



Instructions for Use

25-OH Vitamin D (total) ELISA

IVD



REF EIA-5396

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

Version 7.0
Effective, June 2016

**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 / Sommaire

1	INTRODUCTION.....	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	3
4	REAGENTS	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	QUALITY CONTROL	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
10	LIMITATIONS OF USE	12
11	LEGAL ASPECTS	12
12	REFERENCES / LITERATURE.....	12
1	EINLEITUNG.....	13
2	TESTPRINZIP.....	13
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	14
4	BESTANDTEILE DES KITS	15
5	PROBENVORBEREITUNG	17
6	TESTDURCHFÜHRUNG	17
7	ERWARTETE WERTE	19
8	QUALITÄTS-KONTROLLE	20
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	20
10	GRENZEN DES TESTS.....	20
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	21
12	REFERENZEN / LITERATUR	21
1	INTRODUZIONE	22
2	PRINCIPIO DEL TEST	22
3	PRECAUZIONI.....	22
4	COMPONENTI DEL KIT	23
5	CAMPIONI	25
6	ATTUAZIONE DEL TEST	25
7	VALORI NORMALI.....	27
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	28
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	28
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	28
11	ASPETTI LEGALI.....	29
12	BIBLIOGRAFIA	29
	SYMBOLS USED.....	30

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DRG 25-OH Vitamin D (total) ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of total 25-OH Vitamin D (Vitamin D₂ and Vitamin D₃) in serum and plasma.

1.2 Summary and Explanation

Vitamin D is a steroid hormone involved in the intestinal absorption of calcium and the regulation of calcium homeostasis. The two major forms of Vitamin D, named Vitamin D₃ (cholecalciferol) and Vitamin D₂ (ergocalciferol), have isomeric structures, but D₂ is supposed to be less active than D₃¹.

Physiological Vitamin D₃ levels result not only from dietary uptake but can also be produced from a cholesterol precursor, 7-dehydrocholesterol, in the skin during sun exposure. D₂ is obtained from plant sources and only represents less than 5% of the total Vitamin D in the body². In the liver, the Vitamin D is hydroxylated to 25-hydroxyvitamin D (25-OH D), the major circulating metabolite of Vitamin D. Vitamin D and 25-OH D enter the circulation bound to Vitamin D binding protein (VDBP). Upon request, a small portion of 25-OH D is further hydroxylated in the kidney to form the biologically active hormone 1,25 dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂ D)³. This process is tightly regulated by the concentration of 1,25-(OH)₂ D, parathyroid hormone, hypophosphatemia and ionized calcium levels. Concentrations of 1,25-(OH)₂ are about 1000-fold lower than that of 25-OH D⁴. Although 1,25-(OH)₂ D portrays the biological active form of Vitamin D, it is widely accepted that the measurement of circulating 25-OH D provides better information with respect to patients Vitamin D status and allows its use in diagnosis of hypovitaminosis⁵.

The concentration of 25-OH D decreases during winter time (reduced sun exposure), with dark skin colour and with age⁶. Determination of 25-OH D in serum or plasma will support the diagnosis and therapy control of postmenopausal osteoporosis, rickets in children, osteomalacia, renal osteodystrophy, neonatal hypocalcemia and hyperparathyroidism. In addition, the effects of prevailing subclinical Vitamin D deficiency in different European countries is critically discussed⁶. Vitamin D intoxication mostly occurs during a large intake of pharmaceutical preparations of Vitamin D and may lead to hypercalcemia and nephrocalcinosis in susceptible infants.

2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG 25-OH Vitamin D total ELISA Kit** is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

In the first step, samples have to be pretreated in separate vials with denaturation buffer to extract the analyte, since most circulating 25-OH Vitamin D is bound to VDBP *in vivo*. After neutralization, biotinylated 25-OH Vitamin D (enzyme conjugate) and peroxidase-labeled streptavidin- (enzyme complex) are added.

After careful mixing, the solution is transferred to the wells of the microtiter plate. Endogenous 25-OH Vitamin D of a patient sample competes with a 25-OH Vitamin-D₃-biotin conjugate for binding to the VDBG that is immobilized on the plate. Binding of 25-OH Vitamin D-biotin is detected by peroxidase-labeled streptavidin. Incubation is followed by a washing step to remove unbound components. The color reaction is started by addition enzyme substrate and stopped after a defined time. The colour intensity is inversely proportional to the concentration of 25-OH Vitamin D in the sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;
Wells coated with Vitamin D binding protein (VDBG).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials, 1 mL, ready to use;
Concentrations: 0 – 4 – 10 – 25 – 60 – 130 ng/mL
Conversion: 1 ng/mL = 2.5 nmol/L.
The standards are calibrated against the NIST Standard Reference Material (SRM) 2972;
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, 1 mL each, ready to use;
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.
Contain non-mercury preservative.
4. **Denaturation Buffer**, 1 vial, 10 mL, ready to use
5. **Neutralization Buffer**, 1 vial, 25 mL, ready to use,
Contains non-mercury preservative.
6. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 7 mL, ready to use,
Vitamin D₃ conjugated to biotin;
Contains non-mercury preservative.
7. **Enzyme Complex**, 1 vial, 7 mL, ready to use,
Streptavidin-Peroxidase Conjugate
Contains non-mercury preservative.
8. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use,
Tetramethylbenzidine (TMB).
9. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,
contains 0.5 M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
10. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),
see „Preparation of Reagents“.
11. **Cover Foil**, 1 sheet of adhesive cover foil

