

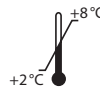
25(OH)-Vitamin D *dried blood* ELISA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung von 25(OH)-Vitamin D
aus Trockenblut*

For the determination of 25(OH) vitamin D in dried blood

Gültig ab / Valid from 2015-06-29

REF K 2108DBS



IVD



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

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	5
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	8
9. EINSCHRÄNKUNGEN	8
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Referenzwerte</i>	9
11. TESTCHARAKTERISTIKA	10
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	10
<i>Spezifität</i>	10
<i>Analytische Sensitivität</i>	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
13. TECHNISCHE MERKMALE	11
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	12
15. LITERATUR	12

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die quantitative Bestimmung von 25(OH)-Vitamin D aus Trockenblut. 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 2108DBS	PLATE	Mikrotitermodul mit Riegeln vorbeschichtet mit 25-Hydroxyvitamin-D-Antigen	12 x 8 Vertiefungen
K 2108DBS	WASHBUF	10 x ELISA-Waschpufferkonzentrat phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton X-100 und ProClin 300	2 x 100 ml
K 2108DBS	AB	Anti-25(OH)-Vitamin-D-Antikörper, gebrauchsfertig phosphatgepufferte Salzlösung mit mono- klonalem Mäuseantikörper, Stabilisatoren und Konservierungsmitteln	18 ml
K 2108DBS	STD	Standards, gebrauchsfertig gepuffertes Humanserum mit 25-Hydroxyvitamin D und 0,09% Natriumazid	6 Vials
K 2108DBS	CTRL 1 CTRL 2	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	je 1 Vial
K 2108DBS	CONJ	Konjugat (Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig phosphatgepufferte Salzlösung mit HRP- markierten anti-Maus-Antikörpern, Stabilisatoren und Konservierungsmitteln	24 ml
K 2108DBS	SUB	TMB-Substrat, gebrauchsfertig wässrige Formulierung aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	2 x 15 ml
K 2108DBS	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig Schwefelsäure	1 x 15 ml
K 2108DBS	ACTSOL	Aktivierungslösung Salzlösung	10 ml
K 2108DBS	ASYBUF	Assaypuffer phosphatgepufferte Salzlösung, Stabilisatoren und Konservierungsmitteln	15 ml
K 2108DBS	Ethanol	Ethanol	2 ml

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g, 2–8 °C
- Laborübliche Reaktionsgefäße (Einmalartikel) aus Polypropylen
- Glasröhrchen, 12 × 75 mm
- Mikrotiterplattenreader mit 450-nm-Filter (Referenzfilter 620 oder 690 nm)
- Wasserbad, 37 °C
- Acetonitril

* 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.
- Kitkonfektionierung für 96 Einfachbestimmungen. Eine Volumenreduzierung der Probe und der Puffer führt zu falschen Ergebnissen.
- Beim Mehrfachansatz des Kits ist darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 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. Der **WASH-BUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünnter WASHBUF) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **AB** (Antikörper) und **ASYBUF** (Assaypuffer) mindestens 1 Stunde vor Gebrauch auf Raumtemperatur (15–30 °C) 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

Als Träger für Trockenblut empfehlen wir DrySpot-ID (Artikelnummer DZ9025ID).

1.	Die benötigte Anzahl Reaktionsgefäße aus Polypropylen bereitstellen.
2.	Je eine Kontrolle (CTRL 1 und 2) diagonal durchschneiden , in ein Reaktionsgefäß vorlegen und mit je 50 µl ACTSOL (Aktivierungslösung) benetzen.
3.	Trockenblutproben (SAMPLE) in Reaktionsgefäße vorlegen und mit je 50 µl ACTSOL (Aktivierungslösung) benetzen.
4.	25 µl STD (Standard) in Reaktionsgefäße pipettieren.
5.	SAMPLE und CTRL kurz vortexen .
6.	300 µl Acetonitril zu STD, CTRL, SAMPLE zugeben, vortexen und für 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubieren. Anschließend 10 min bei 2–8 °C und 3000 g zentrifugieren.
7.	200 µl Überstand in Glasröhrchen (12 × 75 mm) pipettieren und ein-dampfen .
8.	10 µl EtOH (Ethanol) zugeben, kurz vortexen.
9.	120 µl ASYBUF (Assaypuffer) zugeben, gut vortexen .

Die Proben sind nun bereit für den Einsatz im Test.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf einer kompetitiven ELISA-Technik. Es wird ein 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.

Standards, Kontrollen und Trockenblutproben, die auf 25(OH)-Vitamin D zu untersuchen sind, werden mit Acetonitril extrahiert und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, 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 Peroxidase-markierte 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 entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem 25(OH)-Vitamin-D-Gehalt umgekehrt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve erstellt – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur aufweisen. Hierfür Kit öffnen und benötigte Einzelkomponenten entnehmen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben vorsichtig mischen. Schaumbildung vermeiden.

