



25 OH VITAMINA D TOTAL INSTRUÇÕES DE USO

MÉTODO:

Enzimmunoensaio colorimétrico (ELISA).

FINALIDADE:

Sistema para determinação quantitativa de 25-OH Vitamina D Total (25-OH Vitamina D₃ + D₂) em amostras de soro por enzimmunoensaio colorimétrico (ELISA). Uso profissional. Somente para diagnóstico "in vitro".

FUNDAMENTO

A Vitamina D da amostra é deslocada de sua proteína transportadora e capturada por anticorpo específico imobilizado na microplaca. Após lavagens, a adição de um derivado biotinilado da Vitamina D leva à ocupação de sítios livres do anticorpo imobilizado. O derivado biotinilado é reconhecido por um complexo de estreptavidina-peroxidase que desenvolve cor com um substrato específico (TMB/H₂O₂). A cor formada é inversamente proporcional à concentração de Vitamina D na amostra.

SIGNIFICADO CLÍNICO

A Vitamina D é um termo genérico que designa os metabólitos Vitamina D₃ e D₂, respectivamente colecalciferol e ergocalciferol. Ambos são produzidos a partir de precursor na pele de seres humanos, sob a ação de raios ultravioletas. No fígado, a Vitamina D₃ é convertida em 25-OH Vitamina D₃, que é o principal metabólico circulante. A 25-OH Vitamina D Total representa o conjunto da 25-OH Vitamina D₃+D₂ e são seus níveis séricos que definem o status de suficiência ou não de Vitamina D no organismo. O produto 25 OH Vitamina D Ampligenix dosa a 25 OH Vitamina D Total com elevada sensibilidade, apenas 10 µl de amostra, apresentando excelente correlação com a detecção quimioluminescente e HPLC. É facilmente adaptável e todos os analisadores automáticos que trabalham com o sistema de micropipetas.

IDENTIFICAÇÃO E ARMAZENAMENTO DOS REAGENTES:

R1. 1 placa de poliestireno com 96 microcavidades descartáveis revestida com anticorpo monoclonal anti Vitamina D₃. Manter a placa acondicionada dentro de embalagem aluminizada contendo dessecante. Conservar entre 2 a 8 °C.

R2. Calibrador 1: Frasco com 1 ml de solução isenta de 25-OH Vitamina D (0 ng/ml), contendo tampão pH 7,2 e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. Conservar entre 2 a 8 °C.

R3. Calibrador 2: Frascos contendo 0,2 ml cada de solução de 25-OH Vitamina D₃ em matriz de soro humano e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. As concentrações dos calibradores estão expressas nos rótulos de cada frasco. Conservar entre 2 a 8 °C.

R4. Calibrador 3: Frascos contendo 0,2 ml cada de solução de 25-OH Vitamina D₃ em matriz de soro humano e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. As concentrações dos calibradores estão expressas nos rótulos de cada frasco. Conservar entre 2 a 8 °C.

R5. Calibrador 4: Frascos contendo 0,2 ml cada de solução de 25-OH Vitamina D₃ em matriz de soro humano e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. As concentrações dos calibradores estão expressas nos rótulos de cada frasco. Conservar entre 2 a 8 °C.

R6. Calibrador 5: Frascos contendo 0,2 ml cada de solução de 25-OH Vitamina D₃ em matriz de soro humano e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. As concentrações dos calibradores estão expressas nos rótulos de cada frasco. Conservar entre 2 a 8 °C.

R7. Calibrador 6: Frascos contendo 0,2 ml cada de solução de 25-OH Vitamina D₃ em matriz de soro humano e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. As concentrações dos calibradores estão expressas nos rótulos de cada frasco. Conservar entre 2 a 8 °C.

R8. Controle 1: Frascos contendo 0,2 ml de solução de solução 25-OH Vitamina D₃ em matriz de soro humano e azida sódica 15 mmol/L como

preservativo. A concentração do Controle 1 está expressa no rótulo do frasco. Conservar entre 2 a 8 °C.

R9. Controle 2: Frasco contendo 0,2 ml de solução de 25-OH Vitamina D₃ em matriz de soro humano e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. A concentração do Controle 2 está expressa no rótulo do frasco. Conservar entre 2 a 8 °C.

R10. Solução de Deslocamento: 01 frasco com 12 ml contendo tampão pH 7,2, detergente aniônico e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. Pronto para uso. Conservar entre 2 a 8 °C.

