X> ± SD (ng/mL)	C.V. (%)
A	18	13.2 ± 0.8	5.9	A	13	15.1 ± 1.1	7.3
B	18	28.5 ± 0.9	3.3	B	13	30.3 ± 1.5	4.9

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

12.4 Accuracy

RECOVERY TEST

Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/mL)	Recovery (%)
14.8	110
45.2	105
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/mL)	Recovery (%)
11.6	102
18.6	113

DILUTION TEST

Sample dilution	Theoretical concent. (ng/mL)	Measured concent. (ng/mL)
1/1	45.1	45.1
1/2	22.5	24.9
1/4	11.3	13.9
1/1	34.5	34.5
1/2	17.2	17.9
1/4	8.6	9.8

12.5 Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 20 and 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY

	0 minute (ng/mL)	20 minutes (ng/mL)	30 minutes (ng/mL)
Sample 1	8.9	7.9	8.9
Sample 2	23.4	21.8	20.5
Sample 3	36.5	35.7	37.5

13 INTERNAL QUALITY CONTROL

If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.

If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.

Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

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 25OH Vitamin D status:

Deficiency:	< 10 ng/mL;
Insufficiency:	10 - 29 ng/mL;
Sufficiency:	30 - 100 ng/mL;
Potential toxicity:	> 100 ng/mL.

15 PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

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

1 VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative in vitro Bestimmung von 25-Hydroxy Vitamin D₃ und D₂ (25-OH-D₃ und 25-OH-D₂) in Serum.

2 KLINISCHER HINTERGRUND

Vitamin D ist der allgemeine Ausdruck zur Bezeichnung von Vitamin D₃, oder Cholecalciferol und Vitamin D₂, oder Ergocalciferol.

Menschen produzieren Vitamin D₃ auf natürliche Weise, wenn die Haut ultravioletten Sonnenstrahlen ausgesetzt wird. Hauptsächlich wird Vitamin D₃ in der Leber in 25-Hydroxyvitamin D₃ (25-OH-D₃) metabolisiert, welches die Hauptform von im Körper zirkulierendem Vitamin D darstellt.

25-OH-D₃ ist ein Vorläufer für andere Vitamin D Metaboliten und ist in begrenztem Umfang selbst aktiv.

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

Vitamin D₃ und Vitamin D₂ werden ebenfalls über die Nahrung oder diätische Ergänzungsmittel verfügbar gemacht.

Da Vitamin D₂ auf ähnliche Weise metabolisiert wird wie Vitamin D₃, tragen auch beide zum Vitamin D Gesamtstatus einer Person bei. Das ist der Grund, warum eine Bestimmung der beiden Formen von 25OH 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 GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Zuerst werden die Kalibratoren, Kontrollen und (Serum) Proben direkt in beschichteten Röhrchen mit Inkubationspuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert, um 25OH Vitamin D₃ und 25OH Vitamin D₂ aus dem Bindungsprotein (DBP) freizusetzen.

Dann wird, ohne Waschschritte, eine festgelegte Menge von ¹²⁵I markiertem 25OH Vitamin D zu jedem Röhrchen gegeben, um mit dem 25OH Vitamin D₃ und 25OH Vitamin D₂ der Proben, Kontrollen oder Kalibratoren um eine festgelegte Menge eines spezifischen monoklonalen Antikörpers zu konkurrieren, der an die innere Wand der Plastikröhrchen gebunden ist.

Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Röhrchen-Schüttler beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschließend zweimal gewaschen und erneut abgesaugt. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die Gesamtkonzentrationen von 25OH Vitamin D (D₃ und D₂) der Proben durch Dosis Interpolation aus der Kalibrationskurve abgelesen.

4 MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Symbol	Reagenzien	96 Tests pro Kit	Vorbereitung
TUBES	Röhrchen beschichtet mit Mab anti 25OH Vit D3 und D2	2 x 48	Gebrauchsfertig
Ag ¹²⁵I	¹²⁵ Iod markiertes 25OH Vitamin D (HPLC Grad)	1 Fläschchen 160 kBq lyophilisiert	6 mL des Tracerpuffers hinzufügen
CAL 0	Kalibrator 0: Pferdeserum und Phosphatpuffer mit Gentamycin	1 Fläschchen lyophilisiert	0,5 mL destilliertes Wasser hinzufügen
CAL N	Kalibratoren 1-5 in Pferdeserum (exakte Werte befinden sich auf den Röhrchenetiketten)	5 Fläschchen lyophilisiert	0,5 mL destilliertes Wasser hinzufügen
DIL SPE	Probenverdünnungslösung in Pferdeserum	1 Fläschchen lyophilisiert	1 mL destilliertes Wasser hinzufügen
WASH SOLN CONC	Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Fläschchen 10 mL	70 x verdünnen mit destilliertes Wasser (Magnetrührer benutzen)
CONTROL N	Kontrollen – N = 2 in Humanplasma mit Proclin	2 Fläschchen lyophilisiert	0,5 mL destilliertes Wasser hinzufügen
TRACER BUF	Tracerpuffer mit Kasein, Gentamycin und rotem Farbstoff	1 Fläschchen 7 mL	Gebrauchsfertig
INC BUF	Inkubationspuffer mit Kasein und Proclin	1 Fläschchen 55 mL	Gebrauchsfertig

