

# 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D ELISA Kit

**Zur *in vitro* Bestimmung von 1,25-(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D in Plasma und Serum**

**For the *in vitro* determination of 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D in plasma and serum**

EU: IVD / CE

US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

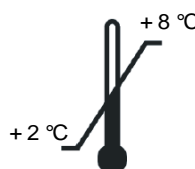
Gültig ab/valid from 02.09.2014



K 2112



48



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim  
Tel.: ++49 6251 70190-0  
Fax: ++ 49 6251 849430  
e.mail: [Info@immundiagnostik.com](mailto:Info@immundiagnostik.com)  
[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer  
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

[www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)

## 1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D in Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

## 2. EINLEITUNG

Vitamin D wird entweder in der Haut (unter Einfluss von UV-Licht) gebildet oder aus der Nahrung aufgenommen. In der Leber entsteht die Speicherform des Vitamin D, das 25-Hydroxy-Vitamin D. In der Niere wird in einem 2. Hydroxylierungsschritt die Hormonform des Vitamin D, das 1,25-Dihydroxy-Vitamin D (D-Hormon) gebildet. Das dafür verantwortliche Enzym, die 1 $\alpha$ -Hydroxylase der Niere, unterliegt einer strengen Kontrolle durch Hormone (insbesondere Parathormon) und wird in seiner Aktivität auch durch die Serumkonzentrationen von Calcium und Phosphat beeinflusst.

Die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D richtet sich also normalerweise nach den Erfordernissen des Stoffwechsels. Abweichungen der 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration von der Norm müssen also immer im Kontext mit den übrigen Parametern des Calciumstoffwechsels interpretiert werden. Erst bei ausgeprägtem Vitamin D-Mangel wird auch die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D absinken. Zur Diagnostik des Vitamin D-Mangels sollte man deshalb den Vorläufermetabolit, das 25-Hydroxy-Vitamin D messen. Ursachen für einen unphysiologischen Mangel an 1,25-Dihydroxy-Vitamin D können jedoch Metabolisierungsstörungen entweder aufgrund genetischer Defekte der 1 $\alpha$ -Hydroxylase (selten) oder aufgrund von Nierenfunktionsstörungen (häufiger) auftreten. Bereits bei leicht eingeschränkter Nierenfunktion kommt es zu einem Abfall der 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration.

Da 1,25-Dihydroxy-Vitamin D wichtige Funktionen im Calciumstoffwechsel hat und insbesondere auch die Parathormonsekretion in den Nebenschilddrüsen supprimiert, kommt es mit zunehmender Niereninsuffizienz zur Ausbildung der renalen Osteopathie, die durch Mineralisierungsstörungen (Osteomalazie) und fibröse Veränderungen (Osteitis fibrosa) gekennzeichnet ist.

Die Behandlung der renalen Osteopathie besteht in der Gabe von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D (Calcitriol) oder des Prohormons 1 $\alpha$ -Hydroxy-Vitamin D. Erniedrigte oder relativ niedrige 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Spiegel findet man bei renalen Tubulusfunktionsstörungen (z.B. Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom). Eine unphysiologische Überproduktion von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D tritt bei granulomatösen Systemerkrankungen (z.B. Sarkoidose) auf, wo eine extrarenale 1,25-Dihydroxy-Vitamin D Synthese stattfindet. Diese kann zur Hypercalciämie führen. Auch bei der idiopathischen Hypercalciurie findet man relativ hohe 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Spiegel. Erhöhte 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentrationen wurden des Weiteren in folgenden Fällen ermittelt: bei Störungen des Vitamin D-Rezeptors (selten), bei calciumarmer Ernährung, sowie bei Parathormonüberschuß (primärer Hyperparathyreoidismus) und bei manchen Tumorarten (infolge Sekretion von parathormonähnlichem Peptid, PTHrP).

**Indikationen:**

- Nierenfunktionsstörungen  
Chronische Niereninsuffizienz  
Hämodialyse nach Nierentransplantation
- Renale Osteopathie
- Osteomalazie bei v.a. gestörten Vitamin D-Metabolismus
- Nierentubulusfunktionsstörungen (Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom)
- Überwachung einer Therapie mit aktiven Vitamin D-Metaboliten
- Idiopathische Hypercalciurie
- Hypercalciämie

**3. INHALT DER TESTPACKUNG**

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 2112MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 2112WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 2112E	ETHANOL	Ethanol, gebrauchsfertig	1.5 ml
K 2112TP	TRIS-HCL	Tris-HCL Puffer, gebrauchsfertig	30 ml
K 2112A1	AB	Detektionsantikörper, anti-1,25-(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D, gebrauchsfertig	25 ml
K 2112ST	STD	Standard incl. NSB, gebrauchsfertig (Bereich siehe Spezifikation oder Etikett)	7 x 2.5 ml
K 2112KO	CTRL	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 2.5 ml
K 2112K	CONJ	Konjugat, polyklonaler peroxidase- markierter Antikörper, gebrauchsfertig	24 ml
K 2112TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 2112AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml
K 2112FOL	FOL	Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	2 x 1