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- Vials for the Vitamin D release step
(e.g. rack with 96 vials, 0.65 mL each, 5 pieces; [REF](#) 781565-5; (BRAND GmbH))
- Single vials (e.g. single vials 0.65 mL each, 1000 pieces ([REF](#): EIA-5396-VIALS))
- Incubator 37 °C (98.6 °F)
- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic or linear graph paper or software for data reduction

4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Wash Solution

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.

Working Conjugate Solution

Prepare an adequate volume of *Working Conjugate Solution* by mixing *Enzyme Conjugate* with *Enzyme Complex* minimum 30 minutes before use.

Stability of the prepared Working Conjugate Solution: 1 week at 2 °C to 8 °C in a sealed container.

Example:

If the whole plate is used, mix 6 mL of *Enzyme Conjugate* with 6 mL of *Enzyme Complex* to a total volume of 12 mL.

If the whole plate is not used at once prepare the required quantity of *Working Conjugate Solution* by mixing 0.5 mL of *Enzyme Conjugate* with 0.5 mL of *Enzyme Complex* per strip (see table below):

No. of strips	<i>Enzyme Conjugate</i> (mL)	<i>Enzyme Complex</i> (mL)
1	0.5	0.5
2	1.0	1.0
3	1.5	1.5
4	2.0	2.0
5	2.5	2.5
6	3.0	3.0
7	3.5	3.5
8	4.0	4.0
9	4.5	4.5
10	5.0	5.0
11	5.5	5.5
12	6.0	6.0

4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

5.1 Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti-coagulant (e.g. Sarstedt Monovette with the appropriate plasma preparation) and centrifuged immediately after collection.

5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 3 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to two months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

All standards, samples, and controls should be run in duplicate. All standards, samples, and controls should be run concurrently so that all conditions of testing are the same.

6.2.1 Release Procedure and Pretreatment

1. Prepare an adequate volume of **Working Conjugate Solution** (see chapter 4.4)
2. Secure the desired number of appropriate vials or uncoated plates for the Vitamin D release step (not included in the kit).
3. Dispense **25 µL** of each **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into the vials.
4. Dispense **50 µL Denaturation Buffer** into each vial.
5. Seal vials and incubate for **30 minutes** at 37 °C.
6. Add **200 µL of Neutralization Buffer** to each vial.
7. Add **100 µL of Working Conjugate Solution** to each vial.
8. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing of the solution in this step. Use 150 µL of this mixed solution for the ELISA.

6.2.2 ELISA Procedure

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Transfer **150 µL** of the mixed solution of each **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into the appropriate wells.
(E.g. if in step 6.2.1 a rack with 96 vials/wells is used, an 8-channel pipette can be used for the transfer.)
3. Seal wells carefully and incubate for **60 minutes** at 37 °C.
4. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **4 times** with diluted *Wash Solution* (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note:
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Add **150 µL of Substrate Solution** to each well.
6. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
7. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL of Stop Solution** to each well.
8. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic or linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 130 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2.13
Standard 1 (4 ng/mL)	1.91
Standard 2 (10 ng/mL)	1.63
Standard 3 (25 ng/mL)	1.12
Standard 4 (60 ng/mL)	0.57
Standard 5 (130 ng/mL)	0.24

7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DRG 25-OH Vitamin D ELISA the following values were observed:

Population	Valid N	Age (years)	Mean Age	Mean Conc. (ng/mL)	5. Percentile (ng/mL)	95. Percentile (ng/mL)
Total	120	21 - 76	44	23.7	8.69	51.0
Males	64	24 - 76	47	25.8	9.78	51.9
Females	56	21 - 75	40	21.2	7.70	41.3
Caucasian	61	21 - 75	44	28.2	12.6	52.5
Hispanic	24	21 - 76	40	23.2	12.1	40.8
Afro-American	35	24 - 65	45	16.1	5.95	36.5
Northern	40	21 - 75	43	20.3	11.8	32.3
Central	40	24 - 62	43	16.1	6.36	29.6
Southern	40	24 - 76	45	34.6	18.9	56.0
Summer	60	24 - 76	47	29.7	12.7	52.7
Winter	60	21 - 66	40	17.6	6.67	29.5

The samples were collected from subjects with different skin tones, at 3 different geographical locations (North, South and Central United States), during summer and winter time.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

A review of the literature suggests the following ranges for the classification of 25-OH Vitamin D status³:

Vitamin D status	25-OH Vitamin D (ng/mL)	25-OH Vitamin D (nmol/L)
Deficiency	< 10	< 25
Insufficiency	10 – 29	25 – 72.5
Sufficiency	30 – 100	75 – 250
Toxicity	> 100	> 250

8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs like the international Vitamin D Quality Assessment Scheme (DEQAS) in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 3.5 – 130 ng/mL.