Bemerkung: Benutzen Sie Probenverdünnung vor dem Vorbehandlungsschritt zur Verdünnung der Proben, die Werte oberhalb des höchsten Kalibrators aufweisen.
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: 25 µL, 50 µL, 500 µL und 1 mL (die Benutzung von genauen Pipetten mit Einmalspitzen ist vorgeschrieben)
3. Vortex-Mixer
4. Magnetrührer
5. Röhrchen-Schüttler (300 bis 700 upm)
6. 5 mL automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem
8. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN**A. Kalibratoren:**

Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 mL dest. Wasser.

B. Kontrollen:

Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 mL dest. Wasser.

C. Tracer:

Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Tracer mit exakt 6 mL Tracerpuffer.

D. Probenverdünner:

Rekonstituieren Sie die lyophilisierte Verdünnungslösung mit 1 mL destilliertes Wasser.

E. Waschlösung:

Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 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 °C bis 8 °C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 °C bis 8 °C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20 °C eingefroren werden, für maximal 3 Monate. Vermeiden Sie wiederholte Einfrier-Auftau-Zyklen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Nach dem Erstgebrauch ist der Tracer bis zum Verfallsdatum stabil, wenn er in der gut verschlossenen Originalflasche bei 4 °C maximal eine Woche oder bei -20 °C (mit einmal Auftauen) aufbewahrt wird.
- 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 °C - 8 °C aufbewahrt werden.

Falls der Test nicht innerhalb von 24 Stunden durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20 °C aufgehoben werden.

Vermeiden Sie wiederholte Einfrier- Auftau-Zyklen.

9 DURCHFÜHRUNG

9.1 Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen.
- Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

9.2 Durchführung

Der Inkubationspuffer muss vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden.

1. Beschriften Sie beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und Probe. Zur Bestimmung der Gesamtzählung beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Dispensieren Sie 25 µL Kalibrator, Kontrolle oder Probe.
3. Dispensieren Sie 500 µL Inkubationspuffer in jedes Röhrchen, außer in die für die Gesamtzählung vorgesehenen.
4. Inkubieren Sie für 2 Stunden bei Raumtemperatur (24 °C ± 4 °C) auf einem Röhrchen-Schüttler (300 bis 700 Upm)
ACHTUNG: Waschen oder saugen Sie die Röhrchen nicht ab, ehe Sie den Tracer dispensieren.
5. Dispensieren Sie 50 µL mit ¹²⁵Iod markiertes 25OH Vitamin D in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtzählung.
6. Schütteln Sie den Röhrchenständer vorsichtig von Hand, um eingeschlossene Luftblasen freizusetzen.
7. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (24 °C ± 4 °C) auf einem Röhrchen-Schüttler (300 bis 700 Upm)
8. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (Ausnahme: Röhrchen für die Gesamtzählung). Stellen Sie sicher, dass die Spitze des Absaugers den Boden der beschichteten Röhrchen erreicht, um alle Flüssigkeit zu entfernen.
9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 mL Waschlösung (Ausnahme: Gesamtzählung) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei der Zugabe der Waschlösung.
10. Waschen Sie die Röhrchen erneut mit 2 mL Gebrauchswaschlösung (Ausnahme: Gesamtzählung) und saugen Sie ab.
11. Lassen Sie die Röhrchen für 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Tropfen Flüssigkeit ab.
12. Zählen Sie die Röhrchen in einem Gamma Counter für 60 Sekunden.