#### 4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- 48 Chromabond Säulen (Artikelnr.: Se2112)
- 48 Silica Kartuschen (Festphasen-Extraktionskartuschen, Artikelnr.: Sb2221)
- Diisopropylether (p.A.) 99.0 %
- Isopropanol (p.A.) 99.9 %
- n-Hexan (p.A.) 98.3 %
- Methanol (p.A.) 99.9 %
- 75 x 12 mm Reagenzgefäße aus Glas (kein Plastik)
- Extraktionsständereinheit (Artikelnr.: K2221sv), bestehend aus drei Kunststoffständern und einem Stickstoffverteiler
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

## 5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

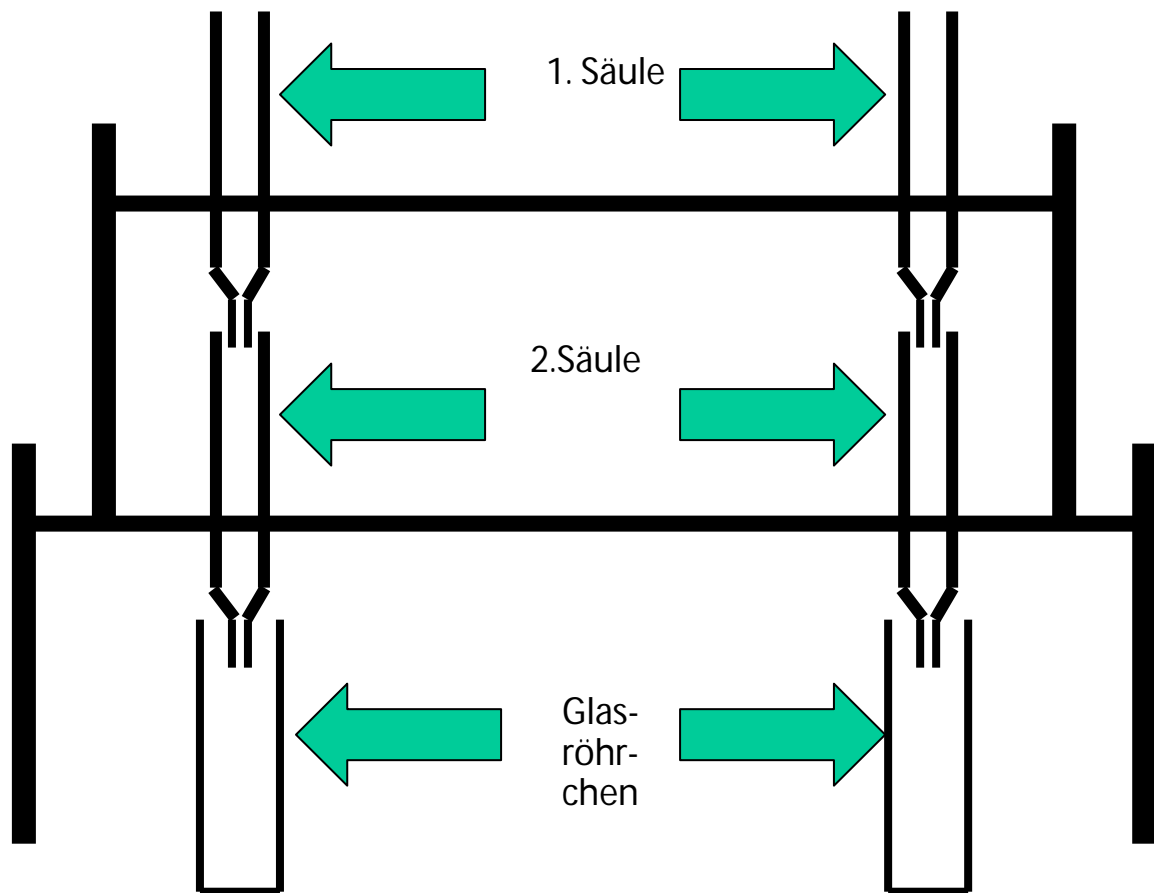
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 2 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37°C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8°C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Bei der **Herstellung der Lösemittelgemische** muss auf Volumenkontraktion geachtet werden. 1. Lösemittel einzeln in separaten Messzylindern abmessen und erst dann in eine Lagerungsflasche mischen. 2. Sowohl Lagerungsflasche als auch Messzylinder aus Glas benutzen, Plastik ist nicht geeignet.
- **Achtung: Mikrotiterstreifen:** Nach Öffnen des verschweißten Aluminiumbeutels müssen nicht verwendete Streifen mit Klebefolie überzogen und mit Trockenmittel im wieder verschlossenen Aluminiumbeutel bei 2-8°C gelagert werden.
- Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Mikrotiterplatten zu verwenden, auch nicht wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Schon geöffnete Mikrotiterplatten unterliegen anderen Bedingungen als verschlossene.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8°C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