9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

25-OH Vitamin D ₃ :	102.4 %
25-OH Vitamin D ₂ :	69.5 %
1,25 (OH) ₂ Vitamin D ₃ :	< 0.1 %
1,25 (OH) ₂ Vitamin D ₂ :	< 0.1 %
3-Epi-25-OH-Vitamin D ₃ :	66.3 %
Vitamin D ₃ :	3.8 %
Vitamin D ₂ :	3.2 %

9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated according to CLSI EP17-A by subtracting 1.645 standard deviations from the mean of 60 replicate analyses of the Zero Standard (S0) and was found to be < 2.5 ng/mL.

The functional sensitivity of the DRG ELISA was evaluated according to CLSI EP17-A, is defined as the Vitamin D concentration that approximates a CV of 20% and was found to be < 3.5 ng/mL.

9.4 Reproducibility

Reproducibility of the DRG ELISA was evaluated according to CLSI EP5-A. Six samples, containing different concentrations of analyte, were assayed in duplicate in two assays per day over 20 operating days to determine the within- and between-assay variability.

9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	80	6.0	4.4
2	80	10.9	3.3
3	80	22.5	1.7
4	80	29.2	1.6
5	80	57.3	1.6
6	80	88.9	1.4

9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	80	6.0	8.3
2	80	10.9	5.2
3	80	22.5	4.1
4	80	29.2	3.6
5	80	57.3	3.2
6	80	88.9	2.1

9.4.3 Inter-Lot

The inter-assay (between-lots) variation was determined by repeated measurements of 6 samples in 3 different kit lots.

Sample	n	Mean (ng/mL) Lot 1	Mean (ng/mL) Lot 2	Mean (ng/mL) Lot 3	CV (%)
1	18	7,3	7,6	6,4	8,7
2	18	16,8	15,7	14,9	6,2
3	18	33,0	30,7	29,4	5,9
4	18	52,7	50,1	47,1	5,6
5	18	80,9	74,3	74,1	5,1
6	18	108,8	105,7	102,3	3,1

9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding 4 solutions with known concentrations in a 1:1 ratio.

The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous value + added value) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spike material).

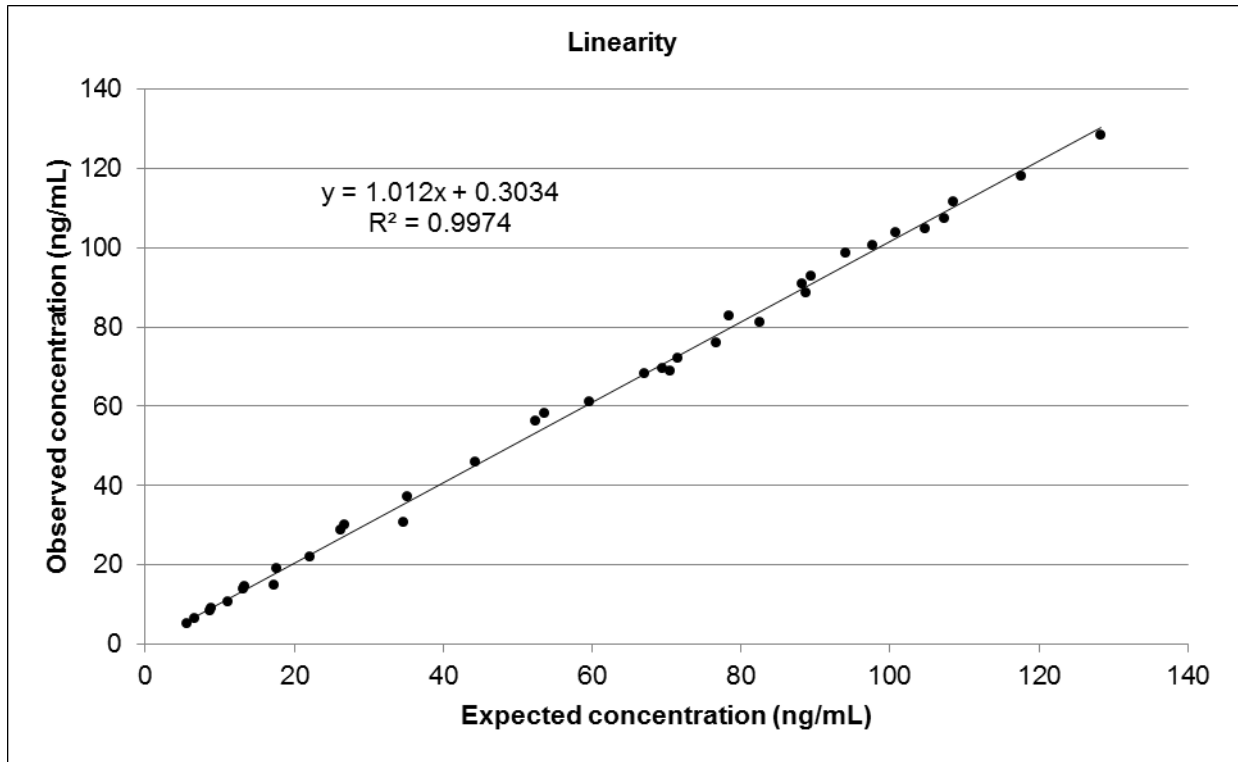
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	
Concentration [ng/mL]	9.0	17.4	36.4	60.5	82.6	
Average Recovery	94.7	93.9	104.1	105.2	92.5	
Range of Recovery [%]	from	91.4	92.3	92.9	96.9	88.2
	to	99.7	96.7	112.4	111.3	94.1

