

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

R_x ONLY

RIASSUNTO

Preparato di il Campione ed il reagente

- Diluire il tampone di lavaggio concentrato 1:200 con
- Ricostituire gli standard e i controlli con acqua deionizzata o distillata

Procedura di dosaggio

Pipettare **50 µl** di standard, controlli e campioni nei pozzetti del dosaggio

Pipettare **150 µl** di tampone di dosaggio in tutti i pozzetti

Incubare per **2 ore** agitando (400 giri/min) a temperatura ambiente. Preparare* la soluzione di lavoro coniugata con HRP durante l'incubazione e almeno 1 ora e 45 minuti prima dell'uso.

***NOTA: è importantissimo seguire la giusta sequenza per la preparazione. Vedere
PREPARAZIONE DEI REAGENTI**

Lavare **3 volte** con la soluzione di lavaggio 1X

Pipettare **200 µl** di soluzione di lavoro coniugata con perossidasi di rafano (HRP)

Incubare per **30 minuti** agitando (400 giri/min) a temperatura ambiente

Lavare **3 volte** con la soluzione di lavaggio 1X

Pipettare **100 µl** di soluzione cromogena

Incubare per **15 minuti** agitando (400 giri/min) a temperatura ambiente, evitare la luce solare diretta

Pipettare **100 µl** di soluzione bloccante (leggere i risultati entro 1 ora)

Leggere le assorbanze a **450 nm** (filtro di riferimento 630 nm o 650 nm)



USO PREVISTO

Il dosaggio immunoenzimatico MicroVue 25-OH Vitamin D EIA è stato concepito per la determinazione quantitativa della 25-idrossivitamina D₂ e D₃ (25OH D₂ e 25OH D₃) nel siero umano. I risultati vanno utilizzati unitamente ai altri risultati clinici e di laboratorio per valutare lo stato della vitamina D di un paziente.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Vitamina D è il termine generico utilizzato per indicare la vitamina D₂, o ergocalciferolo, e la vitamina D₃, o colecalciferolo. L'uomo produce naturalmente la vitamina D₃ esponendo la pelle ai raggi ultravioletti del sole. Soprattutto nel fegato, la vitamina D₃ viene metabolizzata in 25-idrossivitamina D₃ (25OH D₃) cioè la forma principale della vitamina D in circolazione nell'organismo. La 25OH D₃ è un precursore di altri metaboliti della vitamina D ed ha anche una propria attività limitata. Il derivato più attivo è rappresentato dalla 1, 25-idrossivitamina D₃, prodotta nei reni (o nella placenta) mediante 1-idrossilazione della 25OH D₃. La 25OH vitamina D stimola l'assorbimento intestinale di calcio e fosforo, nonché il riassorbimento e la mineralizzazione delle ossa. La 25OH vitamina D può essere attiva anche in altri tessuti responsabili del trasporto del calcio (placenta, reni, ghiandola mammaria ...) e nelle ghiandole endocrine (paratiroidi, cellule beta ...).

La vitamina D₃ e la vitamina D₂ sono disponibili inoltre tramite l'ingestione di alimenti o l'integrazione alimentare. Dato che la vitamina D₂ viene metabolizzata in modo simile alla vitamina D₃, contribuiscono entrambe al livello generale di vitamina D presente nell'individuo. Questo è il motivo per cui è molto importante misurare allo stesso modo entrambe le forme di 25OH Vitamina D per una diagnosi corretta 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 esito della gravidanza. La misurazione di entrambe le forme della 25OH vitamina D è necessaria anche per determinare la causa di concentrazioni di calcio anomale nel siero dei pazienti. È stato dimostrato che l'intossicazione da vitamina D provoca danni ai reni e ai tessuti.

PRINCIPIO DELLA PROCEDURA

Il dosaggio immunoenzimatico MicroVue 25-OH Vitamin D EIA è un dosaggio immunoassorbente legato a un enzima in fase solida eseguito su piastre per microtitolazione. Durante una prima fase di incubazione di 2 ore a temperatura ambiente, la 25OH vitamina D totale (D₂ e D₃) presente negli standard, nei controlli e nei campioni viene dissociata dalle proteine leganti il siero per fissarsi sui siti di legame di uno specifico anticorpo monoclonale. Dopo una fase di lavaggio, una quantità prestabilita di 25OH vitamina D marcata con biotina in presenza di perossidasi di rafano (HRP) compete con la 25OH vitamina D₂ e la 25OH vitamina D₃ non marcate presenti sui siti di legame dell'anticorpo monoclonale specifico. Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, la piastra di microtitolazione viene lavata per fermare la reazione di competizione. La soluzione cromogena (TMB) viene aggiunta e incubata per 15 minuti. La reazione viene interrotta con l'aggiunta della soluzione bloccante e la piastra di microtitolazione viene letta alla lunghezza d'onda appropriata. Il ricambio del substrato viene determinato colorimetricamente misurando l'assorbanza, che risulta inversamente proporzionale alla concentrazione di 25OH vitamina D totale (D₂ e D₃).

Viene tracciata una curva di calibrazione e le concentrazioni di 25OH vitamina D totale (D₂ e D₃) nei campioni vengono determinate mediante interpolazione della dose dalla curva di calibrazione.

REAGENTI E MATERIALI FORNITI

Il dosaggio immunoenzimatico MicroVue 25-OH Vitamin D EIA contiene:

A Standard per 25-OH vitamina D (Calibratore 0) Liofilizzato. Lo standard zero è la matrice biologica (plasma umano) con gentamicina e ProClin®. Ricostituire con 1 ml di acqua deionizzata.	Codice A	1 cisc. x 1 ml (Std A)
B-F Standard per 25-OH vitamina D B-F (Calibratori 1-5) Liofilizzato. Siero di cavallo con gentamicina e Proclin®. Ricostituire ciascun flacone con 1 ml di acqua deionizzata.	Codice B-F	1 cisc. x 1 ml (Std B-F)
L Controllo per 25-OH vitamina D (Controllo 1) Liofilizzato. Siero umano con ProClin®. Ricostituire con 1 ml di acqua deionizzata.	Codice 4219716	1 cisc. x 1 ml
H Controllo per 25-OH vitamina D (Controllo 2) Liofilizzato. Siero umano con ProClin®. Ricostituire con 1 ml di acqua deionizzata.	Codice 4219717	1 cisc. x 1 ml
① Piastra per microdosaggio (piastra di microtitolazione) Piastra di microtitolazione con 96 pozzetti rivestiti con anticorpo monoclonale anti-25OH vitamina D ₂ e D ₃ .	Codice 4219708	12 x 8 pozzetti
② Soluzione bloccante Contiene 1M di acido cloridrico (HCl).	Codice SS04	12 ml
③ Tampone di lavaggio concentrato 200X (soluzione di lavaggio) Contiene TRIS-HCl. Diluire con acqua deionizzata.	Codice 4219711	10 ml
④ Substrato TMB (soluzione cromogena TMB) Pronto per l'uso. Contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidene (TMB).	Codice SB04	12 ml
⑤ 25-OH vitamina D biotinilata (coniugato concentrato) Coniugato concentrato 25OH. Diluire con soluzione di ricostituzione.	Parte di 4119703	0,3 ml
⑥ HRP Concentrata Contiene HRP concentrata.	Codice 4119713	0,2 ml
⑦ Soluzione di ricostituzione (Tampone coniugato) Pronto per l'uso. Tampone coniugato con caseina e ProClin®.	Codice 4119705	30 ml
⑧ Tampone di dosaggio (Tampone di incubazione) Pronto per l'uso. Tampone di incubazione con caseina e ProClin®. ProClin® è un marchio registrato di Rohm and Haas Company.	Codice 4219713	20 ml

Nota: per la diluizione di campioni con valori superiori allo standard massimo, utilizzare il controllo basso per la 25-OH vitamina D (Controllo 1) o un campione di siero precedentemente quantificato con una concentrazione di 25-OH inferiore a (<) 25 ng/ml e superiore a (>) 4,4 ng/ml.

Usare il Controllo 1, o il campione di siero appropriato, per diluire per 2 volte i campioni ad alta concentrazione. Utilizzare la concentrazione calcolata del Controllo 1, o il campione di siero corrispondente, per calcolare il risultato della diluizione.

Calcoli per i campioni diluiti:

Valore del campione = (Valore misurato – F1*Controllo misurato 1) / F2

Dove i seguenti valori per F1 e F2 sono:

- Campione diluito 2X, F1 = 0,5; F2 = 0,5
- Campione diluito 4X, F1 = 0,75; F2 = 0,25
- Campione diluito 8X, F1 = 0,875; F2 = 0,125

Esempio:

Un campione esterno alla curva di calibrazione viene diluito 4X con il Controllo 1, e misurato a 70 ng/ml. Il Controllo 1 viene misurato nello stesso ciclo a 20 ng/ml.

Diluizione 4X, F1 = 0,75; F2 = 0,25

Valore calcolato del campione = $(70 - 0,75 \cdot 20) / 0,25 = 220$ ng/ml

Non è disponibile alcun materiale di riferimento internazionale.

MATERIALE NECESSARIO MA NON FORNITO

Sono richiesti i seguenti materiali non inclusi nel kit:

- Acqua deionizzata o distillata
- Pipette per l'erogazione di: 50 µl, 150 µl, 200 µl e 1 ml (è consigliato l'uso di pipette precise con punta in plastica monouso)
- Miscelatore vortex
- Agitatore magnetico
- Agitatore per piastre (400 giri/min)
- Contenitore di lavaggio per le piastre per microdosaggio
- Lettore per piastre per microdosaggio in grado di effettuare letture a 450 nm e 650 nm o 630 nm (lettura bicromatica)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Sicurezza

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- I componenti ematici umani inclusi in questo kit sono stati testati con metodi approvati dalle autorità europee e/o dall'FDA e sono risultati negativi per HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Nessun metodo noto può offrire una garanzia completa che i prodotti derivati dal sangue non trasmettano epatite, AIDS o altre infezioni. Pertanto, occorre trattare i reagenti, il siero o i campioni di plasma in conformità alle procedure di sicurezza locali vigenti.
- Tutti i prodotti animali e derivati sono stati prelevati da animali sani. I componenti bovini provengono da paesi in cui non sono stati segnalati casi di encefalopatia spongiforme bovina. Ciò nonostante, i componenti contenenti sostanze animali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Evitare il contatto della pelle con tutti i reagenti. La soluzione bloccante contiene HCl. In caso di contatto, lavare abbondantemente con acqua.
- Non fumare, bere, mangiare o applicare cosmetici nell'area di lavoro. Non pipettare con la bocca. Usare indumenti protettivi e guanti monouso.
- Eseguire il test in un locale adeguatamente aerato.
- Smaltire i contenitori e i contenuti non utilizzati in conformità con la normativa nazionale e locale in vigore.
- Indossare idonei indumenti protettivi, guanti e protezione per gli occhi/il viso quando si manipola il contenuto del kit.
- Lavarsi accuratamente le mani dopo la manipolazione.

- Per ulteriori informazioni su simboli di pericolo, sicurezza, manipolazione e smaltimento dei componenti di questo kit, consultare la scheda di sicurezza (SDS) reperibile sul sito web quidel.com.

CONSERVAZIONE

- Prima dell'apertura o della ricostituzione, tutti i componenti dei kit sono stabili fino alla data di scadenza, indicata sull'etichetta, se conservati ad una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.
- Dopo la ricostituzione, gli standard e i controlli sono stabili per otto settimane ad una temperatura compresa tra 2 e 8 °C. Per periodi di conservazione più lunghi, suddividere in aliquote e conservare a – 20 °C per un massimo di 4 mesi. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.
- La soluzione di lavaggio di lavoro appena preparata deve essere utilizzata in giornata.
- Eventuali alterazioni dell'aspetto fisico dei reagenti del kit possono indicare instabilità o deterioramento.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Tampone di lavaggio

Preparare un adeguato volume di soluzione di lavaggio di lavoro aggiungendo 199 volumi di acqua deionizzata a 1 volume di soluzione di lavaggio (200x). Omogeneizzare usando un agitatore magnetico. A fine giornata, eliminare la soluzione di lavaggio di lavoro eventualmente inutilizzata.

Standard A-F

Ricostituire gli standard A-F con 1 ml di acqua distillata.

Controlli

Ricostituire i controlli con 1 ml di acqua distillata.

Soluzione di lavoro coniugata con HRP

La soluzione di lavoro coniugata con HRP va preparata durante l'incubazione di 2 ore e almeno 1 ora e 45 minuti prima dell'uso.

Preparare un volume adeguato di soluzione di lavoro coniugata con HRP miscelando i tre (3) reagenti nell'ordine seguente:

1. Soluzione di ricostituzione (Tampone coniugato)
2. 25-OH vitamina D biotinilata (coniugato concentrato)
3. Vorticare
4. HRP concentrata
5. Vorticare

L'ordine di aggiunta dei tre (3) reagenti è importantissimo e va rigorosamente rispettato per ottenere densità ottiche riproducibili.

Preparare un volume adeguato di soluzione di lavoro coniugata con HRP in base al numero di strisce utilizzate, come indicato di seguito:

- Ad esempio, per 6 strisce (48 pozzetti): 100 µl di soluzione coniugata concentrata e 50 µl di HRP concentrata per 10 ml di tampone coniugato.
- Per omogeneizzare, fare uso di un miscelatore vortex.
- Fino al relativo utilizzo, mantenere il coniugato di lavoro con HRP a temperatura ambiente ed evitare la luce diretta del sole o fare uso di un flacone di vetro ambrato per la preparazione.
- La preparazione della soluzione coniugata di lavoro con HRP non è stabile e in caso di non utilizzo deve essere eliminata.

Numero di strisce	Volume della soluzione ricostituita (ml)	Volume di 25-OH vitamina D biotinilata (μ l)	Volume di HRP concentrata (μ l)
1	3	30	15
2	5	50	25
3	6	60	30
4	8	80	40
5	9	90	45
6	10	100	50
7	12	120	60
8	14	140	70
9	16	160	80
10	18	180	90
11	20	200	100
12	22	220	110

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Questo kit è adatto ai campioni di siero.

I campioni di siero devono essere conservati ad una temperatura compresa tra 2 e 8 °C.

Se il test non viene eseguito entro 24 ore, il campionamento e la conservazione devono avvenire a – 20 °C.

Evitare di congelare e scongelare ripetutamente.

PROCEDURA DI DOSAGGIO

Note sulla manipolazione

- Non utilizzare il kit o i relativi componenti oltre la data di scadenza.
- Non confondere materiali provenienti da lotti di kit differenti.
- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente prima dell'uso.
- Miscelare completamente tutti i reagenti e i campioni tramite una delicata agitazione o rotazione.
- Eseguire gli standard, controlli e campioni in duplicati. Si consiglia l'allineamento verticale.
- Per preparare la soluzione di lavaggio utilizzare un contenitore di plastica pulito.
- Per evitare la contaminazione crociata, usare una punta di pipetta monouso pulita per l'aggiunta di ciascun reagente e campione.
- Per la dispensazione del substrato TMB e della soluzione bloccante, evitare di usare pipette con parti di metallo.
- Per aumentare la precisione, usare pipette di alta precisione o attrezzature per la pipettatura automatizzata.
- Rispettare i tempi di incubazione.
 - **Per evitare derive, il tempo tra la pipettatura del primo standard e dell'ultimo campione deve essere limitato al tempo indicato nella sezione SPECIFICITÀ (Ritardo).**
- Preparare una curva standard per ogni ciclo; non usare i dati di cicli precedenti.
- Dispensare il substrato TMB entro 15 minuti dal lavaggio della piastra per microdosaggio.
- Durante l'incubazione con il substrato TMB, evitare l'esposizione della piastra per microdosaggio alla luce solare diretta.

Procedura

1. Selezionare il numero richiesto di strisce per piastre per microdosaggio per il ciclo. Le strisce per piastre per microdosaggio inutilizzate devono essere riposte nella busta che va sigillata e conservata a 2 - 8 °C dopo aver aggiunto un agente essiccante.
2. Fissare le strisce nel telaio di supporto.
3. Pipettare 50 µl di standard, controllo e campione nei pozzetti corrispondenti.
4. Pipettare 150 µl di tampone per dosaggio in tutti i pozzetti.
5. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente su un agitatore per piastre (400 giri/min)
6. Dopo l'avvio dell'incubazione, preparare la soluzione di lavoro coniugata con HRP (entro 15 minuti).
7. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
8. Lavare la piastra tre volte:
 - Dispensando 0,35 ml di soluzione di lavaggio in ciascun pozzetto
 - Aspirando il contenuto di ciascun pozzetto
9. Pipettare 200 µl della soluzione di lavoro coniugata con HRP in ciascun pozzetto. Incubare la piastra per microdosaggio per 30 minuti a temperatura ambiente su un agitatore (400 giri/min).
10. Aspirare il liquido da ogni pozzetto.
11. Lavare la piastra tre volte:
 - Dispensando 0,35 ml di soluzione di lavaggio in ciascun pozzetto
 - Aspirando il contenuto di ciascun pozzetto
12. Pipettare 100 µl di substrato TMB in ciascun pozzetto entro 15 minuti dalla fase di lavaggio.
13. Incubare la piastra per microdosaggio per 15 minuti a temperatura ambiente, su un agitatore per piastre (400 giri/min) ed evitare l'esposizione alla luce solare diretta.
14. Pipettare 100 µl di soluzione bloccante in ciascun pozzetto.
15. Leggere le assorbanze a 450 nm (filtro di riferimento 630 nm o 650 nm) entro 1 ora e calcolare i risultati come descritto nella sezione Interpretazione dei risultati.

CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNI

- Se i risultati ottenuti per il controllo L e/o il controllo H non rientrano nell'intervallo specificato sul Certificato di analisi del kit, potranno essere utilizzati solo se è possibile fornire una spiegazione soddisfacente sulla differenza.
- Se lo si desidera, ogni laboratorio può creare i propri pool di campioni di controllo che devono essere conservati congelati in aliquote. I controlli che contengono azide interferiscono con la reazione enzimatica e non possono essere utilizzati.
- I criteri di accettazione per la differenza tra i risultati duplicati dei campioni devono essere basati sulle buone pratiche di laboratorio.
- Si consiglia di eseguire i dosaggi di routine dei controlli come campioni sconosciuti per misurare la variabilità del dosaggio. Le prestazioni del dosaggio vanno monitorate con i grafici del controllo qualità dei controlli.
- È buona pratica controllare visivamente l'adattamento della curva selezionata dal computer.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Calcolo dei risultati

1. Leggere la piastra a 450 nm rispetto a un filtro di riferimento impostato su 650 nm (o 630 nm).
2. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
3. Utilizzando carta grafica lineare-lineare o semi-logaritmica, tracciare i valori OD per ogni punto standard in funzione della concentrazione di 25OH vitamina D di ogni punto standard. Rifiutare i valori palesemente anomali.

4. Per costruire la curva di calibrazione si possono utilizzare anche i metodi computerizzati. Se si esegue un'elaborazione automatica dei risultati, è consigliato un adattamento della curva con funzione logistica a 4 parametri.
5. Tramite interpolazione dei valori del campione OD, determinare le concentrazioni di 25OH vitamina D dei campioni dalla curva di calibrazione.

DATI TIPICI

I seguenti dati hanno solo scopo illustrativo e non devono essere utilizzati al posto della curva di calibrazione in tempo reale.

Standard	Assorbanza (OD)	Risultato (ng/ml)
A	2,66	0
B	2,39	5,3
C	1,83	15
G	1,46	25,7
E	0,81	54,3
F	0,21	133

VALORI ATTESI

È noto che l'alimentazione, l'etnia, la stagione e l'età influiscono sui livelli normali di 25OH vitamina D₃. Ciascun laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di valori in base alla popolazione locale. In articoli pubblicati recentemente, sono stati suggeriti i seguenti intervalli per la classificazione dello stato della 25OH vitamina D:

Livello	ng/ml
Carenza	<10
Insufficienza	10-29
Sufficienza	30-100
Potenziale tossicità	>100

INTERVALLO DI RIFERIMENTO

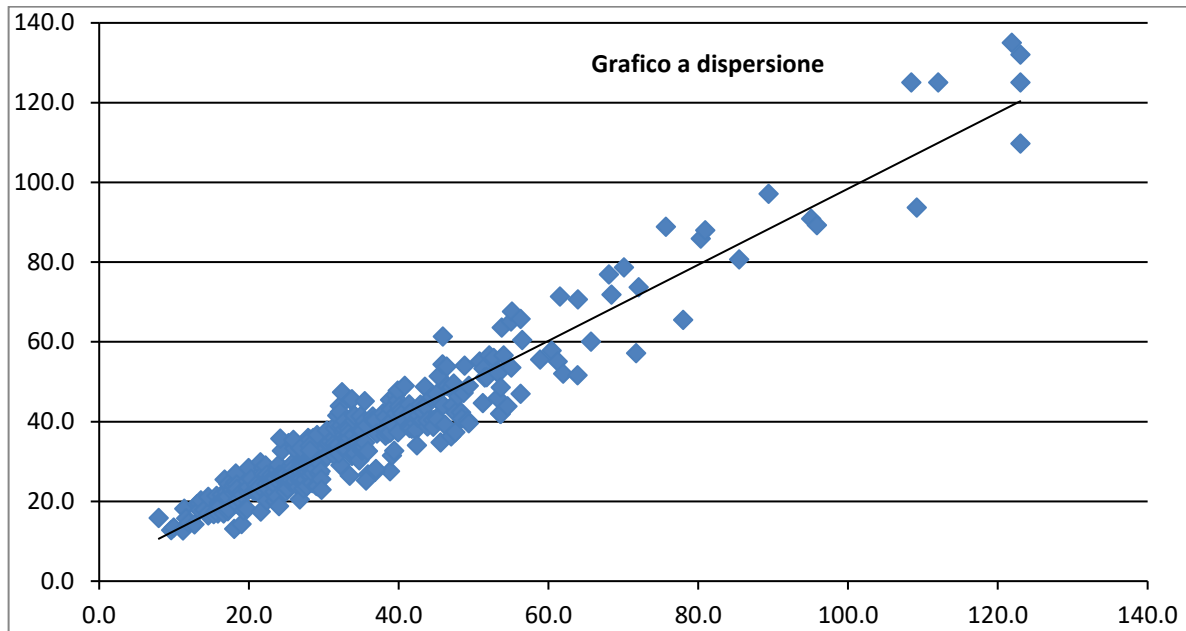
Sono stati determinati degli intervalli di riferimento sulla base di 150 individui apparentemente sani. I campioni di siero dei singoli pazienti utilizzati provenivano da una fonte commerciale certificata e sono stati raccolti presso un centro autorizzato FDA dietro acquisizione di consenso informato. 50 campioni provenivano dagli Stati Uniti settentrionali (Pennsylvania), 50 campioni dagli Stati Uniti centrali (Tennessee) e 50 campioni dagli Stati Uniti meridionali (Florida). I campioni raccolti nei mesi invernali (gennaio-marzo), erano compresi nella fascia di età da 21 a 92 anni e includevano popolazioni di pelle sia chiara che scura. I campioni raccolti provenivano da soggetti che non assumevano integratori di vitamina D, non presentavano anamnesi familiare di patologia paratiroidea o di regolazione del calcio, nessuna anamnesi di patologie correlate a reni, fegato, paratiroide, calcio o chirurgia bariatrica e non assumevano farmaci in grado di alterare l'assorbimento o il catabolismo della vitamina D. I risultati sono riepilogati nella seguente tabella:

Concentrazione	Florida	Tennessee	Pennsylvania	Complessivamente
Conc. massima (ng/ml)	88,6	71,7	54,6	88,6
Conc. minima (ng/ml)	6,1	4,9	5,9	4,9
Conc. mediana (ng/ml)	20,8	17,2	14,3	17,3

È stato usato solo il 95% centrale (2,5% - 97,5%) dei risultati osservati.

CONFRONTO DEI METODI

Le prestazioni del dosaggio immunoenzimatico MicroVue 25-OH Vitamin D EIA è stato determinato effettuando uno studio di correlazione presso tre centri diversi su un totale di 356 campioni. I campioni sono stati analizzati sia con il dosaggio immunoenzimatico MicroVue 25-OH Vitamin D EIA che con un dosaggio immunoenzimatico disponibile in commercio per la 25OH vitamina D. I risultati erano compresi tra 8,0 ng/ml e 123,0 ng/ml, con coefficiente di correlazione tra i due metodi di 0,917, intervallo di confidenza del 95% compreso tra 87,6% e 93,6%, pendenza di 0,954 e intercetta y di 3,05. I risultati sono riepilogati nei seguenti grafici:



PRESTAZIONI DEL TEST

Limitazioni del test

1. Il test costituisce un ausilio per la diagnosi e deve essere utilizzato insieme ai risultati clinici.
2. Le prestazioni di questo dosaggio non sono state determinate per una popolazione pediatrica.
3. I campioni sospettati di contenere concentrazioni superiori al calibratore massimo devono essere sottoposti a dosaggio in diluizione.
4. I campioni emolizzati non devono essere usati.

Limiti di rilevamento

Il limite del bianco (Limit of Blank, LOB), il limite di rilevabilità (Limit of Detection, LOD) e il limite di quantificazione (Limit of Quantitation, LOQ) sono stati determinati in conformità alle linee guida CLSI EP17-A.

- Il limite LOB è stato calcolato misurando più volte il bianco e calcolando il 95° percentile della distribuzione dei valori del test. In base ai calcoli esso è pari a 1,69 ng/ml.
- Il limite LOD è stato calcolato come descritto nelle linee guida. In base ai calcoli esso è pari a 2,81 ng/ml.
- Il limite LOQ è stato calcolato testando 14 volte 5 campioni di valore basso con test diversi.
- In base ai calcoli esso è pari a 4,39 ng/ml con CV del 20%.

SPECIFICITÀ

Reattività crociata

La reattività crociata del dosaggio immunoenzimatico MicroVue 25-OH Vitamin D EIA è stata determinata testando i sieri con reagenti crociati con l'aggiunta e senza l'aggiunta di vitamina D. I risultati sono riepilogati nella tabella seguente:

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

Sostanze interferenti

È stato valutato l'effetto di potenziali sostanze interferenti sui campioni utilizzando il dosaggio immunoenzimatico MicroVue 25-OH Vitamin D EIA. Sono stati testati diversi livelli di emoglobina, bilirubina, trigliceridi, vitamina C, bilirubina coniugata e non coniugata e Zemplar in campioni di siero su campioni con diverse concentrazioni di 25OH vitamina D. I nostri criteri di accettazione prevedevano un'interferenza inferiore al 10%. Le sostanze sottoposte a test non hanno influito sulle prestazioni del dosaggio immunoenzimatico MicroVue 25-OH Vitamin D EIA.

Sostanza	25-OH vitamina D (ng/ml)	Concentrazione di sostanza interferente (mg/dl)	Variazione media %
Emoglobina	7,6	250	-0,6%
		500	
	29,3	250	
		500	
	42,5	250	
		500	
Bilirubina coniugata	6,0	50	-3,4%
		100	
	21,5%	50	
		100	
	38,6	50	
		100	
Bilirubina non coniugata	7,6	50	2,5%
		100	
	29,3	50	
		100	
	42,5	50	
		100	

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

Precisione

La precisione del dosaggio è stata calcolata analizzando i campioni nell'arco di almeno 20 giorni su tre lotti differenti. I risultati sono riepilogati nella tabella seguente:

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

DS: deviazione Standard, CV: coefficiente di variazione

Riproducibilità

La riproducibilità del dosaggio è stata valutata testando tre campioni in duplicato per cinque giorni, due volte al giorno, in tre centri con due tecnici per centro. La media dei risultati è riepilogata nella seguente tabella:

Campione	n	ng/ml		Durante il ciclo	Tra cicli	Tra i giorni	Tra tecnici	Tra centri	Totale
1	57	25,5	DS	0,22	0,61	0,98	1,54	2,21	2,59
			CV	0,3%	0,9%	3,8%	6,0%	8,7%	10,2%
2	57	52,9	DS	0,64	1,57	1,11	2,28	4,29	5,19
			CV	0,9%	2,3%	2,1%	4,3%	8,1%	9,8%
3	57	124,9	DS	1,00	1,74	1,84	3,39	4,98	6,25
			CV	1,4%	2,5%	1,5%	2,7%	4,0%	5,0%

Recupero

Il recupero è stato valutato aggiungendo livelli differenti di 25OH vitamina D ai campioni. I risultati sono riepilogati nella tabella seguente:

Test di recupero	
Aggiunta di 25OH vit D ₃ (ng/ml)	Recupero (%)
0	100
25	96
50	92
Aggiunta di 25OH vit D ₂ (ng/ml)	Recupero (%)
0	100
25	105
50	95

Linearità

Un campione con concentrazione nota da distribuire all'interno dell'intervallo misurabile è stato testato a diluizioni equidistanti, secondo il protocollo di diluizione del campione, per determinare l'intervallo lineare del dosaggio. È stata eseguita un'analisi della regressione lineare. I risultati sono riepilogati nella tabella seguente:

Diluizione del campione		Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)	Pendenza	Intercetta sull'asse y	R ²	Recupero (%)
1/1		101,8	101,8	1,02	-1,91	>0,98	100
1/2	Con il Controllo 1 misurato a 27,1 ng/ml	64,4	62,9				98
1/4		45,7	52,0				114
1/8		36,4	34,8				96
1/16		31,7	33,6				106

L'intervallo lineare del dosaggio è risultato compreso tra 33,6 ng/ml e 101,8 ng/ml.

Ritardo

Il test del ritardo tra l'ultimo standard e i risultati di dispensazione del campione è mostrato nella tabella seguente.

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

I risultati del dosaggio rimangono accurati anche quando il tampone del dosaggio viene dispensato 10 e 20 minuti dopo l'aggiunta dello standard nei pozzetti rivestiti.

ASSISTENZA

Per effettuare un ordine o per richiedere assistenza tecnica, contattare un rappresentante Quidel al numero 800.874.1517 (negli Stati Uniti) o 858.552.1100 (al di fuori degli Stati Uniti), dal lunedì al venerdì, tra le 8:00 e le 17:00 orario della costa orientale degli Stati Uniti. Gli ordini possono anche essere effettuati via fax al numero +1 740.592.9820. Per l'assistenza via e-mail, scrivere all'indirizzo customerservice@quidel.com o technicalsupport@quidel.com.

Per servizi al di fuori degli Stati Uniti, contattare il distributore di zona. Per ulteriori informazioni su Quidel, i nostri prodotti e i nostri distributori, consultare il sito web quidel.com.

BIBLIOGRAFIA

- Zerwekh, J.E. Blood biomarkers of Vitamin D status. *Am. J. Clin. Nutr.* 2008; 87(suppl):1087S-1091S.
- Holick, M.F. Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.* 2006; 116:2062-2072.
- Heaney, R.P. Vitamin D: how much do we need and how much is too much. *Osteoporos. Int.* 2000; 11(7) 553-555.
- Dawson-Hughes B., Heaney R.P., Holick M.F., Lips P., Meunier P.J. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos. Int.*, 1997; 7:439-443.
- Bischoff-Ferrari, H.A., Giovannucci, E., Willett, W.C., Dietrich, T., Dawson-Hughes, B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84(1):18-28.
- Holick, M.F. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 80(6 suppl):1678S-1688S.
- Heaney, R.P. Defining deficiency of vitamin D. In: *Clinical Laboratory International*. 2010; 34:16-19.
- Holick, M.F. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 2007; 357(3):266-281.
- Taha, N.M., Vieth, R. The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin

D nutritional status. In: *Clinical Laboratory International*. 2010; 34:28-30.

10. Holick, M.F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann. Epidemiol.*, 2009;19:73-78.
11. National Osteoporosis Foundation Prevention – Vitamin D.
<http://www.nof.org/aboutosteoporosis/prevention/vitamind>
12. EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD pubblicato dal Clinical and Laboratory Standards Institute.

REF 8046 – MicroVue 25-OH Vitamin D EIA Kit

IVD



EC REP

MDSS GmbH
Schiffgraben 41
30175 Hannover,
Germania



Quidel Corporation
2005 East State Street, Suite 100
Athens, OH 45701 USA
quidel.com

PI8046002IT00 (11/19)

Modifica di revisione:	Elemento
PI8046000IT00	Rilascio iniziale per Quidel Corporation.
PI8046001IT00	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aggiunta di testo per chiarire le fasi procedurali per la preparazione della "Soluzione di lavoro coniugata con HRP". 2. Aggiunta del volume utilizzato della soluzione di ricostituzione (Tampone coniugato Codice n. 411913) alla tabella per la preparazione della soluzione di lavoro coniugata con HPR. 3. Aggiornamento della sezione "Avvertenze e precauzioni".
PI8046002IT00	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ottimizzazione della formulazione dello Standard zero A (CAL A). 2. Modifica della diluizione dei campioni dall'uso dello Standard A (CAL A) al Controllo 1 (Codice n. 4219716) oppure a un altro campione di siero con concentrazione nota. 3. Modifica dell'intervallo delle prestazioni lineari da 7,7 - 122,9 ng/ml a 33,6 - 101,8 ng/ml. 4. Ottimizzazione della concentrazione di coniugato con conseguente modifica del volume da 0,4 ml a 0,3 ml. 5. Modifica della velocità di agitazione della piastra da 300 - 700 giri/min a 400 giri/min per tutte le fasi di agitazione della piastra. 6. Modifica del volume per il "lavaggio" della piastra da 0,4 ml a 0,35 ml, per tutte le fasi di lavaggio. 7. Aggiornamento dell'etichettatura dei componenti per corrispondenza alle variazioni di volume per quanto segue: <ol style="list-style-type: none"> a. CAL A-F (Standard A-F), ricostituzione (RCNS) 1 ml b. Codice 4119703 - 25-OH vitamina D biotinilata (coniugato concentrato), 0,3 ml c. Codice 4219716 - Controllo 1, ricostituzione (RCNS) 1 ml d. Codice 4219717 - Controllo 2, ricostituzione (RCNS) 1 ml

GLOSSARIO

REF

N. di catalogo



Marchio di conformità CE

EC REP

Rappresentante autorizzato
nella Comunità Europea

LOT

Codice lotto



Usare entro



Fabbricante



Limiti di temperatura



Uso previsto

Rx ONLY

Soggetto a prescrizione medica



Per l'uso, consultare le istruzioni
riportate nell'etichetta elettronica

IVD

Per uso diagnostico *in vitro*



Contiene materiale sufficiente per 96 determinazioni

CONT

Contenuto/Contiene

CONTROL

Controllo