Im Fall einer automatisierten Abarbeitung des Tests können automaten-spezifische Anpassungen der Prozedur notwendig sein, um den jeweiligen technischen Gegebenheiten gerecht zu werden. Für Unterstützung und Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihren Anbieter oder Immundiagnostik AG.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Positionen für STD (Standards)/CTRL (Kontrolle)/SAMPLE (Proben) im Protokollblatt markieren.
2.	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.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	50 µl resuspendierte STD/CTRL/SAMPLE in die Vertiefungen pipettieren

5.	110 µl AB (anti-25(OH)-Vitamin-D-Antikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
6.	Streifen mit Abdeckfolie abkleben und 45 min bei Raumtemperatur* im Dunkeln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	200 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
9.	Streifen mit Abdeckfolie abkleben und 45 min bei Raumtemperatur* im Dunkeln inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11.	200 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
12.	15 Minuten bei Raumtemperatur* im Dunkeln inkubieren
13.	50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer mit einer Messwellenlänge von 450 nm messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards (STD) den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte die Messung sofort bei einer Messwellenlänge von 405 nm wiederholt und diese Ergebnisse für eine Auswertung herangezogen werden. Wenn möglich, sollten bei jeder Messung die Extinktionen der Messwellenlänge mit den Extinktionen einer Referenzwellenlänge verglichen werden. Zulässige Referenzwellenlängen sind z.B.: 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm und 690 nm.

* **Die optimale Umgebungstemperatur beträgt 22–25 °C.** Alle anderen Temperaturen führen zu starken Abweichungen der im QC-Datenblatt angegebenen optischen Dichten.

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. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

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.

Trockenblutproben

Als Träger für Trockenblut empfehlen wir DrySpot-ID (Artikelnummer DZ9025ID). Bei Verwendung dieser Trockenblutträger muss das Messergebnis der **Proben** mit dem **Faktor 1,5** multipliziert werden, um die 25(OH)-Vitamin-D-Konzentration zu erhalten. Die Werte der Standards und Kontrollen müssen nicht multipliziert werden.

Bei Verwendung anderer Träger kann Immundiagnostik keine Gewährleistung für die Richtigkeit der Ergebnisse übernehmen.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Der Test ist auf die Verwendung von Trockenblutproben aus 50 µl Kapillarblut ausgelegt. Abweichungen von diesem Wert beeinflussen das Testergebnis.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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-Hydroxy Vitamin 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.

Literaturreferenzen

Folgende Literaturreferenzen zum Vitamin-D-Referenzwert finden Sie im Literatur-

verzeichnis auf S. 14: Grant et al., Soldin et al., Visser et al., Wicherts et al.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)

Probe	25(OH)-Vitamin D [ng/ml]	VK [%]
1	48,3	8,8
2	26,9	6,0

Inter-Assay (Tag- zu-Tag Variation; n = 20)

Probe	25(OH)-Vitamin D [ng/ml]	VK [%]
1	21,3	11,8
2	36,2	7,9

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

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 2,7 ng/ml.

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.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- 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 Pipettierolumina 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



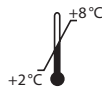
Verwendbar bis

25(OH) vitamin D *dried blood* ELISA Kit

For the determination of 25(OH) vitamin D in dried blood

Valid from 2015-06-29

REF K 2108DBS



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	17
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPERATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	20
7. ASSAY PROCEDURE	20
<i>Principle of the test</i>	20
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference ranges for 25(OH) vitamin D₃</i>	23
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	24
<i>Precision and reproducibility</i>	24
<i>Specificity</i>	24
<i>Analytical Sensitivity</i>	25
12. PRECAUTIONS	25
13. TECHNICAL HINTS	25
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	26
15. REFERENCES	26

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik ELISA is intended for the quantitative determination of the 25-OH-vitamin D in dried blood. For *in vitro* diagnostic use only.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

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 is 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 (1,2).

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 2108DBS	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 2108DBS	WASHBUF	10x ELISA wash buffer concentrate phosphate buffered saline containing Triton X-100 and ProClin 300	2 x 100 ml
K 2108DBS	AB	Anti 25(OH)-vitamin D antibody, ready to use phosphate buffered saline containing monoclonal mouse antibodies, stabilisers and preservative	18 ml
K 2108DBS	STD	Standards, ready to use buffered human serum containing 25-hydroxyvitamin D and 0.09% sodium azide	6 vials
K 2108DBS	CTRL 1 CTRL 2	Controls, ready for use see specification for range	each 1 vial
K 2108DBS	CONJ	Conjugate, peroxidase labeled, ready to use phosphate buffered saline containing anti mouse-HRP, stabilisers and preservative	24 ml
K 2108DBS	SUB	TMB substrate aqueous formulation of tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	2 x 15 ml
K 2108DBS	STOP	ELISA stop solution, ready to use sulfuric acid	1 x 15 ml
K 2108DBS	ACTSOL	Activation solution Salt solution	10 ml
K 2108DBS	ASYBUF	Assay buffer phosphate buffered saline, stabilisers and preservative	15 ml
K 2108DBS	Ethanol	Ethanol	2 ml