9.6 Linearity

According to CLSI EP6-A samples have been diluted with Zero Standard (S0). The results were analyzed as a linear regression of the Expected against Observed values. The resulting regression equation is:

Observed = Expected 1.01 + 0.30; R² = 0.997

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5	
Concentration [ng/mL]	69.4	88.7	104.8	107.4	128.3	
Average Recovery	90.8	98.4	107.5	103.2	102.7	
Range of Recovery [%]	from	85.8	94.7	105.7	97.9	97.5
	to	97.8	103.3	109.2	108.5	107.8

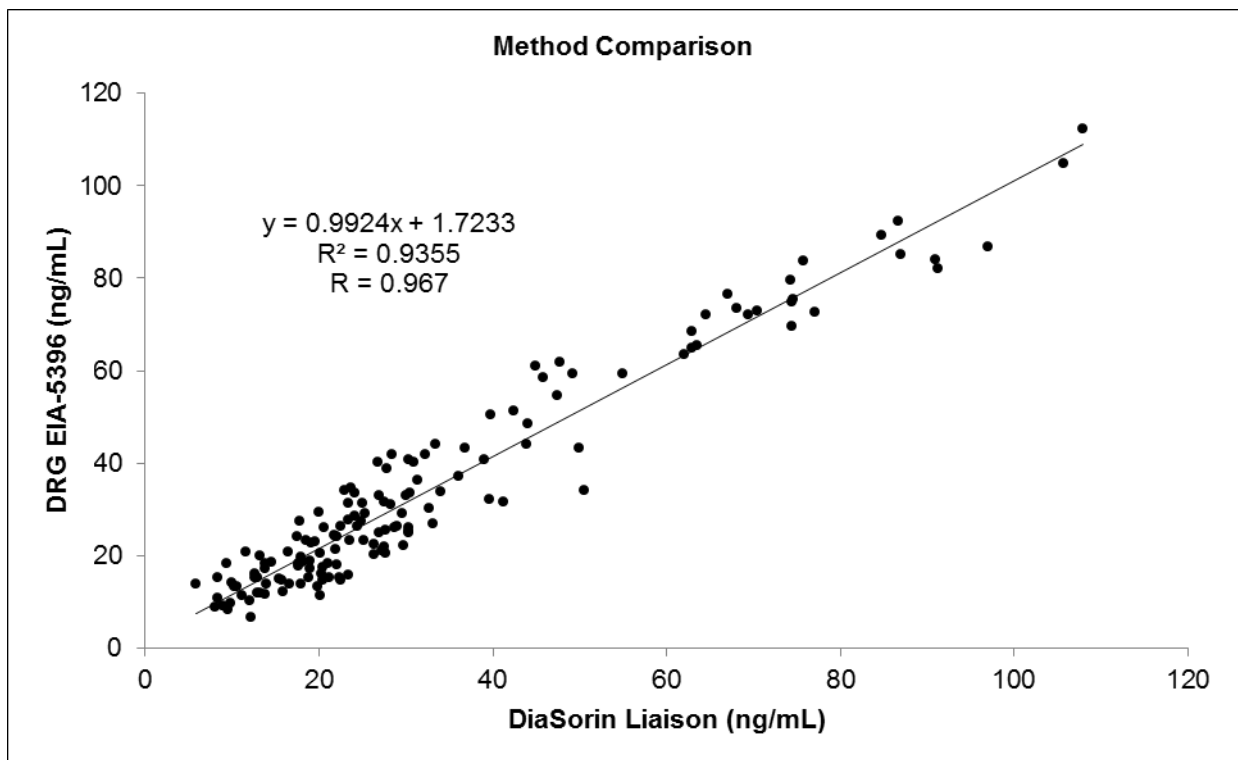


9.7 Comparison Studies

For method comparison according to CLSI EP09-A2-IR, 145 samples spanning the assay range were tested by the DRG 25-OH Vitamin D (total) ELISA and by the DiaSorin LIAISON® 25-OH Vitamin D TOTAL Assay.

The resulting regression equation was:

DRG = DiaSorin $0.99 + 1.72$; $R = 0.967$.



10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL), Triglyceride (up to 7.5 mg/mL), Cholesterol (up to 2.8 mg/mL), Albumin (up to 75 mg/mL) and Rheumatoid Factor (up to 100 U/mL) have no influence on the assay results.

10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of 25-OH Vitamin D in a sample.

10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

11 LEGAL ASPECTS

Only for countries where the declaration of European Conformity (CE mark) is applicable.