R11. VD-Bio: 01 microtubo contendo 0,16 ml de solução concentrada de derivado biotinilado da 25-OH Vitamina D₃ em etanol anidro. ATENÇÃO: manter aberto somente o tempo necessário para a pipetagem. Conservar entre 2 a 8 °C.

R12. Diluente VD-Bio: 01 frasco contendo 16 ml de tampão pH 7,2, detergente neutro e azida sódica 15 mmol/L como preservativo. Conservar entre 2 a 8 °C.

R13. Conjugado Concentrado: 01 frasco contendo 0,150 ml de solução concentrada de conjugado Estreptavidina-Peroxidase em tampão pH 7,4 e bromonitrodioxano 0,02% como preservativo. Conservar entre 2 a 8 °C.

R14. Diluente de Conjugado: 01 frasco com 12 ml de tampão pH 7,4 detergente neutro e bromonitrodioxano 0,02% como preservativo. Conservar entre 2 a 8 °C.

R15. Substrato: 01 frasco com 12,0 ml de solução de tetrametilbenzidina em tampão pH 4,2 e bromonitrodioxano 0,02% como preservativo. Manter ao abrigo da luz. Conservar entre 2 a 8 °C.

R16. Solução de Bloqueio: 01 frasco contendo 12 ml de ácido sulfúrico 0,5 M. Conservar entre 2 a 30 °C. Atenção: Reagente corrosivo.

R17. Solução de Lavagem 10x: 01 frasco contendo 100 ml de solução tamponada em pH 7,2, detergente aniônico e bromonitrodioxano 0,02% como preservativo. Conservar entre 2 a 30 °C.

CUIDADOS NO ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE DOS REAGENTES

1. As datas de fabricação e validade aparecem no rótulo de embalagem.
2. Não usar reagentes cujas datas de validade tenham expirado.
3. Os reagentes devem ser mantidos sob refrigeração, na faixa de 2 a 8 °C. Não congelar.
4. Os reagentes devem permanecer fora do refrigerador apenas o tempo necessário para as dosagens.
5. Não exponha os reagentes, especialmente o substrato, à luz forte ou vapores de hipoclorito durante o armazenamento ou etapas de incubação.
6. A embalagem aluminizada da micropipeta deve permanecer selada até atingir a temperatura ambiente, antes de sua abertura para a retirada do número necessário de tiras.
7. As tiras remanescentes não utilizadas devem ser guardadas na embalagem, selada e com o dessecante. Pressione firmemente o lacre para selar a embalagem completamente e armazene imediatamente de 2 a 8 °C.
8. Antes de serem abertos, os reagentes podem ser transportados na temperatura ambiente (15 a 25 °C), até um limite de 72 horas.
9. Os reagentes são estáveis até a data de expiração do kit, desde que conservados na temperatura indicada.
10. Evitar exposição dos reagentes ao calor, luz forte direta, durante armazenagem ou uso.

PRECAUÇÕES E CUIDADOS ESPECIAIS:

1. Somente para uso diagnóstico in vitro.
2. Todos os materiais biológicos e reagentes devem ser processados como sendo potencialmente contaminante. Usar luvas descartáveis quando manusear reagentes e amostras biológicas.
3. Usar ponteiros descartáveis separadas para cada amostra, calibradores e controles. Não misturar ou trocar diferentes lotes de reagentes.
4. O reagente Solução de Bloqueio é cáustico e corrosivo. Em caso de contato, lavar imediatamente o local afetado com água em profusão. Em caso de ingestão acidental, procurar auxílio médico imediato. Não provocar vômitos.
5. As leitoras de placas ou mesmo equipamentos automatizados devem ficar livres de contaminação microbiana, serem calibrados corretamente e receberem manutenção de acordo com as instruções do fabricante.
6. Não dispensar em coletores de lixo comuns ou nas redes de água e esgoto. Lavar sempre as mãos após trabalhar com material potencialmente infectante.
7. As amostras devem ser descartadas após o uso em recipientes específicos, segundo as normas da Secretaria de Vigilância Sanitária

local.

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS:

Pipetas automáticas de precisão;
Ponteiras descartáveis;
Água destilada ou deionizada;
Agitador de tubos tipo Vórtex;
Cronômetro;
Vidraria;
Papel absorvente ou papel toalha;
Leitora de microplacas com filtros em 450 e 630 nm;
Lavadora automática de microplacas (opcional).

AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Soro.

As amostras não devem ser congeladas e descongeladas repetidamente. A Vitamina D na amostra é estável por 3 dias entre 2 a 8 °C e/ou 6 meses congelada a -20 °C. amostras congeladas devem ser misturadas por inversão várias vezes após seu descongelamento. Todas as amostras devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Tratá-las segundo as normas de biossegurança locais.

INTERFERENTES

Hemoglobina até 250 mg/dl, triglicérides até 1200 mg/dl e bilirrubina até 30 mg/dl, não apresentam interferências significativas.

PROCEDIMENTO

Todos os reagentes deverão estar em temperatura ambiente (15 a 25 °C) antes do uso.

Preparo do VD-Bio de uso:

Em um tubo de ensaio limpo e seco, diluir 0,01 ml (1 parte) do VD-Bio (11) em 1,0 ml (100 partes) do diluente VD-Bio (12). Homogeneizar bem. Esse volume é suficiente para realizar 8 testes. O reagente assim preparado deve ser utilizado apenas no dia da preparação. Por se tratar de uma solução alcoólica, pipetar o VD-Bio com cuidado, fazendo ambiente prévio na ponteira. Caso seja necessário preparar volumes maiores, prepare sempre na proporção de 1 parte do VD-Bio (11) + 100 partes do diluente VD-Bio (12). Homogeneizar bem.

Preparo da Solução de Lavagem de Uso:

Diluir a Solução de Lavagem 10x (17) na proporção 1:10 e transfira o conteúdo do frasco contendo a solução para a proveta graduada e complete com água destilada ou deionizada até 1000 ml. Quantidades menores devem ser preparadas de acordo com o volume desejado. Esta solução preparada (diluída) é estável por 4 meses quando armazenada de 2 a 8 °C. Homogeneizar antes do uso. *Nota: SE houver cristais na solução concentrada, aquecê-la a 37 °C até sua completa dissolução antes de usar.*

Preparo do Conjugado STV-HRP de uso:

Transferir 120 µl do Conjugado STV-HRP concentrado (13) ao frasco contendo o Diluente de Conjugado (14) Homogeneizar bem por inversão. O reagente assim preparado é estável por 60 dias entre 2 a 8 °C. caso seja necessário preparar volumes menores, prepare sempre na proporção de 1 parte do Conjugado Concentrado (13) + 100 partes do Diluente do Conjugado (14) em um frasco âmbar e homogeneizar bem.

Procedimento do teste:

Após o preparo dos reagentes, proceder como descrito abaixo:
Destacar o número de microcavidades necessárias para os testes, incluindo Amostras, Calibradores e Controles, coloca-las no suporte apropriado e proceder como a seguir:
1. Adicionar 10 µl dos Calibradores, Controles e Amostras nas microcavidades selecionadas;
2. Adicionar 100 µl da Solução de Deslocamento e homogeneizar através de movimentos circulares;
3. Incubar a 37 °C durante 120 minutos.
4. Desprezar o conteúdo dos poços e lavá-los 4 vezes com solução de lavagem previamente preparada. Invertê-los em papel absorvente, batendo para retirar o excesso de líquido.
Atenção: Para todas as etapas de lavagens a seguir, manter o mesmo rigor analítico, pois lavagens insuficientes aumentam significativamente a imprecisão do ensaio.
5. Adicionar 100 µl do VD-Bio de uso a cada um dos poços;
6. Incubar a 37 °C durante 30 minutos;
7. Desprezar o conteúdo dos poços e lavá-los 4 vezes com solução e lavagem previamente preparada. Invertê-los em papel absorvente, batendo para retirar o excesso de líquido;
8. Adicionar 100 µl do Conjugado STV-HRP de uso a todos os poços.
9. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.

10. Desprezar o conteúdo dos poços e lavá-los 4 vezes com solução de lavagem previamente preparada. Invertê-los em papel absorvente, batendo para retirar o excesso de líquido.
11. Adicionar 100 µl do Substrato a todos os poços.
12. Incubar à 37 °C durante 20 minutos.
13. Adicionar 100 µl de Solução de Bloqueio a todos os poços. Homogeneizar por 30 segundos.
14. Efetuar as leituras espectrofotométricas em 450 nm (filtro secundário em 630 nm) em leitora apropriada, no máximo 30 minutos após a adição da Solução de Bloqueio.

