

25(OH)-Vitamin D Xpress ELISA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung von 25(OH)-Vitamin D
in humanem Serum*

*For the determination of 25(OH) vitamin D
in human serum*

Gültig ab / Valid from 2015-03-31

REF K 2107



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spezifität</i>	11
<i>Analytische Sensitivität</i>	11
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	12
<i>Korrelationsdaten</i>	13
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	14
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15
15. LITERATUR	15

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die quantitative Bestimmung von 25(OH)-Vitamin D aus humanem Serum und frischem EDTA-Plasma (siehe Kapitel 6 „Probenvorbereitung“). Nur zur *in-vitro*- Diagnostik.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Vitamin D₃ wird in der Haut unter Einfluss von ultraviolettem Licht (UV-B) gebildet. Vitamin D₂ stammt aus der Nahrung oder künstlichen Supplementen und wird über den Dünndarm aufgenommen. Vitamin D₂ und D₃ werden vom Organismus in gleicher Weise verstoffwechselt und haben gleiche biologische Aktivität.

Vitamin D wird in der Blutbahn an ein Bindungsprotein (VDBP) gebunden und in der Leber zu 25(OH)-Vitamin D metabolisiert. Diese 25-Hydroxylierung ist im Wesentlichen vom Substratangebot abhängig. 25(OH)-Vitamin D hat noch eine geringe biologische Aktivität, liegt aber mit der höchsten Konzentration von allen D-Metaboliten in der Zirkulation vor. Aufgrund seiner hohen Affinität zum Bindungsprotein VDBP stellt es die Speicherform des Vitamin D dar. Die Serumkonzentration von 25(OH)-Vitamin D ist deshalb der beste Indikator für die Vitamin-D-Versorgung.

Die präanalytische Stabilität von 25(OH)-Vitamin D in humanem Blut oder Serum bei Raumtemperatur: stabil wie ein Fels in der Brandung (Wienders and Wijnberg, 2009).

25(OH)-Vitamin D wird in der Niere weiter zum 1,25-(OH)₂-Vitamin D metabolisiert, welches der biologisch aktivste Vitamin-D-Metabolit ist und die Funktion eines Hormons hat (D-Hormon). Es reguliert die Kalziumaufnahme aus dem Darm, die Knochenmineralisierung, die Osteoblastendifferenzierung und die Knochenmatrixsynthese. Weiterhin wird die neuromuskuläre Funktion durch D-Hormon beeinflusst.

Bereits leichter Vitamin-D-Mangel mit einem 25(OH)-Vitamin-D-Gehalt von 20–29 ng/ml bzw. 50–74 nmol/l führt über die verminderte Kalziumaufnahme zu einem sekundären Parathormonanstieg und zu einer gesteigerten Knochenresorption.

In der deutschen Normalbevölkerung mit einem Alter über 50 Jahren ist der Vitamin-D-Status signifikant mit der Knochendichte assoziiert (Scharla et al. 1996). Vitamin-D-Mangel ist somit einer der wichtigsten Risikofaktoren insbesondere für die senile Osteoporose. Die frühzeitige Erkennung eines Vitamin-D-Mangels ermöglicht eine effektive Prävention von Frakturen durch Vitamin-D-Supplementation. Schwere Vitamin-D-Mangel mit einem 25(OH)-Vitamin-D-Gehalt < 20 ng/ml bzw. < 50 nmol/l führt zum Krankheitsbild der Rachitis (Kinder) oder der Osteomalazie (Erwachsene), das durch eine gestörte Knochenneubildung und durch eine mangelhafte Matrix-Mineralisierung gekennzeichnet ist (Scharla 1997). Ein Überschuss an Vitamin D (Medikamenten-Überdosierung) ruft ein Hyperkalzämiesyndrom hervor.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Label	Kit-Komponenten	Menge
K 2107MTP	PLATE	Mikrotitermodul mit Riegeln vorbeschichtet mit 25-Hydroxyvitamin-D-Antigen	12 x 8 Vertiefungen
K 2107WP	WASHBUF	10 x ELISA Waschpufferkonzentrat phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton X-100 und ProClin 300	2 x 100 ml
K 2107RS	RECSOL	Rekonstitutionslösung phosphatgepufferte Salzlösung zur Freisetzung des 25-Hydroxyvitamin D aus dem Bindeprotein	2 x 20 ml
K 2107RR	RELREAG	Freisetzungsreagenz lyophilisierte phosphatgepufferte Salzlösung mit Vitamin-D-Bindeprotein-Inhibitor	2 x 1 vial
K 2107AK	AB	Anti-25(OH)-Vitamin-D-Antikörper, gebrauchsfertig phosphatgepufferte Salzlösung mit monoklonalem Mausantikörper, Stabilisatoren und Konservie- rungsmitteln	1 x 10 ml
K 2107CAL	CAL	Kalibrator, gebrauchsfertig gepuffertes Humanserum mit 25-Hydroxyvitamin D und 0,09% Natriumazid	1 vial à 300 µl
K 2107KO	CTRL A CTRL B	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen) gepuffertes Humanserum mit 25-Hydroxyvitamin D und 0,09% Natriumazid	300 µl 300 µl
K 2107K	CONJ	Konjugat (Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig phosphatgepufferte Salzlösung mit HRP-mar- kierten polyklonalen anti-Maus-Antikörpern, Stabilisatoren und Konservierungsmitteln	1 x 20 ml
K 2107TMB	SUB	TMB-Substrat, gebrauchsfertig wässrige Formulierung aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	1 x 20 ml
K 2107SD	SAMDIL	Probenverdünnungspuffer phosphatgepufferte Salzlösung mit Stabilisatoren und Konservierungsmitteln	1 x 15 ml
K 2107AC	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig 0,4M Schwefelsäure	1 x 20 ml
K 2107FOL	FOL	Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	2 x 1