11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

12 REFERENCES / LITERATURE

1. Armas LAG., Hollis M., Heaney RP. Vitamin D₂ is much less effective than vitamin D₃ in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(11) 5387-91.
2. Houghton LA., Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D₂) as a vitamin supplement. *Am. J. Nutr.* 2006; 84, 694-97.
3. Holick M. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 2002; 9(1) 87-98.
4. Pilz S. et al. Vitamin D: clinical implications beyond musculoskeletal diseases. *J. Lab. Med.* 2011; 35(4) 211-16.
5. Visser M. et al. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84(3) 616-22.
6. Souberbielle JC. Et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev.* 2010; 9 709-15.

1 EINLEITUNG

Der DRG 25-OH Vitamin D ELISA wird zur quantitativen Bestimmung von Vitamin D in Serum und Plasma eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

1.1 Zusammenfassung und Erläuterung

Vitamin D ist ein Steroidhormon, das die Aufnahme von Kalzium aus dem Darm und die Kalziumhomöostase reguliert. Die zwei häufigsten Formen von Vitamin D sind Vitamin D₃ (Cholecalciferol) und Vitamin D₂ (Ergocalciferol), die isomere Strukturen aufweisen, wobei D₂ eine geringere biologische Aktivität zugeschrieben wird¹.

Vitamin D₃ wird nicht nur durch die Nahrung aufgenommen, sondern auch in der Haut unter Einfluss von Sonnenlicht aus dem Cholesterin-Vorläufermolekül 7-Dehydrocholesterin gebildet. D₂ hingegen wird vorwiegend durch pflanzliche Nahrung zugeführt und stellt normalerweise weniger als 5% des gesamten Vitamin D-Gehaltes dar². In der Leber wird Vitamin D zu 25-Hydroxy-Vitamin D (25-OH D) hydroxyliert, welches die wichtigste Speicherform des Vitamin D darstellt. Im Blut sind Vitamin D und 25-OH D fast vollständig an das Transportprotein Vitamin D Bindeprotein (VDBP) gebunden. Bei Bedarf wird 25-OH D in der Niere zur biologisch aktiven Form 1,25 Dihydroxy Vitamin D (1,25-(OH)₂ D) umgewandelt³. Dieser Prozess wird durch die Konzentration von 1,25-(OH)₂ D, Parathormon, ionisiertem Kalzium sowie durch Hypophosphatämie streng reguliert. Der 1,25-(OH)₂ D-Spiegel liegt deshalb ungefähr 1000-fach niedriger als der 25-OH D-Spiegel⁴. Obwohl 1,25-(OH)₂ D die biologisch aktive Form von Vitamin D darstellt, wird die Bestimmung von 25-OH D inzwischen als geeignete Methode angesehen, um den Vitamin D Status zu erfassen und um eine Hypovitaminose zu diagnostizieren⁵.

Die Konzentration von 25-OH D sinkt während der Winterzeit (geringere Sonnenexposition), bei dunkler Hautfarbe sowie mit zunehmendem Alter⁶.

Die Bestimmung von 25-OH D aus Serum oder Plasma unterstützt die Diagnose und Therapie der postmenopausalen Osteoporose, der Rachitis bei Kindern, der Osteomalazie, der renalen Osteodystrophie, der neonatalen Hypokalzämie sowie des Hyperparathyreoidismus. Ferner werden die Auswirkungen des akuten subklinischen Vitamin D Mangels in verschiedenen europäischen Ländern kritisch diskutiert⁶.

Schädliche Effekte können bei Einnahme sehr hoch dosierter pharmazeutischer Vitamin D Präparate auftreten, und bei Kindern zu Hyperkalzämie und Nephrokalzinose führen.

2 TESTPRINZIP

Der DRG 25-OH Vitamin D ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

In einem ersten Schritt werden Proben, Standards und Kontrollen in separaten Gefäßen mit Denaturation Buffer vorbehandelt, um das Vitamin D aus seiner Bindung an Vitamin D Bindeprotein (VDBP) zu lösen. Nach Zugabe des Neutralization Buffers werden nacheinander biotinyliertes 25-OH Vitamin D (Enzyme Conjugate) und Peroxidase-markiertes Streptavidin- (Enzyme Complex) zugegeben.

Nach sorgfältigem Mischen wird die Lösung auf die Wells der Mikrotiterplatte übertragen. Endogenes 25-OH Vitamin D der Probe kompetiert mit biotinyliertem 25-OH Vitamin-D₃ um die Bindung an das VDBG, das auf der Platte immobilisiert ist. Die Bindung von biotinyliertem 25-OH Vitamin D wird durch Peroxidase-markiertes Streptavidin nachgewiesen. Nach Inkubation werden ungebundene Substanzen durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der 25-OH Vitamin D-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);
Mit Vitamin D Bindeprotein (VDBP) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;
Konzentrationen: 0 – 4 – 10 – 25 – 60 – 130 ng/mL
Umrechnungsfaktor: 1 ng/mL = 2,5 nmol/L.
Die Standards sind kalibriert gegen das NIST Standard Reference Material (SRM) 2972
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1 mL; gebrauchsfertig
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Denaturation Buffer** (Denaturierungspuffer), 1 Fläschchen, 10 mL, gebrauchsfertig;
5. **Neutralization Buffer** (Neutralisierungspuffer), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 7 mL, gebrauchsfertig;
Vitamin D₃ mit Biotin konjugiert.
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
7. **Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 7 mL, gebrauchsfertig;
Streptavidin mit Peroxidase markiert
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
8. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
Substratlösung TMB.
9. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;
enthält 0,5 M H₂SO₄,
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
10. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
11. **Cover Foil**, 1 x selbstklebende Abdeckfolie

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Geeignete Reaktionsgefäße oder Mikrotiterplatten für die Freisetzung des 25-OH Vitamin D (z.B. Röhrchen-Rack mit 96 Röhrchen, je 0.65 mL, 5 Stück; [REF](#) 781565-5; (BRAND GmbH))
- Einzelröhrchen (z.B. Einzelröhrchen, je 0,65 mL, 1000 Stück; [REF](#) EIA-5396-VIALS)
- Inkubator 37 °C
- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.

Working Conjugate Solution

Stellen Sie das benötigte Volumen der *Working Conjugate Solution* her. Mindesten 30 Minuten vor Gebrauch wird dafür das *Enzyme Conjugate* und der *Enzyme Complex* gemischt.

Stabilität der hergestellten Working Conjugate Solution: 1 Woche bei 2 °C - 8 °C in einem verschlossenen Gefäß.

Beispiel:

Wird die ganze Platte verwendet, mischen Sie 6 mL *Enzyme Conjugate* mit 6 mL *Enzyme Complex* (Gesamtvolumen 12 mL).

Wird nur ein Teil der Platte benötigt, setzen Sie nur das erforderliche Volumen der *Working Conjugate Solution* an. Mischen Sie dafür pro Streifen 0,5 mL *Enzyme Conjugate* mit 0,5 mL *Enzyme Complex* (siehe Tabelle):

Anzahl der Streifen	<i>Enzyme Conjugate</i> (mL)	<i>Enzyme Complex</i> (mL)
1	0.5	0.5
2	1.0	1.0
3	1.5	1.5
4	2.0	2.0
5	2.5	2.5
6	3.0	3.0
7	3.5	3.5
8	4.0	4.0
9	4.5	4.5
10	5.0	5.0
11	5.5	5.5
12	6.0	6.0

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden. Lipämische, ikterische und/oder stark hämolytierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

5.1 Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulant enthalten (z.B.: Sarstedt Monovette – mit entsprechender Plasma-Präparierung). Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 3 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 2 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Patientenprobe + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

6.2.1 Freisetzung und Vorbereitung

1. Stellen Sie das benötigte Volumen der *Working Conjugate Solution* her (siehe Kap. 4.4).
2. Die benötigte Anzahl an Reaktionsgefäßen oder unbeschichtete Wells für die Freisetzung des Vitamin D bereitstellen (nicht im Kit enthalten).
3. Je **25 µL Standard, Control** und **Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Gefäße geben.
4. **50 µL Denaturation Buffer** in jedes Gefäß geben.
5. Gefäße verschließen und **30 Minuten** bei 37 °C inkubieren.

6. **200 µL Neutralization Buffer** in jedes Gefäß geben.
7. **100 µL Working Conjugate Solution** in jedes Gefäß geben.
8. Alle Gefäße für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung der Lösungen zu erreichen.
150 µL dieser Lösung werden im ELISA eingesetzt.

6.2.2 ELISA-Durchführung

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung der Mikrotiterplatte befestigen.
2. **150 µL** der gut durchmischten Lösung von **Standard, Control** und **Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells überführen.
(Falls für Schritt 6.2.1 ein Rack mit 96 Röhrchen/Wells eingesetzt wird, kann für den Transfer z.B. eine 8-Kanal-Pipette verwendet werden.)
3. Alle Wells sorgfältig mit Folie versiegeln und für **60 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
4. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **4-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
5. **150 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
6. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
8. Die Optische Dichte bei **450 ± 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Rodbard oder 4 Parameter-Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2,13
Standard 1 (4 ng/mL)	1,91
Standard 2 (10 ng/mL)	1,63
Standard 3 (25 ng/mL)	1,12
Standard 4 (60 ng/mL)	0,57
Standard 5 (130 ng/mL)	0,24

7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden kaukasischen Jugendlichen und Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DRG 25-OH Vitamin D ELISA folgende Werte:

Population	Anzahl N	Alter (Jahre)	Mittelwert Alter	Mittelwert (ng/mL)	5. Perzentile (ng/mL)	95. Perzentile (ng/mL)
Gesamt	120	21 - 76	44	23.7	8.69	51.0
Männer	64	24 - 76	47	25.8	9.78	51.9
Frauen	56	21 - 75	40	21.2	7.70	41.3
Kaukasier	61	21 - 75	44	28.2	12.6	52.5
Lateinamerikaner	24	21 - 76	40	23.2	12.1	40.8
Afro-Amerikaner	35	24 - 65	45	16.1	5.95	36.5
Norden	40	21 - 75	43	20.3	11.8	32.3
Zentral	40	24 - 62	43	16.1	6.36	29.6
Süden	40	24 - 76	45	34.6	18.9	56.0
Sommer	60	24 - 76	47	29.7	12.7	52.7
Winter	60	21 - 66	40	17.6	6.67	29.5

Die Proben wurden von Individuen mit drei verschiedenen Hauttönen gesammelt, in drei verschiedenen geografischen Regionen (im Norden, Süden und im Zentrum der USA), während des Sommers und im Winter.