CÁLCULOS

PROCEDIMENTO 1 - CAIBRAÇÃO EM DOIS PONTOS

O sistema utiliza uma calibração de dois pontos, desenvolvida especificamente para a Vitamina D. As absorbâncias dos calibradores são processadas em software específico. Nesse caso, utilizar os calibradores 0 (zero) e 6. **ATENÇÃO:** No programa de cálculos, estes calibradores são referidos como calibradores 1 e 2 respectivamente.

Nota: Amostras elevadas, ou seja, aquelas com absorbâncias menores do que as do calibrador 6, não serão calculadas e o programa indicará como ponto fora da curva.

Instalação do Programa de Cálculo

Instalar o programa de cálculo através do link:
<https://www.vidabiotecnologia.com.br/produtos/ELISA/250HVitaminaDTotalCalculo>.

As absorbâncias dos calibradores, controles e amostras obtidas através de sistemas manuais de leitura (leitoras de ELISA convencionais), deverão ser digitadas diretamente na planilha do programa de cálculo, gerando imediatamente os resultados. Quando as determinações dos calibradores e/ou controles forem realizadas em duplicata, o programa processará normalmente as médias dos valores de absorbâncias. Caso as determinações dos calibradores não tenham sido realizadas em duplicata, bastará digitar o valor da absorbância encontrada, ignorando o espaço destinado para a duplicata.

Para os sistemas de automação, as absorbâncias geradas na tela do equipamento deverão simplesmente serem copiadas e coladas na planilha do programa de cálculo. Quando as determinações dos calibradores forem realizadas em duplicata, o programa processará normalmente as médias dos valores de absorbâncias. Caso as determinações dos calibradores/controles não tenham sido realizadas em duplicata, bastará digitar o valor da absorbância encontrada, ignorando o espaço destinado para a duplicata.

PROCEDIMENTO 2 - CALIBRAÇÃO COM SEIS PONTOS

Nesse caso utilizar seis calibradores do conjunto, utilizando-se preferencialmente para os cálculos, a curva LOGIT DE 4 PARÂMETROS, sendo o EIXO Y=Log(1000*Abs), e o eixo X=Log(Conc). Em equipamentos que não disponham deste modo de cálculo, utilizar o modo de regressão linear simples.

VALORES DE REFERÊNCIA

A Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e a Sociedade Brasileira de Endocrinologia propuseram as seguintes faixas de valores para a população brasileira:

Até 10 ng/ml: Níveis de deficiência.

Entre 10 e 20 ng/ml: Níveis de insuficiência.

Entre 20 e 30 ng/ml: Níveis de suficiência para pacientes fora dos grupos de risco.

Entre 30 e 60 ng/ml: Níveis de suficiência para pacientes dos grupos de risco (idosos, gestantes, etc.).

Acima de 100 ng/ml: Níveis com toxicidade potencial.

FAIXA DINÂMICA

A faixa dinâmica do método situa-se entre 3,9 ng/ml e o valor do calibrador 6. **ATENÇÃO:** Para valores acima daqueles do calibrador 6, diluir a amostra 1:5 como o calibrador 1 (0,05 ml de amostra + 0,02 ml de calibrador 1). Multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

DADOS ESTATÍSTICOS DE DESEMPENHO DO TESTE

Sensibilidade Analítica

O limite de detecção do método é igual a 3,9 ng/ml.

Exatidão:

A comparação com produto comercial validado, que utiliza o método do Imunoensaio quimiofluorescente, demonstrou um coeficiente de correlação r, igual a 0,96 a partir da análise de amostras de soro. A equação de regressão obtida foi: $y = 1,0029x - 0,4953$. Utilizando a equação de regressão, o Erro Sistemático (bias) foi igual a 4%, 1,3% e 0,3% para os níveis de decisão clínica com concentração de 12 ng/ml, 23 ng/ml e 80 ng/ml, respectivamente.

Precisão da Medição

Repetibilidade

A imprecisão intra-ensaio foi verificada através da análise de 20 replicatas em três níveis, sendo que os valores de imprecisão de cada nível foram obtidos em corrida única no mesmo dia.

	NÍVEL 1	NÍVEL 2	NÍVEL 3
Média (ng/ml)	13,8	27,9	56,4
DP	1,2	2,6	3,4
CV (%)	8,6	9,2	6,1

Reprodutibilidade

A imprecisão inter ensaio foi verificada através da análise de 40 replicatas em três níveis, ensaiadas em corridas diárias, durante 10 dias.