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Tiefkühlschrank (-20°C)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Mikrotiterplatten-Thermoshaker für 37°C mit Schüttelfunktion (auf Anfrage über Immundiagnostik erhältlich)
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer (benötigte Filter siehe Kapitel 7)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bringen Sie **alle Reagenzien** vor Verwendung auf **Raumtemperatur**.
- Der Test-Kit ist ausgelegt auf 96 Einzelbestimmungen. Eine Volumenreduzierung der Probe und der Puffer führt zu falschen Ergebnissen.
- Beim Mehrfachansatz der Platte ist darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), 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** (Waschpuffer) ist bei **2–8°C zwei Wochen** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Das **RELREAG** (Freisetzungsreagenz) in **16 ml RECSOL** (Rekonstitutionslösung) auflösen, leicht durch vorsichtiges Schwenken mischen (nicht vortexten). **Restliches RELREAG bei -20°C lagern**. Es ist so bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) stabil. Es kann nach dem Einfrieren noch 1 x aufgetaut bzw. genutzt werden. Eingefrorenes Freisetzungsreagenz muss vor Gebrauch auf **Raumtemperatur** erwärmt werden.
- **AB** (Antikörper) mindestens 1 Stunde vor Gebrauch auf **Raumtemperatur** bringen.

- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig, bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Achtung: Mikrotiterstreifen:** Nach Öffnen des verschweißten Aluminiumbeutel müssen nicht verwendete Streifen mit Klebefolie überzogen und mit Trockenmittel im wieder verschlossenen Aluminiumbeutel bei 2–8 °C gelagert werden. Auf diese Weise behandelte Streifen können innerhalb von 4 Wochen verbraucht werden.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

1. a) **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 24 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.
b) **Frisch abgenommenes EDTA-Plasma** sollte innerhalb von 8 Tagen gemessen werden und bis zur Messung bei 2–8 °C gelagert werden. Plasma nicht einfrieren.
2. Die Serumproben und EDTA-Plasmaproben können bei 2–8 °C (z. B. mit Coolpacks) transportiert werden und sind so bis zu 3 Tage haltbar.
3. Bevorzugt ist **Serum** als Probenmatrix einzusetzen; **Vollblut ist nicht als Probenmaterial geeignet**.
4. Bei der Durchführung des Assays sind die in der Anleitung genannten Inkubationszeiten und Temperaturen sorgfältig zu beachten.
5. Vor der Messung müssen die Proben gut gemischt werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf einer kompetitiven ELISA-Technik. Es wird ein ausgewählter monoklonaler Antikörper, der 25(OH)-Vitamin D erkennt, verwendet.

Um eine zuverlässige Bestimmung von 25(OH)-Vitamin D zu gewährleisten, wird 25(OH)-Vitamin D von dem 25(OH)-Vitamin-D-VDBP-Komplex freigesetzt.

Der Kalibrator, Kontrollen und Patientenseren, die auf 25(OH)-Vitamin D zu untersuchen sind, werden mit dem Freisetzungsreagenz inkubiert, um das 25(OH)-Vitamin D freizusetzen. Das Vorinkubat wird in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipet-

tiert, welche mit 25(OH)-Vitamin D beschichtet wurden. Anti-25(OH)-Vitamin-D-Antikörper wird dazu pipettiert. In diesem Inkubationsschritt kompetitiert das 25(OH)-Vitamin D aus der Probe mit dem auf der Platte gekoppeltem 25(OH)-Vitamin D um die Bindungsstelle am Antikörper. Dann wird das peroxidasemarkierte Konjugat zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: 25(OH)-Vitamin D – Anti-25(OH)-Vitamin-D-Antikörper – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Intensität der gelben Farbe ist umgekehrt proportional zur 25(OH)-Vitamin-D-Konzentration in der Probe. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch gemessen. Anhand eines mitgeführten Kalibrators und dessen Bezug zu einer chargenabhängigen Mustereichkurve lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Hierfür Kit öffnen und benötigte Einzelkomponenten entnehmen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben vorsichtig mischen. Schaumbildung vermeiden.
2.	Positionen für CAL (Kalibrator, als Doppelwert)/PROBE/CTRLs (Kontrolle A und B) im Protokollblatt markieren.
3.	V-Tubes (z. B. Eppendorf-Tube) beschriften.
4.	10 µl CAL (Kalibrator)/ PROBE/CTRLs (Kontrolle A und B) in die Tubes vorlegen. Alternativ zur Verdünnung in Polypropylen-Reaktionsgefäßen kann die Verdünnung auch in Deep Well® DSX Verdünnungsröhrchen (erhältlich als Einzelröhrchen oder 8er-Streifen) vorgenommen werden. Dies hat den Vorteil, dass die verdünnten Proben mit einer Mehrkanalpipette direkt in die für den Test verwendeten Mikrotiterstreifen überführt werden können.
5.	RELREAG (Freisetzungsreagenz) rekonstituieren (siehe Kapitel 5, Punkt 5, Seite 4).
6.	300 µl RELREAG (Freisetzungsreagenz) zugeben und kurz vortexen.
7.	Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Mikrotitermodul nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen mit Abdeckfolie abgeklebt , bei 2–8 °C gelagert und innerhalb von 4 Wochen verwendet werden.

8.	100 µl CAL (Kalibrator, als Doppelwert)/ PROBE/CTRL (Kontrolle A und B) aus den V-Tubes in die Mikrotiterstreifen pipettieren.
9.	Streifen für 75 Minuten im Thermoshaker bei 37 °C unter Schütteln (900 Upm) inkubieren. Hinweis: die Mikrotiterstreifen für diesen Schritt nicht abkleben!
10.	100 µl SAMDIL (Probenverdünnungspuffer) in alle Vertiefungen pipettieren.
11.	50 µl AB (anti 25(OH)-Vitamin-D-Antikörper) in alle Vertiefungen pipettieren.
12.	Streifen für 30 Minuten im Thermoshaker bei 37 °C unter Schütteln (900 Upm) inkubieren. Hinweis: die Mikrotiterstreifen für diesen Schritt nicht abkleben!
13.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 350 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Verwendung einer 8-Kanal-Pipette wird empfohlen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Für TECAN und Dynex Geräte kann ein Programmierungsprotokoll bei Immundiagnostik AG angefordert werden.
14.	150 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
15.	Streifen für 30 Minuten im Thermoshaker bei 37 °C unter Schütteln (900 Upm) inkubieren. Hinweis: die Mikrotiterstreifen für diesen Schritt nicht abkleben!
16.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 350 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Verwendung einer 8-Kanal-Pipette wird empfohlen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
17.	150 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
18.	Streifen für 20 Minuten bei Raumtemperatur (18–26 °C) im Dunkeln inkubieren. Hinweis: Mikrotiterstreifen hierbei nicht schütteln!
19.	150 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren.
20.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gemessen.

8. ERGEBNISSE

Für die Auswertung der Messwerte verwenden Sie bitte ein 4-parametrisches Logit-Log-Modell unter Verwendung der Angaben zum Verlauf der Kalibrationskurve sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind.

Abhängig von der verwendeten Software kann der Kalibrationskurvenverlauf sowohl durch die Parameter A, B, C und D als auch durch die Wertepaare aus Konzentration und optischer Dichte der Standards beschrieben werden.

Achtung: Die Parameterwerte müssen genau eingegeben werden, da selbst geringe Abweichungen der Zahlenwerte zu massiven Störungen der Auswertung führen können.

Nach jeder Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Vollblut kann nicht verwendet werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Referenzwerte

Information von ASBMR 2011

Defizienz (schwerer Mangel)	< 20 ng/ml	bzw.	< 50 nmol/l
Insuffizienz (Mangel)	20–29 ng/ml	bzw.	50–74 nmol/l
Suffizienz (gut versorgt)	> 30 ng/ml	bzw.	> 75 nmol/l

Bund der Osteologen **SACHSEN E. V.**

http://osteologie-sachsen.de/aktuelles_vitamin_d.html

Umrechnungsfaktor

1 ng/ml = 2,5 nmol/l

1 nmol/l = 0,4 ng/ml

Referenzbereiche für 25-Hydroxyvitamin D₃ (ng/ml), Männer und Frauen*

Alter	n	2,5 %	97,5 %
0 bis < 3 Monate	131	5	42
3 bis < 6 Monate	135	9	60
6 Monate bis < 1 Jahr	147	18	58
1 bis < 3 Jahre	394	15	54
3 bis < 10 Jahre	619	14	46
10 bis < 13 Jahre	286	11	50
13 bis < 15 Jahre	275	10	44
15 bis < 18 Jahre	390	8	45
> 18 Jahre	421	8	56

*Alle Jahreszeiten

(Soldin OP et al., 2009)

Achtung

Die Produktion von Vitamin D in der Haut ist hoch variabel und abhängig von Jahres- und Tageszeit, Breitengrad, Alter, Sonnenschutz u. a.

Die Referenzbereiche sind von der verwendeten Untersuchungsmethode abhängig (z. B. Vitamin-D-Freisetzung vom Vitamin-D-Bindeprotein, VDBP) und können daher nur zur Orientierung dienen.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzbereich auf Basis des lokalen Patientenkollektivs zu etablieren.

Literaturreferenzen

Folgende Literaturreferenzen zum Vitamin-D-Referenzwert finden Sie im Literaturverzeichnis auf S. 14: Grant et al., Soldin et al., Visser et al., Wicherts et al.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Zwei Referenzproben wurden 10x mit 3 verschiedenen Kitchargen gemessen.

Referenzprobe	P1			P2		
Kit-Charge	130125	130201	130418	130125	130201	130418
Messung Nr.	Ergebnis in nmol/l					
1	46,1	41,7	37,0	123,8	97,4	103,5
2	41,6	39,4	45,8	110,8	108,0	106,1
3	42,5	47,4	43,1	117,9	114,7	118,9
4	46,2	49,1	40,1	117,9	111,3	101,5
5	41,1	48,3	38,21	121,0	118,5	105,1
6	43,9	44,0	39,1	110,9	102,4	99,3
7	40,9	40,7	42,2	104,8	117,7	90,7
8	49,4	45,7	42,7	114,8	113,7	107,2
9	44,2	51,9	42,2	111,1	123,6	120,7
10	49,1	50,8	42,6	113,9	111,5	105,4
Mittelwert	44,6	45,9	41,3	114,7	111,9	105,8
SD	3,1	4,3	2,7	5,6	7,7	8,8
Intra-Assay-VK in %	6,9	9,4	6,4	4,9	6,9	8,3
Mittelwert	43,9			110,8		
SD	3,6			8,2		
Inter-Assay-VK in %	8,8			7,4		

P1: Intra-Assay-VK Charge 1: 6,8%, Charge 2: 9,4%, Charge 3: 6,4%. Inter-Assay-VK liegt bei 8,8%.