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10-1000 µl tips

- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Centrifuge, 3000 g, 2–8 °C
- Standard laboratory vials, cups, etc. (single-use products) made of polypropylene
- Glass tubes, 12 × 75 mm
- Microtiter plate reader (450 nm, reference wave length 620 or 690 nm)
- Refrigerator
- Water bath, 37 °C
- Acetonitril

* 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. PREPERATION 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.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** should be diluted with ultra pure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 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 in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.
- Bring **AB** (antibody) and **ASYBUF** (assay buffer) at room temperature (15–30 °C) at least one hour before use.
- All other test reagents are ready for use. The test reagents are stable up to the date of expiry (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.
- **Note: Microtiter strips:** Once the vacuum-sealed aluminum bag has been opened, all unused strips must be covered with the foil supplied and put back into the aluminium bag. Close the aluminium 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

We recommend DrySpot-ID (catalogue no. DZ9025ID) as carrier for dried blood samples.

1.	Prepare the amount of polypropylene reaction tubes needed.
2.	Cut one of each control (CTRL 1 und 2) diagonally, put it into an reaction tube and add each 50 µl ACTSOL (activation solution).
3.	Put dried blood samples (SAMPLE) in reaction tubes and add each 50 µl ACTSOL (activation solution).
4.	Put 25 µl STD (standard) in reaction tubes.
5.	Vortex SAMPLE and CTRL shortly.
6.	Add 300 µl acetonitril to STD, CTRL, SAMPLE , mix and incubate for 30 min in a water bath at 37°C . Then centrifuge for 10 min at 2–8°C and 3000 g .
7.	Pipet 200 µl supernatant in a glass tube (12 × 75 mm) and evaporate .
8.	Add 10 µl EtOH (ethanol), mix shortly.
9.	Add 120 µl ASYBUF (assay buffer), mix well .

The samples are now ready to be used in the test.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes of a competitive ELISA technique with a 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.

Standards, controls and dried blood samples which are assayed for 25(OH)-vitamin D are extracted with acetonitril and transferred to the microplate coated with 25(OH)-vitamin D. Then, an anti-25(OH)-vitamin D antibody is added. During an 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 concentration of 25(OH)-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. 25(OH)-vitamin D in the samples is determined from this curve.

Test procedure

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature. For this purpose, open the kit, take out the needed individual components and mix gently avoiding foam formation.

For automated ELISA processors, the given protocol may need to be adjusted according to the specific features of the respective automated platform. For further details please contact your supplier or Immundiagnostik AG.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Mark the positions of STD (standards)/CTRL (control) and SAMPLE on a protocol sheet.
2.	Take microtiter strips out of the microtiter module. Unused strips must be covered with a foil, stored at 2–8 °C and used within 4 weeks
3.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
4.	Add 50 µl resuspended STD/CTRL/SAMPLE to all wells.
5.	Add 110 µl AB (anti 25(OH) vitamin D antibody) into each well
6.	Cover the plate again tightly with a foil and incubate for 45 min at room temperature* in the dark .
7.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 200 µl CONJ (conjugate) into each well
9.	Cover the plate again tightly with the enclosed foil and incubate for 45 min at room temperature* in the dark .
10.	Discard the contents of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.

11.	Add 200 µl SUB (substrate) into each well
12.	Incubate for 15–20 minutes at room temperature* in the dark
13.	Add 50 µl STOP (stop solution) into each well
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards (STD) is above the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm and the obtained results used for evaluation. If possible, the extinctions from each measurement should be compared with extinctions obtained at a reference wavelength, e.g. 595 nm, 620 nm, 630 nm, 650 nm and 690 nm can be used.

* **The optimal ambient temperature range is 22–25 °C.** All other temperatures result in strong deviations from the optical densities described in the QC data sheet.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend the use of the „4-parameter-algorithm“.

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended a linear ordinate for optical density and a logarithmic abscissa for concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e. g. 0.001).

2. Point-to-point-calculation

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

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.

Dried blood samples

We recommend DrySpot-ID (catalogue no. DZ9025ID) as carrier for dried blood samples. When using DrySpot-ID, the result of the samples must be **multiplied** by the **factor of 1.5** to obtain the 25(OH) vitamin D concentration. Standards and controls must not be multiplied.

Immundiagnostik AG cannot guarantee accuracy of test results if other dried blood carriers are used.

9. LIMITATIONS

This test is supposed to be used with dried blood samples resulting from 50 µl of capillary blood. Deviations from this value influence the test result.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

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.

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

Intra-Assay (n = 20)

Sample	25(OH)-vitamin D [ng/ml]	CV [%]
1	48.3	8.8
2	26.9	6.0

Inter-Assay (Day-to-Day variation; n = 20)

Sample	25(OH)-vitamin D [ng/ml]	CV [%]
1	21.3	11.8
2	36.2	7.9

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 D ₃ | 100,0% |
| • 25(OH) vitamin D ₂ | 67,8% |
| • 24, 25(OH) vitamin D ₃ | ≥ 100,0% |
| • Vitamin D ₂ (ergocalciferol) | 0,3% |

Analytical Sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 SD$ and estimated to be 2,7 ng/ml.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- 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.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.

- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different 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.
- Quality control guidelines 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