## 6. PROBENVORBEREITUNG

### Plasma/Serum Proben

1. Frisch abgenommenes Blut sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Vitamin D ist eine stabile Substanz. Die Proben können deshalb in der Regel bei Raumtemperatur gelagert werden. *Wir empfehlen aber*, das Serum bei 2-8°C zu lagern. Sollte innerhalb von 72 Stunden keine Messung erfolgen, empfiehlt es sich, die Proben bei -20°C einzufrieren. Ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist unter allen Umständen zu vermeiden.
2. Die Serumproben können bei 2-8°C (z.B. mit Coolpacks) transportiert werden und sind so bis zu 3 Tage haltbar. Erfolgt danach keine Messung, empfiehlt sich die Proben bei -20°C einzufrieren.
3. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden. Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.
4. Wir empfehlen ein Probenvolumen von 1000 µl. Das Probenvolumen sollte jedoch nicht kleiner als 500 µl gewählt werden (Kapazität der Säulen ist 1000 µl). Wird ein Probenvolumen von 500 µl gewählt, muss die Säule mit 500 µl Tris-HCL vorgepuffert werden. Hierzu immer zuerst die 500 µl Tris-HCL in die Säule pipettieren, komplett einziehen lassen und danach die 500 µl Probe pipettieren. Das Ergebnis wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.



*Extraktion der Proben*

- Der Extraktionsständer besteht aus 3 Plexiglas-Untereinheiten, die übereinander gestellt werden.
- In den oberen Teil werden die Chromabond-Säulen (Ständereinheit I) und in den unteren Teil (Ständereinheit II) die Silica Kartuschen (regenerierbar) eingesetzt.
- Für die Extraktion und das Waschen wird die Extraktionseinheit (I und II) in eine Auffangschale gestellt. Nach dem Extraktionsschritt (Ether) werden die Chromabond-Säulen entfernt (Ständereinheit I).
- Für den Elutionsschritt wird die Ständereinheit III mit den Reagenzgläsern (kein Plastik) unter die Ständereinheit II gestellt.

## 7. TESTDURCHFÜHRUNG

### *Testprinzip*

Der Test basiert auf einer kompetitiven Enzyme-Immuno-Assay (EIA) Technik. Es wird ein ausgewählter monoklonaler Antikörper, der 1,25-Dihydroxy-Vitamin D erkennt, verwendet.

Standards, NSB (nicht spezifische Bindung), Kontrollen und Patientenseren, die auf 1,25-Dihydroxy-Vitamin D zu untersuchen sind, werden nach dem Extraktionsschritt mit dem Detektionsantikörper versetzt. In einer Vorinkubation bindet das 1,25-Dihydroxy-Vitamin D an den Antikörper. Das Vorinkubat wird in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit 1,25-Dihydroxy-Vitamin D beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt kompetitiert das 1,25-Dihydroxy-Vitamin D aus der Probe mit dem auf der Platte gekoppeltem 1,25-Dihydroxy-Vitamin D um die Bindungsstelle am Detektionsantikörper. Dann wird das Konjugat (ein Peroxidase markierter anti-Maus Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: 1,25-Dihydroxy-Vitamin D - Detektionsantikörper – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidase-substrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Gehalt umgekehrt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

## Extraktion

1. **1000 µl** Standards, Kontrollen, NSB bzw. Proben in Einzelwerten auf die Chromabond auftragen und 10 min. einziehen lassen. Bei Proben-  
volumina < 1000 µl werden die Säulen mit Tris-HCl vorgepuffert, z.B. 500  
µl Tris-HCl Puffer auf die Säule geben + 500 µl Probe (ergibt **Faktor 2** für  
Probenauswertung).
2. Mit **4 x 1 ml** Diisopropylether in je 3 min. Abstand das 1,25-Dihydroxy-  
Vitamin D von den Chromabond-Säulen direkt in die Silica-Kartuschen  
extrahieren. **Nach der Extraktion müssen die Chromabond Säulen  
entfernt werden (Ständereinheit I).**

**Bei Schritt 3 und 4 bitte darauf achten, dass die Säulen nie länger als  
5 min trocken stehen.**

3. Mit **5 x 2 ml Isopropanol/Hexan (4/96 v/v)** die Silica-Säulen waschen  
(Ständereinheit II).
4. Mit **3 x 2 ml Isopropanol/Hexan (6/94)** die Silica-Säulen waschen  
(Ständereinheit II).

**Nach Schritt 4 die Ständereinheit II mit den Silica-Säulen auf die  
Ständereinheit III mit den Glasröhrchen stellen.**

**Hinweis:** Es ist darauf zu achten, dass die Reagenzgläser (kein Plastik)  
(Ständereinheit III) exakt unter den Säulen stehen.

5. Die Elution des 1,25-Dihydroxy-Vitamin D erfolgt mit **2 x 2 ml  
Isopropanol/Hexan (25/75 v/v).**
6. Die eluierten Proben werden unter leichtem Stickstoffstrom bei 37°C  
oder in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet.
7. Bevor die Vorinkubation gestartet wird, die Glasröhrchen auf  
Raumtemperatur abkühlen lassen.

## Vorinkubation

1. **20 µl** Ethanol zu jeder eingetrockneten Probe bzw. jedem Standard, NSB  
und Kontrollen pipettieren und nach der Ethanol Zugabe vorsichtig ca.  
1 sec vortexen.
2. **450 µl** Antikörperlösung zu den Proben, Standards, NSB und Kontrollen  
pipettieren und gut mind. 10 sec vortexen.
3. Decken Sie die Röhrchen mit Folie ab. **Genau 1 Stunde** bei  
Raumtemperatur inkubieren.

### Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen
2.	Die Positionen für STD/NSB/SAMPLE/CTRL (Standard/nicht spezifische Bindung/Probe/Kontrolle) im Protokollblatt markieren
3.	Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8°C gelagert werden (siehe P.5. Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien).
4.	<b>200 µl STD/NSB/SAMPLE/CTRL</b> in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren. Das Vorinkubat ist eine viskose Flüssigkeit. Wir empfehlen daher die Pipettenspitze einmal mit dem Vorinkubat aufzuziehen und dann langsam zu pipettieren. Die Übertragung der Proben auf die Mikrotiterplatte sollte nicht länger als 20 min dauern.
5.	Streifen abdecken und 18-22 Stunden <b>bei 6 - 10°C</b> inkubieren*
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
7.	<b>200 µl CONJ</b> (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
8.	Streifen abdecken und genau <b>1 Stunde</b> bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren

<p>9. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und <b>5x mit je 250 µl</b> verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen</p>
<p>10. <b>200 µl SUB</b> (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren. <b>ACHTUNG:</b> Achten Sie auf die Zeit, die für die Zugabe benötigt wird. Sie sollte nicht mehr als 2 min betragen. Des Weiteren ist in Schritt 12 darauf zu achten, dass die Zugabe der Stopplösung dieselbe Zeitspanne in Anspruch nimmt, um eine identische Inkubationszeit aller Proben mit Substrat zu gewährleisten.</p>
<p>11. <b>15 - 25 Minuten</b> bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren**</p>
<p>12. <b>50 µl STOP</b> (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen. Achten Sie darauf, dieselbe Pipettierreihenfolge und -zeit einzuhalten wie in Schritt 10.</p>
<p>13. <b>Extinktion</b> sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei <b>450 nm</b> gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei <b>405 nm</b> gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden</p>

\*Bei kompetitiven Assays ist darauf zu achten, dass die Inkubation immer unter konstanten Bedingungen (Temperatur, Dauer) erfolgt. Das trifft im Speziellen bei der Übernacht-Inkubation zu. Wir empfehlen immer die gleiche Zeitspanne (z. B. 20 h) für die Inkubation.

\*\*Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

## 8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

### 1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

### 2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

### 3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

## 9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration größer als der höchste Standard sollten mit weniger Probenmaterial (z. B. 750 µl oder 500 µl) auf die vorgepufferte Säule aufgetragen und nochmals im Assay gemessen werden. Die Proben werden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert, z. B.:

250 µl TRIS-HCL + 750 µl Probe

ergibt Faktor 1,3

500 µl TRIS-HCL + 500 µl Probe

ergibt Faktor 2.

## 10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

Wir empfehlen die Kontrollen bei jedem Testansatz mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen einer oder mehrere Werte außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Werte nicht gewährleisten.

### *Erwartete Ergebnisse*

#### **Referenzbereich (Plasma oder Serum):**

Säuglinge und Kinder bis 12 Jahre:	30 - 180 pg/ml
Teenager und junge Erwachsene 13-21 Jahre:	30 - 100 pg/ml
Gesunde Erwachsene 21-60 Jahre:	17 - 65 pg/ml
Personen über 61 Jahre:	10 - 50 pg/ml
Schwangere (8.-42. Gestationswoche):	bis zu 60% höhere Werte als Erwachsene

Es treten keine jahreszeitlichen Schwankungen auf.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

## 11. TESTCHARAKTERISTIKA

### Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=20)		
Probe	1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D [pg/ml]	VK [%]
1	55.3	6.69

Inter-Assay (n=20)		
Probe	1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D [pg/ml]	VK [%]
1	39	9

### Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als  $B_0 - 2 \text{ SD}$ . Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D Mittelwert [OD]	Standardab- weichung (SD)	Nachweis- grenze [pg/ml]
1	1.201	0.025	4.8

### Kreuzreaktivität

1,25-(OH) <sub>2</sub> Vit D <sub>3</sub>	100 %
1,25-(OH) <sub>2</sub> Vit D <sub>2</sub>	41 %
Vit D <sub>2</sub> & D <sub>3</sub>	< 0.01 %
24,25-(OH) <sub>2</sub> Vit D <sub>3</sub>	< 0.1 %
25-OH Vit D <sub>2</sub>	< 0.1 %
25-OH Vit D <sub>3</sub>	< 0.01 %
Alfacalcidol	< 0.003 %



### Linearität

Unterschiedliche Verdünnungen von zwei Patientenproben wurden im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [pg/ml]	Gemessen [pg/ml]
A	unverdünnt	21.2	21.2
	250 µl Puffer +750 µl Probe	15.9	15.9
	500 µl Puffer + 500 µl Probe	10.6	11.2
	750 µl Puffer + 250 µl Probe	5.3	8.5
B	unverdünnt	29.6	29.6
	250 µl Puffer +750 µl Probe	22.2	27.3
	500 µl Puffer + 500 µl Probe	14.8	16.9
	750 µl Puffer + 250 µl Probe	7.4	7.2

## 12. REGENERIERUNG DER SILICA-KARTUSCHEN

Die Silica-Kartuschen (untere Säulen) müssen direkt nach der Probenextraktion nach folgendem Schema regeneriert werden:

- **2 x 2 ml** Methanol auftragen.
- **2 x 2 ml** n-Hexan auftragen.
- Säulen danach unter dem Abzug **trocknen** lassen.
- Vor dem nächsten Gebrauch müssen die Säulen trocken sein.
- Bis zu 5 Regenerierungszyklen sind möglich.
- Gleich oft regenerierte Säulen im selben Lauf verwenden.
- Trockene Säulen in Plastikbeutel mit Trockenmittel versehen bei Raumtemperatur lagern.