	NÍVEL 1	NÍVEL 2	NÍVEL 3
Média (ng/ml)	14,3	34,4	78,4
DP	1,8	2,5	2,4
CV (%)	12,3	7,1	3,1

CONTROLE DE QUALIDADE

As boas práticas laboratoriais requerem que os controles sejam analisados em cada calibração. Um número significativo de controles deve ser testado para estabelecer os valores médios e os limites aceitáveis para o seu desempenho.

APRESENTAÇÃO DO KIT

CÓDIGO	REAGENTE	VOLUME	NÚMERO DE DETERMINAÇÕES
2000/200-096	R1 - Placa de Polietileno	1 x 96	96
	R2 - Calibrador 1	1 mL	
	R3 - Calibrador 2	0,2 mL	
	R4 - Calibrador 3	0,2 mL	
	R5 - Calibrador 4	0,2 mL	
	R6 - Calibrador 5	0,2 mL	
	R7 - Calibrador 6	0,2 mL	
	R8 - Controle 1	0,2 mL	
	R9 - Controle 2	0,2 mL	
	R10 - Solução de Deslocamento	12 mL	
	R11 - VD-Bio	0,16 mL	
	R12 - Diluente VD-Bio	16 mL	
	R13 - Conjugado Concentrado	0,150 mL	
	R14 - Diluente de Concentrado	12,0 mL	
	R15 - Substrato	12,0 mL	
	R16 - Solução de Bloqueio	12,0 mL	
	R17 - Solução de Lavagem 10x	100 mL	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Holick M.F. (2009) Vitamin D Status: Measurement, Interpretation, and Clinical Application. Ann. Epidemiol., 19:73-78.
2. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. Osteoporos Int 1997; 7:439-43.
3. Parfitt AM, Gallagher JC, Heaney RP, Johnston CC, Neer R, Whedon GD. Vitamin D and bone health in the elderly. Am J Clin Nutr 1982; 36:1014- 31.
4. Gannage-Yared MH, Chemali R, Yaacoub N, Halaby G. Hypovitaminosis D in a sunny country: relation to lifestyle and bone markers. J Bone Miner Res 2000; 15:1856- 62.
5. Zerwekh J.E. (2008) Blood biomarkers of Vitamin D status. Am. J. Clin. Nutr. 7(suppl):1087S-91S.
6. Holick M.F (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. Am. J. Clin. Nutr. 80:1678S-1688S.
7. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina laboratorial (SBPC/ML). Coleta e preparo de amostra biológica. Barueri, SP: Manole: Minha Editora, 2014
8. EP17-A Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline, STANDARD published by Clinical and Laboratory Standards Institute.

INFORMAÇÕES AO CONSUMIDOR:

Nº DO LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO E DATA DE VALIDADE, VIDE RÓTULO DO PRODUTO.

FABRICADO POR: Ampligenix Indústria e Comércio de Produtos Biotecnológicos Ltda.

CNPJ 08.698.724/0001-62

Av. José Cândido da Silveira, 2100 - Horto - CEP 31035-536 - Belo

Horizonte - Minas Gerais - Brasil www.ampligenix.com.br

SAC: assessoria@ampligenix.com.br

Responsável Técnico: Alessandra C. G. Ruiz CRBIO4 - 023904/04-D

Reg. M.S.: 82031010001

DISTRIBUÍDO POR: VIDA Biotecnologia LTDA

CNPJ: 11.308.834/0001-85

Avenida José Cândido da Silveira 2100 - Horto Florestal - CEP 31035-536;

Belo Horizonte. Minas Gerais -

Departamento de Serviços Associados | (31)34663351;

dsa@vidabiotecnologia.com.br

Rev.: 05/2021

SIGNIFICADO DOS SÍMBOLOS UTILIZADOS NO RÓTULO DO PRODUTO	
	Conteúdo suficiente para <n> testes
	Data limite de utilização do produto (mm/aaaa)
CAL	Material Calibrador
	Limite de temperatura (conservar a)
	Consultar instruções de uso
REF	Código do Produto
IVD	Produto para Diagnóstico In Vitro
LYOPH	Liofilizado
	Corrosivo
	Risco Biológico
	Tóxico
R	Reagente
	Data de Fabricação (dd/mm/aaaa)
LOT	Número de Lote