10 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
2. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Gesamtzählung (Kalibrator oder Proben)}}{\text{Gesamtzählung (Null Kalibrator)}} \times 100$$

3. Verwenden Sie semi-logarithmisches (über 3 Größenordnungen) oder Logit-Log Millimeterpapier drucken Sie die (B/B₀(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 25-OH Vitamin D Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
4. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4-Parameter“-Kurvenfunktion.
5. Bestimmen Sie die gesamt 25-OH Vitamin D Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B₀(%) der Kalibrationskurve.
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 25-OH Vitamin D (B₀/T) geprüft werden.

11 TYPISCHE WERTE

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

25OH Vitamin D total		Cpm	B/Bo(%)
Gesamtaktivität		52033	
Kalibrator	0,0 ng/mL	17721	100,0
	10 ng/mL	11022	62,2
	20 ng/mL	6826	38,5
	40 ng/mL	3446	19,4
	60 ng/mL	1469	8,3
	100 ng/mL	592	3,3

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

12 LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK**12.1 Nachweisgrenze**

Die LoB (Leerwert-Grenze) wurde durch mehrmaliges Messen des Leerwerts berechnet:

LoB = Mittelwert_{Leerwert} - 1,645(SD_{Leerwert}). Die LoB beträgt 1,2 pg/mL.

Die LoD (Nachweisgrenze) wurde folgendermaßen berechnet: LoD = LoB - 1,645(SD Probe mit niedriger Konzentration) die in 10 verschiedenen Assays getestet wurde. Die LoD beträgt 5,67 pg/mL.

Die Bestimmungsgrenze (LoQ) wurde durch zehnmaliges Testen von 5 Proben mit niedrigen Werten berechnet. Die Bestimmungsgrenze beträgt 7 pg/mL.

12.2 Spezifität

Der Prozentanteil der Kreuzreaktion wurde durch Testen von Seren mit zugefügten und ohne zugefügte Kreuzreaktanten bestimmt.

Substanz	Kreuz-Reaktivität (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	86
1,25(OH) ₂ -Vitamin, D ₃	2,6
1,25(OH) ₂ -Vitamin, D ₂	2,1
Vitamin D ₃	0,8
Vitamin D ₂	0,1
3-epi-25 hydroxy Vitamin D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -Vitamin, D ₃	≥ 100
25,26(OH) ₂ -Vitamin D ₃	≥ 100

Die Leistung des Testsystems wird nicht durch Hämolyse (getestet wurden 5 g/L Hämoglobin) oder Bilirubinämie (getestet wurden 0,5 g/L Bilirubin) beeinträchtigt. Bilirubinkonjugat (1 g/L), Triglyceride (2 g/L) und Ascorbinsäure (Vitamin C) (1 g/L) interferieren nicht mit diesem Testsystem.

12.3 Präzision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Probe	N	<X> ± SD (ng/mL)	C.V. (%)	Probe	N	<X> ± SD (ng/mL)	C.V. (%)
A	18	13,2 ± 0,8	5,9	A	13	15,1 ± 1,1	7,4
B	18	28,5 ± 0,9	3,3	B	13	30,3 ± 1,5	4,9

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

12.4 Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST	
Zugeg. 25-OH-Vit.D ₃ (ng/mL)	Wiedergefunden (%)
14,8	110
45,2	105
Zugeg. 25-OH-Vit.D ₂ (ng/mL)	Wiedergefunden (%)
11,6	102
18,6	113

VERDÜNNUNGSTEST		
Probeverdünnung	Theoretische Konzent. (ng/mL)	Gemessene Konzent. (ng/mL)
1/1	45,1	45,1
1/2	22,5	24,9
1/4	11,3	13,9
1/1	34,5	34,5
1/2	17,2	17,9
1/4	8,6	9,8

12.5 Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 20 oder 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND			
	0 Minuten (ng/mL)	20 Minuten (ng/mL)	30 Minuten (ng/mL)
Probe 1	8,9	7,9	8,9
Probe 2	23,4	21,8	20,5
Probe 3	36,5	35,7	37,5

13 INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Liegen die erhaltenen Ergebnisse der Kontrolle 1 und/oder der Kontrolle 2 nicht innerhalb des, auf dem Fläschchen Etikett, festgelegten Bereichs, kann das Ergebnis so lange nicht verwendet werden, bis eine zufriedenstellende Erklärung für die Diskrepanz gefunden wurde.

Wenn gewünscht, kann jedes Labor eigene Pools von Kontrollproben erstellen, die aliquotiert eingefroren werden. Diese Proben sollten nicht häufiger als zweimal eingefroren und aufgetaut werden.

Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Doppelergebnissen der Proben sollten auf den Regeln für gute Laborpraxis beruhen

14 ZU ERWARTENDER BEREICH

Nahrungsaufnahme, Rasse, Jahreszeit und Alter haben einen Einfluss auf die Normalwerte des 25OH-Vitamin D₃. Jedes Labor sollte seinen eigenen Bereich, basierend auf der lokalen Bevölkerung, etablieren.

Die gegenwärtige Literatur schlägt die folgenden Bereiche zur Klassifizierung des 25OH-Vitamin D Status vor:

Mangel:	< 10 ng/mL;
Ungenügend:	10 - 29 ng/mL;
Normal:	30 - 100 ng/mL;
Potentielle Giftigkeit:	> 100 ng/mL.

15 VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

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, Serum oder Plasmaproben 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 Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflussrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluss gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

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

1 USO DEL KIT

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

2 INFORMAZIONI CLINICHE

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

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 (25-OH-D₃), la principale forma di Vitamina D circolante nell'organismo.

La 25-OH-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 25-OH-D₃ in posizione 1 α .

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

La 25-OH-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 25-OH-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 di una gravidanza. La misurazione di entrambe le forme di 25-OH-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

Inizialmente i calibratori, i controlli e i campioni (siero) vengono incubati con il Tampone di incubazione, direttamente nelle provette rivestite, per 2 ore a temperatura ambiente, su un agitatore, per rilasciare la 25-OH-Vitamina D₃ e la 25-OH-Vitamina D₂ dalla proteina legante la Vitamina D (DBP).

Quindi, senza nessuna fase di lavaggio, a ogni provetta si aggiunge una quantità fissa di 25-OH-Vitamina D marcata con ¹²⁵I che compete con la 25-OH-Vitamina D₃ e la 25-OH-Vitamina D₂ all'interno di campioni, controlli o calibratori, per il legame a una quantità fissa di siti specifici sull'anticorpo monoclonale immobilizzato sulla superficie inferiore e interna delle provette di plastica.

Dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente in un agitatore per provette, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione. Le provette vengono quindi lavate due volte e nuovamente sottoposte ad aspirazione. Si costruisce poi una curva di calibrazione e si calcolano le concentrazioni totali delle 25-OH-Vitamine D (D₃ e D₂) mediante interpolazione della dose sulla curva di calibrazione.

4 REATTIVI FORNITI

Symbol	Reagenti	Kit da 96 test	Ricostituzione
TUBES	Provette rivestite con mAb anti-25-OH-Vit D3 and D2	2 x 48	Pronte per l'uso
Ag ¹²⁵I	25-OH-Vit D marcata con ¹²⁵ Iodio (per HPLC)	1 flaconcino 160 kBq liofilizzata	Aggiungere 6 mL del Tampone del Tracciante
CAL 0	Calibratore 0: in siero di cavallo e tampone fosfato con gentamicina.	1 flaconcino liofilizzato	Aggiungere 0,5 mL di acqua distillata
CAL N	Calibratori 1-5 in siero di cavallo (vedi valori esatti sull'etichetta dei flaconcini)	5 flaconcini liofilizzati	Aggiungere 0,5 mL di acqua distillata
DIL SPE	Diluente dei campioni in siero di cavallo	1 flaconcino liofilizzato	Aggiungere 1 mL di acqua distillata
WASH SOLN CONC	Soluzione di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flaconcino 10 mL	Diluire 70 x con acqua distillata (usare un agitatore magnetico)
CONTROL N	Controlli - N = 2 in plasma umano con Proclin	2 flaconcini liofilizzati	Aggiungere 0,5 mL di acqua distillata
TRACER BUF	Tampone del Tracciante con caseina e gentamicina gentamicina e colorante rosso	1 flaconcino 7 mL	Pronto per l'uso
INC BUF	Tampone di incubazione con caseina e proclina	1 flaconcino 55 mL	Pronto per l'uso

Nota: Usare il Diluente dei campioni per diluire i campioni con valori superiori a quelli del calibratore più alto prima della fase di pre-trattamento.

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 25 µL, 50 µL, 500 µL 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 provette (da 300 a 700 rpm)
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 mL per i lavaggi
7. Dispositivo di aspirazione e lavaggio.
8. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%).

6 PREPARAZIONE DEI REATTIVI**A. Calibratore:**

ricostituire i calibratori con 0,5 mL di acqua distillata.

B. Controlli:

ricostituire i controlli con 0,5 mL di acqua distillata.

C. Tracciante:

ricostituire il tracciante liofilizzato con esattamente 6 mL del Tampone del Tracciante.