In der Literatur werden folgende Bereiche für die Klassifizierung des 25-OH-Vitamin D Status vorgeschlagen³:

Vitamin D Status	25-OH Vitamin D (ng/mL)	25-OH Vitamin D (nmol/L)
Defizienz (schwerer Mangel)	< 10	< 25
Insuffizienz (Mangel)	10 – 29	25 – 72,5
Suffizienz (gut versorgt)	30 – 100	75 – 250
Toxisch (schädlich)	> 100	> 250

8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen (z.B. International Vitamin D Quality Assessment Scheme; DEQAS) teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

9 ASSAY CHARACTERISTIKA

9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 3,5 – 130 ng/mL.

9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität des DRG ELISAs wurde ermittelt entsprechend der Richtlinie CLSI EP17-A. Sie ist definiert als Mittelwert minus der 1,645-fachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 60) und beträgt < 2,5 ng/mL.

Die funktionale Sensitivität des DRG ELISAs wurde ermittelt entsprechend der Richtlinie CLSI EP17-A. Sie ist definiert als die Vitamin D-Konzentration einer Patientenprobe, deren Mehrfach-Messung (n= 60) annähernd einen VK von 20% erreicht und wurde mit < 3,5 ng/mL ermittelt.

Die Daten zu:

9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5 Wiederfindung

9.6 Linearität

9.7 Vergleichsstudien

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL), Triglyceride (bis zu 7,5 mg/mL), Cholesterin (bis zu 2.8 mg/mL), Albumin (bis zu 75 mg/mL) und Rheumafaktor (bis zu 100 U/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des 25-OH Vitamin D-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

10.3 High-Dose-Hook-Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

11.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12 REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DRG 25-OH Vitamin D (total) ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di 25-OH vitamina D in siero e plasma.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test 25-OH Vitamin D (total) ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul principio del legame competitivo.

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di 25-OH vitamina D nel campione del paziente.

3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'insero del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati immagazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH.

4 COMPONENTI DEL KIT

4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con Vitamin D binding protein (VDBG)
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
Concentrazioni: 0 – 4 – 10 – 25 – 60 – 130 ng/mL
Conversione: 1 ng/mL = 2.5 nmol/L.
Gli standard sono calibrati contro lo NIST Standard Reference Material (SRM) 297;
Contiene conservante senza mercurio.
3. **Control Low & High** (Controllo), 2 flaconi, 1 mL, pronto all'uso
I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.
Contiene conservante senza mercurio.
4. **Denaturation Buffer** (Tampone di denaturazione), 1 flacone, 10 mL, pronto all'uso.
5. **Neutralization Buffer** (Tampone di neutralizzazione), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso.
Contiene conservante senza mercurio
6. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 7 mL, pronto all'uso
vitamina D₃ coniugato alla biotina
Contiene conservante senza mercurio.
7. **Enzyme Complex** (Complesso enzimatico), 1 flacone, 7 mL, pronto all'uso,
Streptavidina coniugato alla perossidasi di rafano.
Contiene conservante senza mercurio.
8. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 25 mL, pronto all'uso;
TMB (benzidine tetrametilico).
9. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso;
contiene 0.5 M H₂SO₄.
Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
10. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X);
vedi „preparazione dei reagenti“.
11. **Cover Foil**, 1 pellicola adesiva

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Tubetti per il passaggio di rilascio della vitamina D
(p.es. piastra a 96 tubetti, ognuno 0.65 mL, 5 unità; **REF** 781565-5; (BRAND GmbH))
- Singoli tubi (p.es. singoli tubi ognuno 0,65 mL, 1000 pezzi (**REF** EIA-5396-VIALS))
- Incubatore 37 °C
- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader).
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.

4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per due mesi se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.
La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

Working Conjugate Solution

Preparare un volume adatto della *Working Conjugate Solution* mescolando *Enzyme Conjugate* con *Enzyme Complex* al minimo 30 minuti prima dell'uso.

Stabilità del Working Conjugate Solution: 1 settimana a 2 °C - 8 °C in un contenitore chiuso.

Esempio:

Se la piastra intera è usata, diluire 6 mL *Enzyme Coniugate* con 6 mL del *Enzyme Complex* per avere un volume totale di 12 mL.