### 13. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

### 14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien soll vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

## 15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

## 16. LITERATUR

1. Wildermuth S. et al., 1993; Clinica chimica Acta, 220, 61
2. Schilling M. et al., 1987; Clinical Chemistry, 33, 187
3. Armbruster F.P. et al., 1990; Ärztl. Lab., 36, 75
4. Durham B.W. et al., 1995; Ann. Clin. Biochem., 32, 77
5. Hollis B.W., 1996; Calcif. Tissue Int., 58, 4
6. Hollis B.W., 1995; Clinical Chemistry, 41, 1313
7. Iqbal S.J. et al., 1996; Clinical Chemistry, 42, 112
8. Withold W. et al., 1995; Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 33, 15

**Verwendete Symbole:**

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>  
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

# 1,25 (OH)<sub>2</sub> Vitamin D ELISA Kit

***For the in vitro determination of 1,25-(OH)<sub>2</sub> vitamin D in plasma and serum***

*EU: IVD / CE*

*US: Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.*

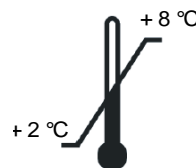
Valid from 02.09..2014



K 2112



48



## 1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of 1,25-dihydroxy vitamin D in serum and plasma. It is for *in vitro* diagnostic use only.

## 2. INTRODUCTION

Vitamin D is either produced in the skin (under the influence of UV light) or taken up from nourishment. The storage type of vitamin D, namely 25-hydroxy vitamin D, is formed in the liver. The hormone 1,25-dihydroxy vitamin D (D hormone) is formed in a second hydroxylation step in the kidney. The responsible enzyme, the kidney 1 $\alpha$ -hydroxylase, is subjected to a rigid control through hormones (especially parathyroid hormone) and its activity is influenced by the serum concentrations of calcium and phosphate.

The serum concentration of 1,25-dihydroxy vitamin D normally re-adjusts itself to the demands of metabolism. Deviations from the normal range of 1,25-dihydroxy vitamin D must therefore always be interpreted in the context of the remaining parameters of the calcium metabolism. The serum concentration of 1,25-dihydroxy vitamin D decreases only in seldom cases of vitamin D deficiency. For the diagnosis of vitamin D deficiency the precursor metabolite, 25-hydroxyvitamin D, should be measured.

The reason for a non-physiological deficiency of 1,25-dihydroxy vitamin D can be found in metabolic disturbances, caused either by genetic defects of the enzyme 1 $\alpha$ -hydroxylase (rare) or kidney malfunctions (more common). Even a slightly impaired kidney function can lead to a decrease of the 1,25-dihydroxy vitamin D concentration.

Since 1,25-dihydroxy vitamin D has important functions in calcium metabolism as well as supplementing secretion of parathyroid hormone from the parathyroid glands, increasing kidney malfunctioning leads to development of renal osteopathy, which is characterized by osteomalacia and osteitis fibrosa.

Treatment of renal osteopathy consists of the administration of 1,25-dihydroxy vitamin D (calcitriol) or the prohormone 1 $\alpha$ -hydroxy vitamin D. In renal tubules malfunctions decreased or relatively low levels of 1,25-dihydroxy vitamin D (e.g. diabetes insipidus, Fanconi-syndrom) are found. A

non-physiological over-production of 1,25-dihydroxy vitamin D arises in granulomatosis (e.g. sarcoidosis), where extra-renal synthesis of 1,25-dihydroxy vitamin D occurs. This can lead to hypercalcaemia. Also in idiopathic hypercalciuria a relatively high level of 1,25-dihydroxy vitamin D is found. Increased concentrations of 1,25-dihydroxy vitamin D can be seen in case of non-functional vitamin D receptors (rare), during calcium deficient nutrition, as well as a result from overproduction of parathyroid hormone (primary hyperthyroidism).

### Indications

- Defect of kidney functions  
Chronic kidney failure  
Haemodialysis following kidney transplantation
- Renal osteopathy
- Osteomalacia from various types of vitamin D metabolism disturbances
- Kidney tubules function disturbances (diabetes insipidus, Fanconi-Syndrom)
- Monitoring of therapy with active vitamin D metabolites
- Ideopathic hypercalciuria
- Hypercalcaemia