D. Diluente del campione:

ricostituire il diluente liofilizzato con 1 mL di acqua distillata.

E. Soluzione di lavaggio diluita:

preparare la quantità necessaria di soluzione di lavaggio diluita aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di soluzione di lavaggio concentrata (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavaggio diluita va scartata al termine della giornata.

7 CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2 °C - 8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 1 settimana a 2 °C - 8 °C e, suddivisi in aliquote a -20 °C, per periodi più lunghi, fino a un massimo di 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- La soluzione di lavaggio diluita deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo il primo utilizzo, il tracciante è stabile se mantenuto nel suo flaconcino originale ben chiuso a 4 °C per un periodo massimo di una settimana o a -20 °C (sottoponendolo a un solo scongelamento) fino alla data di scadenza.
- 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 °C - 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

9.1 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. Per evitare contaminazioni incrociate, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione.
- L'uso di pipette ben tarate e riproducibili o di sistemi di pipettatura automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.
- Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

9.2 Procedura

Prima di iniziare l'incubazione, il Tampone di incubazione va portato a temperatura ambiente.

1. Etichettare le provette rivestite, calcolandone un numero in duplicato per ciascun calibratore, controllo e campione. Per la determinazione delle conte totali, etichettare 2 provette normali.
2. Erogare 25 µL di calibratore o controllo o campione.
3. Erogare 500 µL di Tampone di incubazione in ogni provetta, eccetto quelle destinate alle conte totali.
4. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente (24 °C ± 4 °C) su un agitatore per provette (300 - 700 rpm).
Attenzione : non aspirare e non lavare le provette prima di introdurvi il tracciante.
5. Erogare 50 µL di 25-OH-Vitamina D marcata con ¹²⁵Iodio in ogni provetta, incluse quelle non rivestite per le conte totali.
6. Agitare delicatamente a mano il supporto delle provette per liberare eventuali bolle d'aria.
7. Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (24 °C ± 4 °C) su un agitatore per provette (300 - 700 rpm).
8. Aspirare il contenuto di ogni provetta (eccetto quelle destinate alle conte totali). Controllare che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo della provetta rivestita per rimuovere tutto il liquido.
9. Lavare le provette (eccetto quelle destinate alle conte totali) con 2 mL di Soluzione di lavaggio diluita e aspirare. Evitare la formazione di schiuma durante l'aggiunta della Soluzione di lavaggio diluita.
10. Lavare ancora le provette (eccetto quelle destinate alle conte totali) con 2 mL di Soluzione di lavaggio diluita e aspirare.
11. Lasciar riposare le provette in posizione verticale per 2 minuti, quindi aspirare le gocce di liquido rimanenti.
12. Introdurre le provette nel contatore gamma per 60 secondi per il calcolo delle conte.

10 CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette di calibratore 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette dello calibratore zero (B0).

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore o campioni)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di 25-OH-Vitamina D, tracciare la curva di taratura, scartando i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 25-OH-Vitamina D totale.
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T della 25-OH-Vitamina D.

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.

25-OH-Vitamina D totale		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		52033	
Calibratore	0,0 ng/mL	17721	100,0
	10 ng/mL	11022	62,2
	20 ng/mL	6826	38,5
	40 ng/mL	3446	19,4
	60 ng/mL	1469	8,3
	100 ng/mL	592	3,3

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

12 CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

12.1 Sensibilità

Il "Limit of Blank" LoB (limite bianco) è stato calcolato misurando il bianco più volte e corrisponde alla Media_{blank} - 1,645(SD_{blank}) Il LoB è calcolato a 1,2 pg/mL.

Il "Limit of Detection" LoD (limite di rilevamento) è stato calcolato come LoB - 1,645(SD_{di un campione a bassa concentrazione}) testato in 10 diversi dosaggi. LoD è calcolato a 5,67 pg/mL.

Il "Limit of Quantification" LoQ (limite di quantificazione) è stato calcolato testando 5 campioni di valori bassi 10 volte. Il limite di quantificazione è stato calcolato a 7 pg/mL.