P2: Intra-Assay-VK Charge 1: 4,9%, Charge 2: 6,9%, Charge 3: 8,3%. Inter-Assay-VK liegt bei 7,4%.

Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent, bezogen auf die 25(OH)-Vitamin-D₃-Reaktivität:

- 25(OH)-Vitamin D₃ 100,0%
- 25(OH)-Vitamin D₂ 67%
- 24, 25(OH)-Vitamin D₃ ≥ 100,0%
- Vitamin D₂ (Ergocalciferol) 0,3%
- Vitamin D₃ (Cholecalciferol) 0,8%

Analytische Sensitivität

Nachweisgrenze (*limit of detection*, LoD)

5,6 ng/ml

14 nmol/l

Linearer Bereich

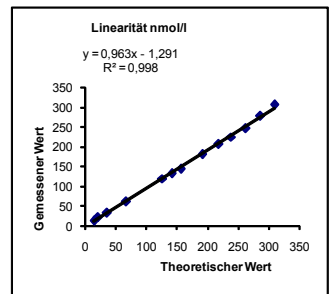
Linearer Bereich

6,40–100 ng/ml

16–250 nmol/l

2 Proben mit bekannten Konzentrationen wurden in 11 Verdünnungsschritten innerhalb des erwarteten Messbereichs miteinander verdünnt. Eine lineare Regressionsrechnung wurde durchgeführt.

Theoretisch nmol/l	Gemessen nmol/l	Wiederfindung in %
310	307	99
286	279	97
263	246	94
239	226	94
219	207	95
192	182	95
157	146	93
142	133	94
127	121	95
68	64	93
36	35	98
21	22	107
15	15	101



$r = 0,9991$

Der lineare Bereich des Assays wurde auf 16–250 nmol/l, beziehungsweise 6,4–100 ng/ml festgelegt.

Wiederfindung in der Verdünnung

Proben mit einer Konzentration > 320 nmol/l müssen verdünnt und erneut gemessen werden.

Um eine Probe zu verdünnen, transferieren Sie bitte im erneuten Ansatz ein geringeres Volumen der wie üblich verdünnten Probe (10 µl Probe + 300 µl RELREAG) in das Messwell. Durch das geringere Volumen der wie üblich verdünnten Probe (10 µl Probe + 300 µl RELREAG) im Well ergeben sich zusammen mit den fixen Volumina der restlichen Reagenzien im Well folgende Verdünnungsfaktoren, welche zur Berechnung der originalen Probenkonzentration angewendet werden müssen.

Probe	Eingesetztes Volumen der vorverdünnten Probe (10 µl+300 µl RelReag)	Zielkonzentration [nmol/l]	Ermittelte Konzentration [nmol/l]	Wiederfindung [in %]	Verdünnungsfaktor
A	100 µl	126,00	126,00		1
	90 µl	118,13	116,5	98,6	1,0666
	80 µl	109,57	101,18	92,3	1,15
	70 µl	100,24	94,4	94,2	1,257
	60 µl	90,00	85,5	95,0	1,4
	50 µl	78,75	76,19	96,7	1,6
	40 µl	66,32	72,7	109,6	1,9
B	100 µl	206,03	206,03		1
	90 µl	193,17	191,7	99,2	1,0666
	80 µl	179,16	188,02	104,9	1,15
	70 µl	163,91	183,66	112,1	1,257
	60 µl	147,16	164,04	111,5	1,4
	50 µl	128,77	146,76	114,0	1,6
	40 µl	108,44	122,01	112,5	1,9

Bei Verwendung eines geringeren Volumens der vorverdünnten Probe bei konstantem Volumen aller übrigen Reagenzien errechnet sich der oben angegebene Verdünnungsfaktor nach folgender Formel:

$$\text{Verdünnungsfaktor} = [(x + 150) / x] / [(100 + 150) / 100]$$

Beispielhafte Berechnung für x = 50 µl:

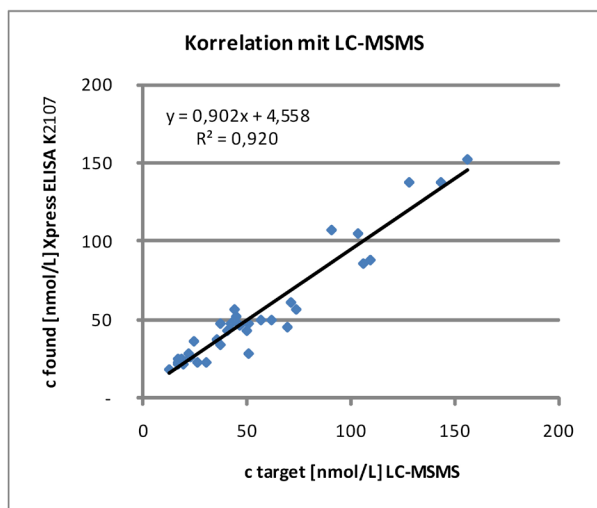
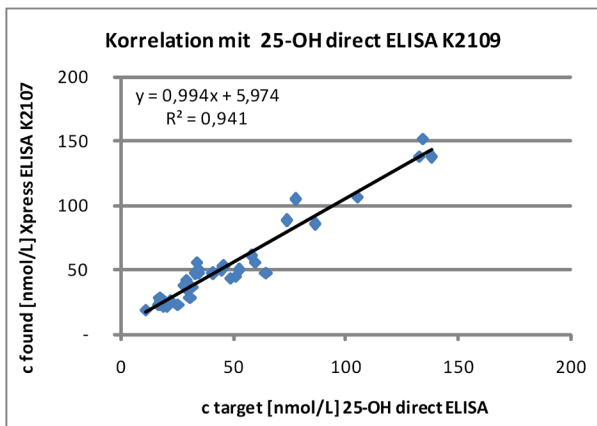
$$(50 + 150) / 50 = 4$$

$$(100 + 150) / 100 = 2,5$$

$$\Rightarrow 4 / 2,5 = \text{Faktor } 1,6$$

Korrelationsdaten

Exzellente Korrelation des Immundiagnostik 25(OH)-Vitamin D Xpress ELISAs mit dem 25(OH)-Vitamin D direct ELISAs und LC-MS/MS.



12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 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.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- **Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.**
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- 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.

15. LITERATUR

1. Chapuy, M. C. et al. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **81**, 1129–33 (1996).
2. Scharla, S. H. Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different European countries. *Osteoporosis international* **8** Suppl 2, S7–12 (1998).
3. Grant, W. B. & Holick, M. F. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* **10**, 94–111 (2005).
4. Visser, M., Deeg, D. J. H., Puts, M. T. E., Seidell, J. C. & Lips, P. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *The American journal of clinical nutrition* **84**, 616–22; quiz 671–2 (2006).
5. Wicherts, I. S. et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 2058–65 (2007).
6. Wielders, J. P. M. & Wijnberg, F. A. Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clinical chemistry* **55**, 1584–5 (2009).
7. Soldin, O. P., Sharma, H., Husted, L. & Soldin, S. J. Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone-

rone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry* **42**, 823–7 (2009).

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Chargenbezeichnung



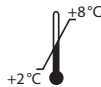
Verwendbar bis

25(OH)-Vitamin D Xpress ELISA Kit

*For the determination of 25(OH) vitamin D
in human serum*

Valid from 2015-03-31

REF K 2107



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. CLINICAL RELEVANCE	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	21
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	22
7. ASSAY PROCEDURE	22
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Test procedure</i>	23
8. RESULTS	24
9. LIMITATIONS	25
10. QUALITY CONTROL	25
<i>Reference ranges for 25(OH) vitamin D₃</i>	25
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
<i>Precision and reproducibility</i>	26
<i>Analytical Sensitivity</i>	28
<i>Dilution recovery</i>	28
<i>Correlation data</i>	30
12. PRECAUTIONS	30
13. TECHNICAL HINTS	31
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	31
15. REFERENCES	32

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik ELISA is intended for the quantitative determination of the 25-OH-Vitamin D in serum and fresh EDTA plasma (see chapter 6 "Specimen collection and preparation"). For *in vitro* diagnostic use only.

2. CLINICAL RELEVANCE

Vitamin D is a steroid hormone involved in the intestinal absorption of calcium and the regulation of calcium homeostasis. There are two different forms of vitamin D, named D₃ and D₂, which are very similar in structure. The D₂ is a synthetic product, which is predominantly absorbed by fortified food.

Physiological vitamin D₃ levels result not only from dietary uptake but can also be produced from a cholesterol precursor, 7-dehydrocholesterol, in the skin during sun exposure. In the liver, the vitamin is hydroxylated to 25-hydroxyvitamin D (25(OH)-vitamin D), the major circulating metabolite of vitamin D. Although 1,25-(OH)₂ vitamin D portrays the biological active form of vitamin D, which is synthesized in the kidney, it is widely accepted that the measurement of circulating 25(OH)-vitamin D provides better information with respect to patients vitamin D status and allows its use in diagnose hypovitaminosis.

Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D₃ in human blood or serum at room temperature: solid as a rock (Wielders and Wijnberg, 2009).

The concentration of 25(OH)-vitamin D decreases with age and a deficiency is common among elderly persons.

Clinical applications of 25(OH)-vitamin D measurements are the diagnosis and therapy control of postmenopausal osteoporosis, rickets, osteomalacia, renal osteodystrophy, pregnancy, neonatal hypocalcemia and hyperparathyroidism. In addition, a prevalence of subclinical vitamin D deficiency has been discussed in different European countries.

Vitamin D intoxication mostly occurs during a large intake of pharmaceutical preparations of Vitamin D and may lead to hypercalcemia, hypercalcuria and nephrocalcinosis in susceptible infants.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 2107MTP	PLATE	Microtiter plate frame with strips with 25-hydroxyvitamin D antigen linked to the inner surface of the polystyrene wells	12 x 8 wells
K 2107WP	WASHBUF	10x ELISA wash buffer concentrate phosphate buffered saline containing Triton X-100 and ProClin 300	2 x 100 ml
K 2107RS	RECSOL	Reconstitution solution phosphate buffered saline for dissociating 25-hydroxyvitamin D from binding protein	2 x 20 ml
K 2107RR	RELREAG	Releasing reagent lyophilised phosphate buffered saline containing a vitamin D binding protein inhibitor	2 x 1 vial
K 2107AK	AB	Anti 25(OH)-vitamin D antibody, ready to use phosphate buffered saline containing monoclonal mouse antibodies, stabilisers and preservative	1 x 10 ml
K 2107CAL	CAL	Calibrator, ready to use buffered human serum containing 25-hydroxyvitamin D and 0.09% sodium azide	1 vial à 300 µl
K 2107KO	CTRL A CTRL B	Controls, ready for use see specification for range buffered human serum containing 25-hydroxyvitamin D and 0.09% sodium azide	300 µl 300 µl
K 2107K	CONJ	Conjugate, peroxidase labeled, ready to use phosphate buffered saline containing polyclonal anti mouse-HRP, antibodies stabilisers and preservative	1 x 20 ml
K 2107TMB	SUB	TMB substrate aqueous formulation of tetramethylbvenzidine and hydrogen peroxide	1 x 20 ml
K 2107SD	SAMDIL	Sample dilution buffer phosphate buffered saline containing stabilisers and preservative	1 x 15 ml
K 2107AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use sulfuric acid, 0,4 M	1 x 20 ml
K 2107FOL	FOL	Foil to cover the microtiter plate	2 x 1

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Freezer (-20°C)
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Microplate thermoshaker at 37°C with shaking function (available via Immundiagnostik upon request)
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader (required filters see chapter 7)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Allow all reagents to come to **room temperature** before use in the assay.
- The test kit is designed for 96 single determinations. A reduction of the sample or buffer volumes results in erroneous values.
- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37°C 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** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8°C for two weeks**.
- Reconstitute **RELREAG** (releasing reagent) in **16 ml RECSOL** (reconstitution solution), mix gently by careful swinging (do not vortex). **Unused volume of RELREAG can be stored at -20°C upon further use**. It is then stable until the date of expiry (see label). Frozen RELREAG can be defrosted and used only once. Let frozen reagent come to ambient temperature prior to use.
- Bring **AB** (antibody) at room temperature at least one hour before use.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

- **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 bag and store it at 2–8 °C. Strips handled in such a way can be used within 4 weeks.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. a) **Freshly collected blood** should be centrifuged within one hour. Vitamin D is an inert substance. However, serum storage at 2–8 °C **is recommended** when the analysis is performed within 24 h after collection. Otherwise, the serum samples must be stored at -20 °C until analyzed. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
b) **Freshly collected EDTA plasma** should be measured within 8 days. It should be stored at 2–8 °C until the measurement. Do not freeze plasma samples.
2. Serum samples and EDTA plasma samples can be shipped at 2–8 °C (for example with coolpacks) and remain stable for up to 3 days.
3. Serum is the preferred sample matrix; **whole blood is not suitable**.
4. Indicated incubation times and temperatures must be strictly observed.
5. Mix samples well before use.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes of a competitive ELISA technique with a selected monoclonal antibody recognizing 25(OH)-vitamin D. For a reliable determination of 25(OH)-vitamin D, it is necessary to release it from the 25(OH)-vitamin D-VDBP-complex.

The calibrator, controls and patient samples which are assayed for 25(OH)-vitamin D are incubated with the releasing reagent. The pre-incubated solutions are then transferred to the microplate coated with 25(OH)-vitamin D, and an anti-25(OH)-vitamin D antibody is added. During this incubation step, 25(OH)-vitamin D in the sample and a fixed amount of 25(OH)-vitamin D bound to the microtiter well compete for the binding of the antibody. Then a peroxidase-conjugated antibody is added into each microplate well. A complex of 25(OH)-vitamin D – anti-25(OH)-vitamin D 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 25(OH) vitamin D concentration of the sample. Samples are quantified by referring their optical density to a lot-dependent master

calibration curve and the use of the calibrator that is run with each test.

Test procedure

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18–26 °C). For this purpose, open the kit, take out the needed individual components and mix gently avoiding foam formation.
2.	Mark the positions of CAL (calibrator, in duplicate)/SAMPLE/CTRLs (control A and B) on a protocol sheet.
3.	Label V-tubes (e. g. 1.5 ml Eppendorf-tubes).
4.	Pipet 10 µl of CAL (calibrator)/ SAMPLE/CTRLs (control A and B) respectively, into the corresponding tube. Instead of dilution in polypropylene reaction tubes, you can also dilute the samples in Deep Well® DSX dilution tubes (available as single tubes or 8 well strips). This offers the additional advantage that you can transfer the diluted samples with a multi-channel pipet directly to the microtiter stripes used for the test.
5.	Reconstitute RELREAG (releasing reagent) (see chapter 5., page 19).
6.	Add 300 µl of RELREAG (releasing reagent) into each tube, vortex shortly.
7.	Take microtiter strips out of the microtiter module. Unused strips must be covered with the enclosed foil, stored at 2–8 °C and used within 4 weeks.
8.	Transfer 100 µl of CAL (calibrator, in duplicate)/ SAMPLE/CTRL (control A and B) from the V-tubes to respective well.
9.	Incubate in the thermoshaker for 75 minutes at 37 °C while shaking at 900 rpm. Note: do not seal the microtiter strips for this step.
10.	Add 100 µl of SAMDIL (sample dilution buffer) into each well.
11.	Add 50 µl of AB (anti 25(OH)-vitamin D antibody) into each well.
12.	Incubate microtiter plate in the thermoshaker for 30 minutes at 37 °C while shaking at 900 rpm. Note: do not seal the microtiter strips for this step.

13.	Aspirate and wash the wells 5 x with 350 µl of diluted wash buffer. The use of an 8-channel pipet is recommended. Remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel after the last wash. For TECAN and Dynex instruments a programming protocol can be requested from Immundiagnostik AG.
14.	Add 150 µl of CONJ (conjugate) into each well.
15.	Incubate microtiter plate in the thermoshaker for 30 minutes at 37°C while shaking at 900 rpm. Note: do not seal the microtiter strips for this step.
16.	Aspirate and wash the wells 5 x with 350 µl of diluted wash buffer. The use of an 8-channel pipet is recommended. Remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel after the last wash.
17.	Add 150 µl of SUB (substrate) into each well.
18.	Incubate for 20 minutes at room temperature (18–26°C) in the dark. Note: do not shake the microtiter strips.
19.	Add 150 µl of STOP (stop solution) into each well.
20.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm.

8. RESULTS

For result evaluation, please use a four parametric logit-log model based on the standard curve of the respective kit lot and the calibrator value (CAL). All essential information on the standard curve is provided on the QC data sheet of the respective product lot.

The calibration curve can be expressed either by the concentration of each standard with its corresponding optical density or by the four parameters A,B,C and D. In both cases the optical density of the calibrator (CAL) is essential. Depending on your evaluation software program, either the one or the other kind of data described above should be entered.

Note: The parameters A, B, C, D and CAL must be entered exactly into the evaluation program. Even small deviations of the values can cause significant interference with the evaluation of the results.

The plausibility of the pairs of values should always be examined after 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 by the operator.

9. LIMITATIONS

Whole blood is not suitable as a sample.

10. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed 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.

Reference ranges for 25(OH) vitamin D₃

Information from ASBMR 2011

Deficiency (seriously deficient)	< 20 ng/ml	or	< 50 nmol/l
Insufficiency (deficient)	20–29 ng/ml	or	50–74 nmol/l
Sufficiency (adequately supplied)	> 30 ng/ml	or	> 75 nmol/l

Society of Osteologists SACHSEN E. V.

http://osteologie-sachsen.de/aktuelles_vitamin_d.htm

Conversion factor

1 ng/ml = 2.5 nmol/l

1 nmol/l = 0.4 ng/ml

Reference intervals for 25(OH)-vitamin D₃ (ng/ml), males and females*

Age	n	2.5%	97.5%
0 to < 3 months	131	5	42
3 to < 6 months	135	9	60
6 months to < 1 year	147	18	58
1 to < 3 years	394	15	54
3 to < 10 years	619	14	46
10 to < 13 years	286	11	50

13 to < 15 years	275	10	44
15 to < 18 years	390	8	45
> 18 years	421	8	56

*All seasons

(Soldin et al., 2009)

Note

The vitamin D production in the skin is high variable and depends on the season and daily time, degree of latitude, age, sun protection etc. The normal ranges depend on the method used (e.g. vitamin D release from the vitamin D binding protein, VDBP) and serve only as orientation.

We recommend each laboratory to establish an own reference concentration range based on their local population.

Literature references

The following literature references for the vitamin D reference values can be found in the references on page 28: Grant et al., Soldin et al., Visser et al., Wicherts et al.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Two reference samples were measured ten times by using three different kit lots.

Reference sample	P1			P2		
Kit lot	130125	130201	130418	130125	130201	130418
Test nr.	Result in nmol/l					
1	46.1	41.7	37.0	123.8	97.4	103.5
2	41.6	39.4	45.8	110.8	108.0	106.1
3	42.5	47.4	43.1	117.9	114.7	118.9
4	46.2	49.1	40.1	117.9	111.3	101.5
5	41.1	48.3	38.21	121.0	118.5	105.1
6	43.9	44.0	39.1	110.9	102.4	99.3
7	40.9	40.7	42.2	104.8	117.7	90.7
8	49.4	45.7	42.7	114.8	113.7	107.2
9	44.2	51.9	42.2	111.1	123.6	120.7

Reference sample	P1			P2		
10	49.1	50.8	42.6	113.9	111.5	105.4
Mean	44.6	45.9	41.3	114.7	111.9	105.8
SD	3.1	4.3	2.7	5.6	7.7	8.8
Intra-assay CV in %	6.9	9.4	6.4	4.9	6.9	8.3
Mean	43.9			110.8		
SD	3.6			8.2		
Inter-assay CV in %	8.8			7.4		

P1: Repeatability (intra-assay) CV is for lot 1: 6.9%, lot 2: 9.4%, lot 3: 6.4%. Inter-batch (inter-assay) CV is 8.8%.

P2: Repeatability (intra-assay) CV is for lot 1: 4.9%, lot 2: 6.9%, lot 3: 8.3%. Inter-batch (inter-assay) CV is 7.4%.

Specificity

The specificity of the antibody was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to 25(OH)-vitamin D₃. The specificity is calculated in percent, based on the cross-reactivity of these compounds with the anti-25(OH)-vitamin D₃ antibody compared to the 25(OH)-vitamin D₃ antigen.

- 25(OH) vitamin D₃ 100.0%
- 25(OH) vitamin D₂ 67%
- 24,25(OH) vitamin D₃ ≥ 100.0%
- Vitamin D₂ (ergocalciferol) 0.3%
- Vitamin D₃ (cholecalciferol) 0.8%

Analytical Sensitivity

Limit of detection, LoD

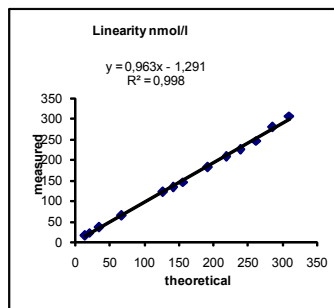
5.6 ng/ml 14 nmol/l

Linear range

6.40–100 ng/ml 16–250 nmol/l

Two samples with known concentrations were diluted to 11 decreasing levels of concentration within the expected range of measurement. A linear regression analysis was performed.

theoretical nmol/l	measured nmol/l	recovery in %
310	307	99
286	279	97
263	246	94
239	226	94
219	207	95
192	182	95
157	146	93
142	133	94
127	121	95
68	64	93
36	35	98
21	22	107
15	15	101



$r = 0,9991$

The linear range of the assay was found to be 16–250 nmol/l, respectively 6.4–100 ng/ml

Dilution recovery

Samples with concentrations higher than 320 nmol/L must be diluted as follows:

To dilute a sample please pipet a lower volume of the prediluted sample (10 µl sample + 300 µl RELREAG) to the well.

The lowered volume of prediluted sample (10 µl sample + 300 µl RELREAG) together with the fixed volumes of all other reagents leads to the following dilution factors that need to be applied for calculating the original sample concentration.

Sample	Volume of prediluted Sample (10 µl+300 µl RelReag)	target concentration [nmol/l]	observed concentration [nmol/l]	recovery [in %]	dilution factor
A	100 µl	126.00	126.00		1
	90 µl	118.13	116.5	98.6	1.0666
	80 µl	109.57	101.18	92.3	1.15
	70 µl	100.24	94.4	94.2	1.257
	60 µl	90.00	85.5	95.0	1.4
	50 µl	78.75	76.19	96.7	1.6
	40 µl	66.32	72.7	109.6	1.9
B	100 µl	206.03	206.03		1
	90 µl	193.17	191.7	99.2	1.0666
	80 µl	179.16	188.02	104.9	1.15
	70 µl	163.91	183.66	112.1	1.257
	60 µl	147.16	164.04	111.5	1.4
	50 µl	128.77	146.76	114.0	1.6
	40 µl	108.44	122.01	112.5	1.9

When using lower volume of prediluted sample while using the original volumes of all other reagents we get an effective dilution within the reaction well compared to the original procedure. The original procedure uses 100 µl of prediluted sample (x) + 100 µl SD + 50 µl AB = 250 µl total in the reaction well with 150 µl total of reagents. Using the formula $(x + 150) / x$ we get the fraction of the sample volume used per total volume in the reaction well. The formula is:

$$\text{Dilution factor} = [(x + 150) / x] / [(100 + 150) / 100]$$

For example the dilution factor for the use of x = 50 µl prediluted sample is:

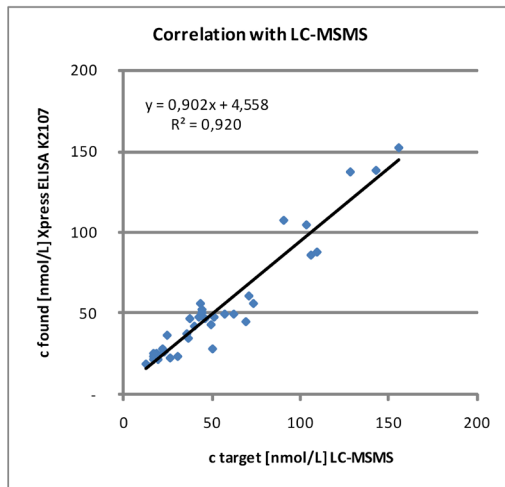
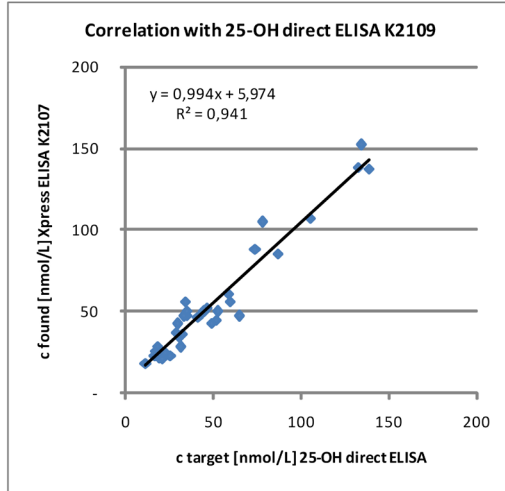
$$(50 + 150) / 50 = 4$$

$$(100 + 150) / 100 = 2.5$$

$$\Rightarrow 4 / 2.5 = \text{factor } 1.6$$

Correlation data

Excellent correlation with 25(OH)-Vitamin D direct ELISA und LC-MS/MS results.



12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be observed.
- Control samples should be analyzed with each run.

- Human materials used in kit components were 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.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- **Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.**
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- 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 incorrect use.

- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

15. REFERENCES

1. Chapuy, M. C. et al. Healthy elderly French women living at home have secondary hyperparathyroidism and high bone turnover in winter. EPIDOS Study Group. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **81**, 1129–33 (1996).
2. Scharla, S. H. Prevalence of subclinical vitamin D deficiency in different European countries. *Osteoporosis international* **8** Suppl 2, S7–12 (1998).
3. Grant, W. B. & Holick, M. F. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* **10**, 94–111 (2005).
4. Visser, M., Deeg, D. J. H., Puts, M. T. E., Seidell, J. C. & Lips, P. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *The American journal of clinical nutrition* **84**, 616–22; quiz 671–2 (2006).
5. Wicherts, I. S. et al. Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **92**, 2058–65 (2007).
6. Wielders, J. P. M. & Wijnberg, F. A. Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clinical chemistry* **55**, 1584–5 (2009).
7. Soldin, O. P., Sharma, H., Husted, L. & Soldin, S. J. Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. *Clinical biochemistry* **42**, 823–7 (2009).

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by