**3 MATERIAL SUPPLIED**

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 2112MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 2112WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 2112E	ETHANOL	Ethanol, ready to use	1.5 ml
K 2112TP	TRIS-HCL	Tris-HCL buffer, ready to use	30 ml
K 2112A1	AB	Detection antibody, anti 1,25-(OH) <sub>2</sub> vitamin D, ready to use	25 ml
K 2112ST	STD	Standard incl. NSB, ready to use (for range see specification or label)	7 x 2.5 ml
K 2112KO	CTRL	Controls, ready to use (for range see specification)	2 x 2.5 ml
K 2112K	CONJ	Conjugate, polyclonal peroxidase- labeled antibody, ready to use	24 ml
K 2112TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready to use	2 x 15 ml
K 2112AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	15 ml
K 2112FOL	FOL	Foil to cover the microtiter plate	2 x 1



#### 4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- 48 Chromabond columns (Catalog No.: Se2112)
- 48 Silica Cartridges (solid phase extraction cartridges, Catalog No.: Sb2221)
- Diisopropylether (p.A.) 99.0 %
- Isopropanol (p.A.) 99.9 %
- n-Hexan (p.A.) 98.3 %
- Methanol (p.A.) 99.9 %
- 75 x 12 mm glass tubes (no plastic)
- Extraction rack (Catalog No.: K2221sv), containing three plastic stands and one nitrogen distributor
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Microtiter plate reader at 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

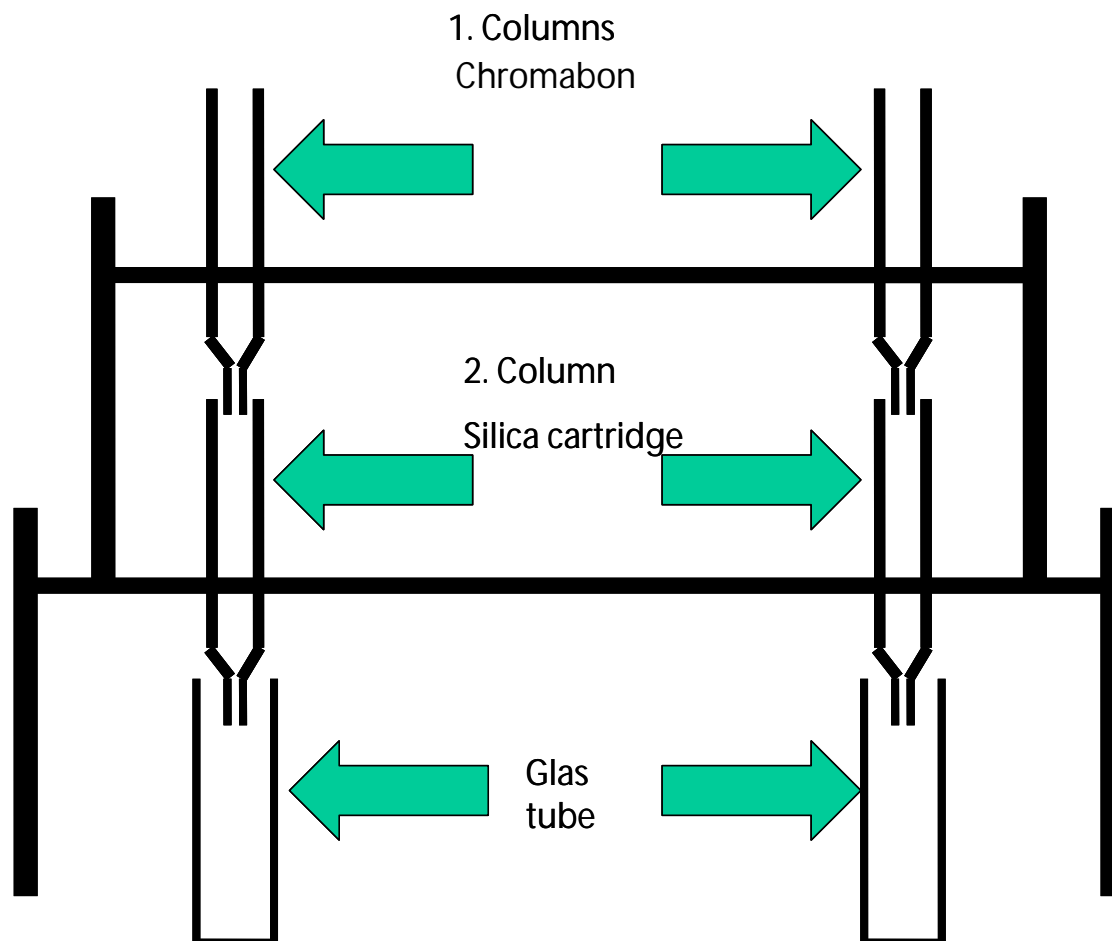
## 5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.** The kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** could be stored in a closed flask at **2-8°C for no longer than one month.**
- Care must be taken when **preparing the solvent mixtures** because of the volume contraction. 1. Measure first the solvents in separate measuring cylinders and then mix in a storage bottle. 2. Use glass storage bottles and glass measuring cylinders; plastic vessels are not suitable.
- **Note: Microtiter strips:** Once the vacuum-sealed-aluminium-bag has been opened, all unused strips must be covered with the foil supplied and put back into the aluminium bag. Seal the aluminium bag and store at 2-8°C.
- Care must be taken not to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch. Furthermore, once the vacuum-sealed-aluminium-bag has been opened, the microtiter plates are exposed to different conditions compared with the microtiter plates stored in the vacuum-sealed- aluminium-bags.
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C.**

## 6. SAMPLE PREPARATION

### Serum/plasma samples

1. Fresh collected blood should be centrifuged within one hour. Vitamin D is an inert substance. The serum samples can be stored at room temperature. However, serum storage at 2-8°C is recommended when the analysis is performed within 72 h after collection. Otherwise, the serum samples must be stored at -20°C until analyzed. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
2. Serum samples can be shipped at 2-8°C (for example with Coolpacks) and remain stable for up to 3 days. If the serum samples are not analyzed within this time period, they must be frozen and stored at -20°C.
3. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.
4. We recommend to apply 1000 µl sample per cartridge. If the sample volume is less than 1000 µl, load an appropriate amount of Tris-HCl buffer in the column, and then the sample (minimum 500 µl) for a total volume of 1000 µl. To do so, first apply 500 µl of Tris-HCl to the column, allow to be completely absorbed and then pipette 500 µl of sample. To calculate the actual concentration, each result should be multiplied with the respective dilution factor.

*Extraction of the samples*

- The extraction unit consists of three parts, which were put on top of each other.
- The upper part is used for the Chromabond columns (extraction rack I), the lower part for the silica cartridges (extraction rack II).
- During sample application and the entire washing procedure, the whole unit should be put into a container big enough to collect the extraction solvents (extraction rack I and extraction rack II). After the first extraction step (ether) remove the extraction rack I with the Chromabond columns.
- It is recommended to place the glass-tubes (extraction rack III) directly under the cartridges (extraction rack II) for the last elution step. The tubes can then be used directly for the next step of the assay.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### *Principle of the test*

The assay utilizes of a competitive Enzyme-Immuno-Assay (EIA) technique with a selected monoclonal antibody recognizing 1,25-dihydroxy vitamin D.

Standards, NSB (non-specific binding), controls and patient samples which are assayed for 1,25-dihydroxy vitamin D are incubated after the extraction step with the detection antibody. The pre-incubated solution is then transferred to the microplate coated with 1,25-dihydroxy vitamin D. During this incubation step, 1,25-dihydroxy vitamin D in the sample and a fixed amount of 1,25-dihydroxy vitamin D bound to the microtiter well compete for the binding of the detection antibodies. Then a peroxidase-conjugated anti-mouse antibody is added into each microplate well and a complex of 1,25-dihydroxy vitamin D - detection antibody – peroxidase conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction, whereby the color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is inversely proportional to the concentration of 1,25-dihydroxy vitamin D. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. 1,25-dihydroxy vitamin D in the samples is determined from this curve.

## Extraction

1. Apply **1000 µl** of standards, NSB, control and sample (plasma or serum) on the Chromabond columns and incubate for 10 minutes. For sample volumes less than 1000 µl wet the cartridges with Tris-HCl buffer, e.g. pipette 500 µl Tris-HCl buffer in the cartridge and 500 µl sample (results in **factor 2** for the sample evaluation).
2. Extract vitamin D from the chromabond columns with **4 x 1 ml** diisopropylether (3 min for each elution). The eluate should drip from the chromabond column directly on an untreated and dry silica cartridge. **After the extraction the chromabond columns should be removed (extraction rack I).**  
**Ensure during steps 3 and 4 that the columns should not be allowed to remain dry for longer than 5 min.**
3. Wash the silica cartridges (extraction rack II) with **5 x 2 ml Isopropanol/Hexane (4/96 v/v).**
4. Wash the silica cartridges (extraction rack II) with **3 x 2 ml Isopropanol/Hexane (6/94 v/v).**  
**After step 4, place the extraction rack unit II with the silica cartridges on the extraction rack unit III with the glass tubes.**  
**Note:** The glass tubes (extraction rack unit III) should be placed directly under the silica cartridges.
5. Elute 1,25-dihydroxy vitamin D from the silica cartridges with **2 x 2 ml Isopropanol/Hexane (25/75 v/v).**
6. Evaporate the eluate under a nitrogen stream at 37°C or in a vacuum centrifuge.
7. Before starting the pre-incubations, let the glass tubes cool down to room temperature.

## Pre-incubation

1. Add **20 µl** of ethanol into each glass tube. Immediately after adding ethanol gently vortex app. 1 sec each tube to avoid any possible evaporation.
2. Add **450 µl** antibody solution into each glass tube. Mix thoroughly for at least 10 sec.
3. Cover glass tubes with a plastic film and incubate exactly for **1 hour** at room temperature.

### *Test procedure*

1. Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well
2. Mark the positions of STD/NSB/SAMPLE/CTRL (Standards/non-specific binding/Sample/Control) on a protocol sheet
3. Take microtiter strips out of the kit. Unused strips must be stored covered at 2-8°C. Strips are stable until the expiry date stated on the label (see P.5. Preparation and storage of reagents)
4. Add <b>200 µl of STD/NSB/SAMPLE/CTRL</b> in duplicate into respective well. All these solutions are viscous; pipette slowly and carefully. We recommend to rinse the inside of the pipette tip with the pre-incubate before pipetting it. The transfer of the samples to the microtiter plate should not take longer than 20 minutes.
5. Cover the plate tightly and incubate for 18-22 hours <b>at 6 - 10°C*</b>
6. Discard the contents of each well. Wash <b>5 times by dispensing 250 µl</b> of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
7. Add <b>200 µl CONJ</b> (conjugate) into each well
8. Cover the plate tightly and incubate for exactly <b>1 hour</b> at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
9. Discard the contents of each well. Wash <b>5 times by dispensing 250 µl</b> of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper
10. Add <b>200 µl of SUB</b> (substrate) into each well. <b>ATTENTION:</b> Mind the time needed for adding the substrate. It should not take longer than 2 min. Adding the stop solution in step 12 should

span the same time to ensure an identical incubation time with substrate for all samples.

11. Incubate for **15 - 25 min** at room temperature (18-26°C) in the dark\*\*

12. Add **50 µl of STOP** (stop solution) into each well, mix thoroughly. Keep the same pipetting order and time as in step 10.

13. Determine **absorption** immediately with an ELISA reader at **450 nm** against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at **405 nm** against 620 nm as a reference

\*As with any competitive immunoassay, consistent incubation times and temperature are essential for accurate plate-to-plate comparisons. Fluctuations in overnight incubation can lead to increased inter-assay CV's. It is therefore recommended to use always the same incubation time, i.e. 20 hours.

\*\*The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

## 8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

### 1. 4-Parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

### 2. Point-to-point-calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

### 3. Spline-algorithm

We recommend for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with



the used program, a control of the paired values should be done manually.

## 9. LIMITATIONS

Samples with 1,25-dihydroxy vitamin D levels greater than the highest standard value should be re-assayed. Apply instead of 1 ml sample a volume of 500 µl or 750 µl on the pre-buffered Chromabond column. Recalculate the results with the dilution factor, e.g.:

250 µl TRIS-HCL + 750 µl sample	results in factor 1.3
500 µl TRIS-HCL + 500 µl sample	results in factor 2.

## 10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

Control samples should be analyzed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid, if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

### *Expected values*

#### **Normal range (plasma or serum):**

Suckling babes and children up to 12:	30 - 180 pg/ml
Teenager and young adults (age 13-21):	30 - 100 pg/ml
Healthy adults (age 21-60):	17 - 65 pg/ml
Persons older than 61:	10 - 50 pg/ml
Pregnant women (8-42 week):	higher values than adults

The normal range is independent of the season.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### *Precision and reproducibility*

Intra-Assay (n=20)		
Probe	1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D [pg/ml]	CV [%]
1	55.3	6.69

Inter-Assay (n=20)		
Probe	1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D [pg/ml]	CV [%]
1	39	9

### *Sensitivity*

The sensitivity was set as  $B_0 - 2SD$ . The zero-standard was measured 20 times.

Sample	1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [pg/ml]
1	1.201	0.025	4.8

### *Cross reactivity*

1,25-(OH) <sub>2</sub> Vit D <sub>3</sub>	100 %
1,25-(OH) <sub>2</sub> Vit D <sub>2</sub>	41 %
Vit D <sub>2</sub> & D <sub>3</sub>	< 0.01 %
24,25-(OH) <sub>2</sub> Vit D <sub>3</sub>	< 0.1 %
25-OH Vit D <sub>2</sub>	< 0.1 %
25-OH Vit D <sub>3</sub>	< 0.01 %
Alfacalcidol	< 0.003 %

### Linearity

Different volumes of two patient samples were analyzed. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [pg/ml]	Measured [pg/ml]
A	undiluted	21.2	21.2
	250 µl Buffer + 750 µl Sample	15.9	15.9
	500 µl Buffer + 500 µl Sample	10.6	11.2
	750 µl Buffer + 250 µl Sample	5.3	8.5
B	undiluted	29.6	29.6
	250 µl Buffer + 750 µl Sample	22.2	27.3
	500 µl Buffer + 500 µl Sample	14.8	16.9
	750 µl Buffer + 250 µl Sample	7.4	7.2

## 12. REGENERATION OF THE SILICA CARTRIDGES

The silica cartridges (lower columns) must be regenerated directly after sample extraction as follows:

- **2 x 2 ml** methanol
  - **2 x 2 ml** n-hexan
  - **Dry** the columns in the hood
- The silica cartridges must be dry before the next use.
  - Up to 5 regeneration cycles are possible.
  - Use equally often regenerated columns in the same run.
  - Store dried columns in plastic bags with drying agent at room temperature.

### 13. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

### 14. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

## 15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

## 16. REFERENCES

1. Wildermuth S. et al., 1993; Clinica chimica Acta, 220, 61
2. Schilling M. et al., 1987; Clinical Chemistry, 33, 187
3. Armbruster F.P. et al., 1990; Ärztl. Lab., 36, 75
4. Durham B.W. et al., 1995; Ann. Clin. Biochem., 32, 77
5. Hollis B.W., 1996; Calcif. Tissue Int., 58, 4
6. Hollis B.W., 1995; Clinical Chemistry, 41, 1313
7. Iqbal S.J. et al., 1996; Clinical Chemistry, 42, 112
8. Withold W. et al., 1995; Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 33, 15

**Used symbols:**

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for &lt;n&gt; tests



Manufacturer



Use by



Lot number