12.2 Specificità

La percentuale di reattività incrociata è stata determinata analizzando i sieri con l'aggiunta o meno di reagenti a reattività incrociata. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Composto	Reattività incrociata(%)
25-OH-Vitamina D ₃	100
25-OH-Vitamina D ₂	86
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₃	2,6
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₂	2,1
Vitamina D ₃	0,8
Vitamina D ₂	0,1
3-epi-25-idrossi-Vitamina D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -Vitamina D ₃	≥ 100
25,26(OH) ₂ -Vitamina D ₃	≥ 100

Le prestazioni del saggio non sono influenzate dall'emolisi (5 g/L di emoglobina analizzati) e dalla bilirubinemia (0,5 g/L di bilirubina analizzati). Bilirubina coniugata (1 g/L analizzato), trigliceridi (2 g/L analizzati) e acido ascorbico (Vitamina C) (1 g/L) non interferiscono con questo saggio.

12.3 Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Campione	N	<X> ± DS (ng/mL)	C.V. (%)	Campione	N	<X> ± DS (ng/mL)	C.V. (%)
A	18	13,2 ± 0,8	5,9	A	13	15,1 ± 1,1	7,4
B	18	28,5 ± 0,9	3,3	B	13	30,3 ± 1,5	4,9

DS: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

12.4 Accuratezza

TEST DI RECUPERO	
25OH-Vit.D3 aggiunta (ng/mL)	Recupero (%)
14,8	110
45,2	105
25OH-Vit.D2 aggiunta (ng/mL)	Recupero (%)
11,6	102
18,6	113

TEST DI DILUZIONE		
Diluizione	Concentrazione teorica (ng/mL)	Concentrazione misurata (ng/mL)
1/1	45,1	45,1
1/2	22,5	24,9
1/4	11,3	13,9
1/1	34,5	34,5
1/2	17,2	17,9
1/4	8,6	9,8

12.5 Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 20 e 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO			
	0 minuti (ng/mL)	20 minuti (ng/mL)	30 minuti (ng/mL)
Campione 1	8,9	7,9	8,9
Campione 2	23,4	21,8	20,5
Campione 3	36,5	35,7	37,5

13 CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Se i risultati ottenuti per il Controllo 1 e/o il Controllo 2 non rientrano nell'intervallo specificato sull'etichetta del flaconcino, i risultati non possono essere utilizzati salvo nel caso in cui sia possibile trovare una spiegazione soddisfacente per tale discrepanza.

Se opportuno, ogni laboratorio può creare pool propri dei campioni di controllo, che devono essere aliquotati e mantenuti in congelatore. Non congelare/scongela per più di due volte.

I criteri di accettazione della differenza tra i risultati in duplicato dei campioni si devono basare sui principi di Buona Pratica di Laboratorio.

14 VALORI ATTESI

È noto che l'apporto dietetico, l'etnia, la stagione e l'età influiscono sui normali livelli di 25-OH-Vitamina D₃. Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento in base alla propria popolazione locale.

Di recente in letteratura sono stati suggeriti i seguenti intervalli per la classificazione dello stato della 25-OH-Vitamina D:

Carenza:	< 10 ng/mL;
Insufficienza:	10 - 29 ng/mL;
Sufficienza:	da 30 - 100 ng/mL;
Potenziale tossicità:	> 100 ng/mL.

15 PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

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 o plasma 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 ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti azoturo di sodio come conservante. L'azoturo di sodio può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare azoturi di metallo esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

1 INSTRUCCIONES DE USO

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

2 INFORMACIÓN CLÍNICA

Vitamina D es el término genérico usado para designar a la vitamina D₃ o colecalciferol y la Vitamina D₂ o ergocalciferol. Los humanos producen vitamina D₃ en forma natural cuando la piel está expuesta a los rayos ultravioleta del sol.

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

25-OH-D₃ es la precursora para otros metabolitos de la vitamina D y tiene una actividad limitada por si sola. El derivado más activo es la 1,25-Hidroxivitamina D₃, producida en el riñón (o placenta) por la 1 α -hidroxilación de 25-OH-D₃.

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

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

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

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

Por esta razón es muy importante medir ambos tipos de 25 OH 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 25 OH Vitaminas D también es necesario 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

Al inicio, los calibradores, controles y muestras (suero) se incuban con el tampón de incubación, directamente en tubos recubiertos durante 2 horas a temperatura ambiente, en un agitador, para liberar 25OH Vitamina D₃ y 25OH Vitamina D₂ de la proteína fijadora de la Vitamina D (DBP).

A continuación y antes de lavar, se añade una cantidad fija de 25OH Vitamina D marcada con ¹²⁵I en cada tubo para competir con la 25OH Vitamina D₃ y la 25OH Vitamina D₂ de las muestras controles o calibradores, por una cantidad fija de sitios de un anticuerpo monoclonal inmovilizado en la zona interna inferior de los tubos de plástico.

Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente en un agitador de tubos, una etapa de aspiración termina la reacción de competencia. Luego los tubos se lavan dos veces y se aspiran nuevamente. Se dibuja una curva de calibración y el total de las concentraciones de las 25 OH Vitaminas D (D₃ y D₂) de las muestras se determinan por interpolación de dosis usando la curva de calibración.

4 REACTIVOS SUMINISTRADOS

Symbol	Reactivos	Kit de 96 pruebas	Reconstitución
TUBES	Tubos recubiertos con el anticuerpo monoclonal anti 25OH Vit D ₃ y D ₂	2 x 48	Listo para uso
Ag ¹²⁵I	25OH Vit D marcada con ¹²⁵ Yodo (grado HPLC).	1 vial 160 kBq lío filizado	Añadir 6 mL del tampón trazador
CAL 0	Calibrador 0: en suero equino y tampón de fosfato con gentamicina	1 vial lío filizado	Añadir 0,5 mL de agua destilada
CAL N	Calibradores 1-5 en suero equino (ver el valor exacto en la etiqueta del vial)	5 viales lío filizado	Añadir 0,5 mL de agua destilada
DIL SPE	Diluyente de la muestra diluido en suero de caballo	1 vial lío filizado	Añadir 1 mL de agua destilada
WASH SOLN CONC	Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 mL	Diluir x70 con agua destilada (utilizar un agitador magnético)
CONTROL N	Controles - N = 2 en plasma humano con proclina	2 viales lío filizado	Añadir 0,5 mL de agua destilada
TRACER BUF	Tampón trazador con caseína y gentamicina y tinción roja	1 vial 7 mL	Listo para uso
INC BUF	Tampón de incubación con caseína y proclina	1 vial 55 mL	Listo para uso

Nota : Utilizar el diluyente de la muestra para diluir muestras con valores superiores al valor del calibrador más alto antes del paso de pre tratamiento.

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 25 µL, 50 µL, 500 µL y 1 mL (se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas plásticas)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos (300 a 700 rpm)
6. Jeringa automática 5 mL (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

6 PREPARACIÓN DE REACTIVOS**A. Calibradores:**

reconstituir los calibradores con 0,5 mL de agua destilada.

B. Controles:

Reconstituir los controles con 0,5 mL de agua destilada.

C. Trazador:

Reconstituir el trazador liofilizado con exactamente 6 mL de tampón trazador.

D. Diluyente de la muestra:

Reconstituir el diluyente liofilizado con 1 mL de agua destilada.

E. Solución de lavado de trabajo:

Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). 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 °C - 8 °C.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2 °C - 8 °C. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a -20 °C por 3 meses máximo. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se mantiene en el vial original, debidamente cerrado a 4 °C máximo durante una semana o a -20 °C (con una descongelación).
- 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 °C - 8 °C.

Si el ensayo no se realiza en 24 horas, almacenar las muestras a -20 °C.

Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

9 PROTOCOLO

9.1 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.
- Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar contaminación cruzada utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
- El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
- Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

9.2 Procedimiento

El tampón de incubación debe alcanzar temperatura ambiente antes de iniciar la incubación.

1. Etiquetar los tubos recubiertos en duplicado para cada calibrador, control y muestra. Para la determinación del conteo total, etiquetar 2 tubos normales.
2. Dispensar 25 µL de calibrador o control o muestra.
3. Dispensar 500 µL de tampón de incubación en cada tubo, excepto en los destinados a conteo total.
4. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente (24 °C ± 4 °C) en un agitador de tubos (300 a 700 rpm).

Precaución : no aspirar y no lavar los tubos antes de dispensar el trazador.

5. Dispensar 50 µL de 25OH Vitamina D marcada con ¹²⁵Yodo en cada tubo incluyendo los tubos no recubiertos para conteo total.
6. Agitar la gradilla con tubos suavemente con la mano para liberar cualquier burbuja de aire atrapada.
7. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (24 °C ± 4 °C) en un agitador de tubos (300 a 700 rpm).
8. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de conteo total). Asegurar que la punta del aspirador alcance el fondo del tubo recubierto para sacar todo el líquido.
9. Lavar los tubos con 2 mL de solución de trabajo de lavado (excepto los de conteo total) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la solución de trabajo de lavado.
10. Lavar los tubos nuevamente con 2 mL de solución de lavado (excepto los conteos totales) y aspirar.
11. Dejar los tubos en la posición vertical durante dos minutos y aspirar la gota de líquido remanente.
12. Leer los tubos en un contador gamma durante 60 segundos.