Se non viene usata una piastra intera preparare la quantità del *Working Conjugate Solution* necessaria mescolando 0,5 mL del *Enzyme Coniugate* con 0,5 mL del *Enzyme Complex* per ogni fila di micropozzetti (vedi tabella):

No. di file	<i>Enzyme Conjugate</i> (mL)	<i>Enzyme Complex</i> (mL)
1	0.5	0.5
2	1.0	1.0
3	1.5	1.5
4	2.0	2.0
5	2.5	2.5
6	3.0	3.0
7	3.5	3.5
8	4.0	4.0
9	4.5	4.5
10	5.0	5.0
11	5.5	5.5
12	6.0	6.0

4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DRG, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5 CAMPIONI

Siero o plasma (EDTA-, Eparina- or citrate plasma) può essere usato per questo test.

Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

5.1 Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

Plasma:

Il sangue dovrebbe essere collezionato in tubetti da centrifuga contenenti un anticoagulante (p. es. Sarstedt Monovette con un'adeguata preparazione per il plasma) e centrifugando immediatamente dopo la puntura.

5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 3 giorni a 2 °C a 8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a due mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso

5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con lo *Standard 0* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL campione + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0* (agitare bene).

6 ATTUAZIONE DEL TEST

6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2 Eseguito del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

6.2.1 Procedimento di rilascio e pre-trattamento

1. Preparare un volume adatto della **Working Conjugate Solution** (vedi capitolo 4.4).
2. Inserire il numero desiderato di tubetti appropriati o di piastre non ricoperte per il passaggio di rilascio della vitamina D (non incluso nel kit).
3. Aggiungere **25 µL** di ogni **Standard, Controllo e campione** con una nuova punta monouso nei pozzetti.
4. Aggiungere **50 µL Denaturation Buffer** in ogni pozzetto.
5. Coprire i pozzetti/tubetti ed incubare per **30 minuti** a 37 °C.
6. Aggiungere **200 µL** del **Neutralization Buffer** in ogni pozzetto.
7. Aggiungere **100 µL** del **Working Conjugate Solution** in ogni pozzetto.
8. Mescolare accuratamente per 10 secondi. Il mescolamento della soluzione è molto importante in questo passaggio. Usare 150 µL di questa soluzione per il test ELISA.

6.2.2 Procedimento di ELISA

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Trasferire **150 µL** della soluzione ben mescolata di ogni **Standard, Controllo e campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
(P.es. se nel passaggio 6.2.1 una piastra con 96 tubetti/pozzetti è usata, una pipetta a 8 canali può essere usata per il trasferimento.)
3. Chiudere accuratamente e incubare per **60 minuti** a 37 °C.
4. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
Lavare i pozzetti **4 volte** con *Wash Solution* diluita (300 µL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante:
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguito del lavaggio!
5. Aggiungere **150 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
6. Incubare per **15 minuti** a temperatura ambiente.
7. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
8. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3 Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'esecuzione del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2.13
Standard 1 (4 ng/mL)	1.91
Standard 2 (10 ng/mL)	1.63
Standard 3 (25 ng/mL)	1.12
Standard 4 (60 ng/mL)	0.57
Standard 5 (130 ng/mL)	0.24

7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DRG 25-OH Vitamin D (total) ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Popolazione	N Valori	Età (anni)	Valore medio Età	Conc. media (ng/mL)	5. Percentile (ng/mL)	95. Percentile (ng/mL)
Total	120	21 - 76	44	23.7	8.69	51.0
Uomini	64	24 - 76	47	25.8	9.78	51.9
Donne	56	21 - 75	40	21.2	7.70	41.3
Caucasi	61	21 - 75	44	28.2	12.6	52.5
Latino-americani	24	21 - 76	40	23.2	12.1	40.8
Afro-americani	35	24 - 65	45	16.1	5.95	36.5
Nord degli Stati Uniti	40	21 - 75	43	20.3	11.8	32.3
Centro degli Stati Uniti	40	24 - 62	43	16.1	6.36	29.6
Sud degli Stati Uniti	40	24 - 76	45	34.6	18.9	56.0
Estate	60	24 - 76	47	29.7	12.7	52.7
Inverno	60	21 - 66	40	17.6	6.67	29.5

I campioni sono stati raccolti da soggetti con differenti colori di pelle, da tre regioni geografiche diverse (nel nord, sud e centro degli Stati Uniti), durante l'estate e inverno.

Uno studio della letteratura suggerisce i seguenti campi per la classificazione dello stato della 25-OH Vitamina D³:

Stato di Vitamina D	25-OH Vitamina D (ng/mL)	25-OH Vitamina D (nmol/L)
Deficienza	< 10	< 25
Insufficienza	10 – 29	25 – 72.5
Sufficienza	30 – 100	75 – 250
Tonicità	> 100	> 250

8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

9 CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 3,5 – 130 ng/mL.

9.2 Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3 Sensitività analitica

La sensitività analitica: < 2,5 ng/mL.

La sensitività funzionale: < 3,5 ng/mL

9.4 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.5 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.6 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

10 LIMITAZIONE DEL TEST

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0.5 mg/mL), trigliceridi (fino a 30 mg/mL), colesterolo (fino a 2,8 mg/mL), albumina (fino a 75 mg/mL) e fattore reumatoide (fino a 100 U/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di 25-OH vitamina D nel campione.

10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto gancio (effetto hook) è stato osservato in questo test.

11 ASPETTI LEGALI

11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3 Responsabilità legali


Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

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 conservacion	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