10 CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión determinada al punto cero (0) del calibrador de acuerdo con la siguiente formula:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador o muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$
3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico o logit-log, representar los valores de (B/B₀%) de cada punto del calibrador frente a las concentraciones de la 25OH vitamina D de cada calibrador, rechazando los puntos externos.
4. Métodos computarizados de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".
5. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones totales de la 25OH vitamina D desde la curva de calibración.
6. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de la 25OH vitamina D no marcado (B₀/T) debe ser calculado en cada ensayo.

11 EJEMPLO DE RESULTADOS

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

25OH Vitamin D total		cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales		52033	
Calibrador	0,0 ng/mL	17721	100,0
	10 ng/mL	11022	62,2
	20 ng/mL	6826	38,5
	40 ng/mL	3446	19,4
	60 ng/mL	1469	8,3
	100 ng/mL	592	3,3

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

12 REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

12.1 Límite de detección

El LoB (límite de blanco) se calculó midiendo el blanco varias veces y corresponde a la media - 1,65 veces de desviación estándar de la distribución de estos valores. El LoB se calcula a 1,2 pg/mL.

El LoD (límite de detección) se calculó como la LoB - 1,65 veces de desviación estándar de una muestra de baja concentración analizada en 10 ensayos diferentes. LoD se calcula en 5,67 pg/mL.

El límite de cuantificación (LoQ) se calculó analizando 5 muestras de valores bajos 10 veces. El límite de cuantificación se calculó en 7 pg/mL.

12.2 Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada se determinó probando suero con y sin añadido de sustancias que producen reacción cruzada. Los resultados se han resumido en la siguiente tabla:

Compuesto	Reacción-cruzada (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	86
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	2,6
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	2,1
Vitamin D ₃	0,8
Vitamin D ₂	0,1
3-epi-25 hidroxilo Vitamina D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	≥ 100
25,26(OH) ₂ -Vitamina D ₃	≥ 100

El rendimiento del ensayo no se ve afectado por hemólisis (probado con 5 g/L hemoglobina), por bilirrubinemia (probado con 0,5 g/L de bilirrubina). La bilirrubina conjugada (probado con 1 g/L), los triglicéridos (probado con 2 g/L) y el ácido ascórbico (Vitamina C) (1 g/L) no interfieren con este ensayo.

12.3 Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO				PRECISIÓN INTER-ENSAYO			
Muestra	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)	Muestra	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
A	18	13,2 ± 0,8	5,9	A	13	15,1 ± 1,1	7,4
B	18	28,5 ± 0,9	3,3	B	13	30,3 ± 1,5	4,9

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

12.4 Exactitud

TEST DE RECUPERACIÓN	
25OH-Vit.D3 añadido (ng/mL)	Recuperado (%)
14,8	110
45,2	105
25OH-Vit.D2 añadido (ng/mL)	Recuperado (%)
11,6	102
18,6	113

TEST DILUCIÓN		
Dilución de la muestra	Concent. Teórica (ng/mL)	Concent. Medida (ng/mL)
1/1	45,1	45,1
1/2	22,5	24,9
1/4	11,3	13,9
1/1	34,5	34,5
1/2	17,2	17,9
1/4	8,6	9,8

12.5 Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 20 y 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

TIEMPO DE ESPERA			
	0 minutos (ng/mL)	20 minutos (ng/mL)	30 minutos (ng/mL)
Muestra 1	8,9	7,9	8,9
Muestra 2	23,4	21,8	20,5
Muestra 3	36,5	35,7	37,5

13 CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Si los resultados obtenidos del Control 1 y /o el Control 2 no caen dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados no se pueden utilizar a no ser que dé una explicación satisfactoria por la discrepancia.

Si así lo desean, cada laboratorio puede preparar sus propias mezclas de muestras de control, que deben guardarse congeladas en alíquotas. No congelar y descongelar más de dos veces.

El criterio de aceptación para las diferencias entre los dos resultados de las muestras deben basarse en Buenas Prácticas de Laboratorio.

14 VALORES ESPERADOS

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

Deficiencia: < 10 ng/mL;

Insuficiencia: 10 - 29 ng/mL;

Satisfactorio: 30 - 100 ng/mL;

Potencialmente tóxico: > 100 ng/mL.

15 PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos o animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en un área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros para recepción y almacenaje de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá separarse para evitar la contaminación cruzada con otros radioisótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser eliminados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

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 cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

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

16 LITERATURE

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

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Diagnostica in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité