

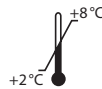
25(OH)-Vitamin D *direct day* ELISA Kit

*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 2015-05-26

REF K 2108



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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die quantitative Bestimmung von 25(OH)-Vitamin D aus humanem Serum und frischem Plasma. 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 2108MTP	PLATE	Mikrotitermodul mit Riegeln vorbeschichtet mit 25-Hydroxyvitamin-D-Antigen	12 x 8 Vertiefungen
K 2108WP	WASHBUF	10 x ELISA Waschpufferkonzentrat phosphatgepufferte Salzlösung mit Triton X-100 und ProClin 300	2 x 100 ml
K 2108RS	RECSOL	Rekonstitutionslösung phosphatgepufferte Salzlösung zur Freisetzung des 25-Hydroxyvitamin D aus dem Bindeprotein; rot eingefärbt	2 x 20 ml
K 2108RR	RELREAG	Freisetzungsreagenz lyophilisierte phosphatgepufferte Salzlösung mit Vitamin-D-Bindeprotein-Inhibitor	2 x 1 vial
K 2108AK	AB	Anti-25(OH)-Vitamin-D-Antikörper, gebrauchsfertig phosphatgepufferte Salzlösung mit monoklonalem Mäuseantikörper, Stabilisatoren und Konservie- rungsmitteln	18 ml
K 2108ST	STD	Standards, gebrauchsfertig gepuffertes Humanserum mit 25-Hydroxyvitamin D und 0,09% Natriumazid	6 x 300 µl
K 2108KO	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 2108K	CONJ	Konjugat (Peroxidase-markiert), gebrauchsfertig phosphatgepufferte Salzlösung mit HRP-markierten anti-Maus-Antikörpern, Stabilisatoren und Konser- vierungsmitteln	24 ml
K 2108TMB	SUB	TMB Substrat, gebrauchsfertig wässrige Formulierung aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid	2 x 15 ml
K 2108AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig Schwefelsäure	1 x 15 ml
K 2108FOL	FOL	Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	3 x 1

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Tiefkühlschrank (-20 °C)
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Reaktionsgefäße (Einmalartikel) aus Polypropylen
- Mikrotiterplattenreader mit 450-nm-Filter (Referenzfilter 620 oder 690 nm)
- Kühlschrank

* 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 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 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** in einem geschlossenen Gefäß **2 Wochen** haltbar.
- Sicherstellen, dass das **RECSOL** (Rekonstitutionslösung) vor Gebrauch Raumtemperatur erreicht hat. (Dafür das **RECSOL** z. B. 10 Minuten im Wasserbad bei 37 °C erwärmen.)
- **RELREAG** (Freisetzungsreagenz) in **16 ml RECSOL** (Rekonstitutionslösung) auflösen, leicht durch vorsichtiges Schwenken mischen (nicht vortexen). 16 ml RELREAG reichen für 48 Einfachbestimmungen, für 96 werden beide RELREAG-Flaschen benötigt. Nach Rekonstitution ist das Freisetzungsreagenz für 4 Wochen bei 2–8 °C im Dunkeln stabil. Für Langzeitlagerung Freisetzungsreagenz aliquotieren und bei -20 °C einfrieren. Es ist so bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) stabil. Nach dem Einfrieren kann rekonstituiertes

RELREAG noch 1x aufgetaut bzw. genutzt werden. Eingefrorenes Freisetzungssreagenz 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 Aluminiumbeutels müssen nicht verwendete Streifen mit beiliegender 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

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 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.
2. Die Serumproben können bei 4–8°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. Die Raumtemperatur sollte mit einem Thermometer überprüft werden. **Bitte beachten: Von einer Inkubation in einem beheizten Inkubator wird abgeraten**.
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.

Standards, Kontrollen und Patientenserum, die auf 25(OH)-Vitamin D zu untersuchen sind, werden mit dem Freisetzungsreagenz vorverdünnt und in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit 25(OH)-Vitamin D beschichtet wurden. Es folgt eine Inkubation, um das 25(OH)-Vitamin D freizusetzen. 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.

Probenverdünnung

1.	Die benötigte Anzahl Reaktionsgefäße aus Polypropylen bereitstellen
2.	20 µl STD (Standard)/ PROBE/CTRLs (Kontrolle A und B) in die Gefäße vorlegen
3.	RELREAG (Freisetzungsreagenz) rekonstituieren (siehe Kap. 5., Seite 4)
4.	300 µl RELREAG (Freisetzungsreagenz) zugeben. Die Überführung der verdünnten Proben auf die Mikrotiterplatte sollte innerhalb von 5–10 Minuten erfolgen.

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 Pro-

ben mit einer Mehrkanalpipette direkt in die für den Test verwendeten Mikrotiterstreifen überführt werden können.

Testdurchführung

1.	Positionen für STD (Standards)/PROBE/CTRLs (Kontrolle A und B) im Protokollblatt markieren
2.	Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Mikrotitermodul nehmen. Nichtverwendete Mikrotiterstreifen müssen mit beiliegender Abdeckfolie abgeklebt , bei 2–8 °C gelagert und innerhalb von 4 Wochen verwendet werden
3.	20 µl der verdünnten Probe zügig in je eine Vertiefung der Mikrotiterplatte überführen, Streifen mit beiliegender Abdeckfolie abkleben und bei Raumtemperatur (18–28 °C) für 60 min inkubieren*.
4.	150 µl AB (anti-25(OH)-Vitamin-D-Antikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
5.	Streifen wieder mit beiliegender Abdeckfolie abkleben und 45 min bei Raumtemperatur inkubieren.
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. Für TECAN und Dynex Geräte kann ein Programmierungsprotokoll bei Immundiagnostik AG angefordert werden
7.	200 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
8.	Streifen wieder mit beiliegender Abdeckfolie abkleben und 45 min bei Raumtemperatur inkubieren.
9.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
10.	200 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
11.	10–15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
12.	50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren

- | | |
|-----|---|
| 13. | 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

Wir empfehlen zur Auswertung des Tests die 4-Parameter-Funktion.

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).

Die Verwendung der 4-Parameter-Funktion wird dringend empfohlen. Sollte es nicht möglich sein, die 4-Parameter-Funktion zur Auswertung zu verwenden, kann auf die Punkt-zu-Punkt-Auswertung ausgewichen werden.

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.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer 25(OH)-Vitamin-D-Konzentration größer dem größten Standard sollten mit Standard 1 (= 0 nmol/l) z. B. 1+1 verdünnt werden (z. B. 50 µl Probe + 50 µl Standard 1) und nochmals im Assay eingesetzt werden.

Vollblut kann nicht verwendet werden.

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-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

Soldin OP et al., 2009; *Alle Jahreszeiten

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 Literaturverzeichnis 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 [nmol/l]	VK [%]
1	71,6	5,0
2	20,1	9,6

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

Probe	25(OH)-Vitamin D [nmol/l]	VK [%]
1	33,3	12,1
2	48,5	9,2
3	79,6	8,6
4	109,9	8,8

Spike-Wiederfindung

Die folgende Tabelle zeigt die Wiederfindung von 25 Vitamin D₃, welches 3 unterschiedlichen Serumproben zugesetzt wurde. Verwendet wurden hierfür Standard 5 (220 nmol/l) und Standard 6 (600 nmol/l). Alle Proben wurden an 3 Tagen in Triplicaten bestimmt. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Sollwerte und der gemessenen Werte dargestellt.

Probe	Messwert [nmol/l]	Sollwert [nmol/l]	Wiederfindung [%]
A	57,5	56,5	101,8
	68,8	65,1	105,7
	79,1	75,5	104,8
	108,1	103,1	104,8
	161,2	158,4	101,8
B	33,2	32,2	103,1
	40,5	42,1	96,2
	47,5	51,2	92,8
	75,4	80,1	94,1
	129,4	137,9	93,8
C	36,6	35,6	102,8
	43,2	45,3	95,4
	52,8	54,6	96,7
	82,0	83,3	98,4
	142,8	140,7	101,5

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

Leerwert (<i>limit of blank</i> , LoB)	1,08 ng/ml	2,7 nmol/l
Nachweisgrenze (<i>limit of detection</i> , LoD)	2,64 ng/ml	6,6 nmol/l
Bestimmungsgrenze (<i>limit of quantitation</i> , LoQ)	6,08 ng/ml	15,2 nmol/l
Messbereich	6–160 ng/ml	15–400 nmol/l

Die Auswertung wurde gemäß der CLSI-Richtlinie EP-17-A durchgeführt.

Kalibriert an NIST standard reference material (SRM) 972.

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden mit Standard 1 (0 nmol/l) verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

Probe	Verdünnung	Messwert [nmol/l]	Sollwert [nmol/l]	Wiederfindung [%]
A	unverdünnt	80,7	80,7	
	75%	62,6	60,5	103,5
	50%	41,7	40,4	103,2
	25%	18,9	20,2	93,6
B	unverdünnt	100,8	100,8	
	75%	78,1	75,6	103,3
	50%	52,3	50,4	103,8
	25%	26,7	25,2	106,0

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 der Inkubationen mit beiliegender Folie abgedeckt 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 and 25-hydroxyvitamin 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

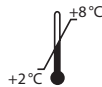
Manual

25(OH)-Vitamin D *direct day* ELISA Kit

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

Valid from 2015-05-26

REF K 2108



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	17
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	19
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	23
9. LIMITATIONS	23
10. QUALITY CONTROL	23
<i>Reference ranges for 25(OH) vitamin D₃</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	25
<i>Precision and reproducibility</i>	25
<i>Dilution recovery</i>	25
<i>Spiking Recovery</i>	26
<i>Analytical Sensitivity</i>	26
<i>Specificity</i>	27
12. PRECAUTIONS	27
13. TECHNICAL HINTS	27
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	28
15. REFERENCES	28

1. INTENDED USE

This Immundiagnostik ELISA is intended for the quantitative determination of the 25-OH-Vitamin D in serum and fresh plasma. 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 2108MTP	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 2108WP	WASHBUF	10x ELISA wash buffer concentrate phosphate buffered saline containing Triton X-100 and ProClin 300	2 x 100 ml
K 2108RS	RECSOL	Reconstitution solution phosphate buffered saline for dissociating 25-hydroxyvitamin D from binding protein; red coloured	2 x 20 ml
K 2108RR	RELREAG	Releasing reagent lyophilised phosphate buffered saline containing a vitamin D binding protein inhibitor	2 x 1 vial
K 2108AK	AB	Anti 25(OH)-vitamin D antibody, ready to use phosphate buffered saline containing monoclonal mouse antibodies, stabilisers and preservative	18 ml
K 2108ST	STD	Standards, ready to use buffered human serum containing 25-hydroxyvitamin D and 0.09% sodium azide	6 vials 300 µl each
K 2108KO	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 2108K	CONJ	Conjugate, peroxidase labeled, ready to use phosphate buffered saline containing anti mouse-HRP, stabilisers and preservative	24 ml
K 2108TMB	SUB	TMB substrate aqueous formulation of tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide	2 x 15 ml
K 2108AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use sulfuric acid	1 x 15 ml
K 2108FOL	FOL	Foil to cover the microtiter plate	3 x 1

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Deep freezer (-20°C)
- Calibrated precision pipettors and 10-1000 µl tips
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Standard laboratory vials, cups, etc. (single-use products) made of polypropylene
- Microtiter plate reader (450 nm, reference wave length 620 or 690 nm)
- Refrigerator

* 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.
- 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 in a water bath at 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 2 weeks**.
- Make sure that **RECSOL** (reconstitution solution) has reached room temperature before use. For example by warming it up for 10 minutes in a waterbath at 37 °C.
- Reconstitute **RELREAG** (releasing reagent) in **16 ml RECSOL** (reconstitution solution), mix gently by careful swinging (do not vortex). 16 ml RELREAG are enough to perform 48 single determinations, for 96 determinations both vials of RELREAG are needed. After reconstitution, RELREAG is stable for 4 weeks at 2–8 °C in the dark. For long term storage, freeze aliquots at -20 °C. It is then stable until the date of expiry (see label). Frozen RELREAG can be defrosted

and used only once. Pre-heat frozen releasing reagent to room temperature before use.

- Bring **AB** (antibody) at room temperature 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

1. Fresh 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.
2. **Serum** samples can be shipped at 4-8 °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. The room temperature should be checked with a thermometer. **Attention: We advise not to use a heatable incubator.**
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.

Standards, controls and patient samples which are assayed for 25(OH)-vitamin D are prediluted with the releasing reagent and transferred to the microplate coated with 25(OH)-vitamin D. After an incubation to release the 25(OH) vitamin D, 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.

Sample dilution

1	Prepare the amount of polypropylene reaction tubes needed.
2.	Pipet 20 µl of STD (standard)/ SAMPLE/CTRLs (control A and B) respectively, into the corresponding tube
3.	Reconstitute RELREAG (releasing reagent) (see chapter 5, page 19)
4.	Add 300 µl of RELREAG (releasing reagent) into each tube. The transfer of the diluted samples to the microtiter plate has to be done within 5–10 min.

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.

Test procedure

1.	Mark the positions of STD (standards)/ SAMPLE/CTRLs (control A and B) on a protocol sheet
2.	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
3.	Put 20 µl of the samples , diluted as described in the previous steps, speedily into the wells of the microtiter plate, cover the stripes with the enclosed foil and incubate at room temperature (18–28 °C) for 60 min* .

4.	Add 150 µl of AB (anti 25(OH)-vitamin D antibody) into each well
5.	Cover the plate again tightly with the enclosed foil and incubate for 45 min at room temperature.
6.	Aspirate and wash the wells 5 x with 250 µl of diluted wash buffer. 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
7.	Add 200 µl CONJ (conjugate) into each well
8.	Cover the plate again tightly with the enclosed foil and incubate for 45 min at room temperature.
9.	Aspirate and wash the wells 5 x with 250 µl of diluted wash buffer. Remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel after the last wash
10.	Add 200 µl of SUB (substrate) into each well
11.	Incubate for 10–15 minutes at room temperature in the dark
12.	Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well
13.	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

We recommend the 4-parameter algorithm for result calculation.

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).

The usage of the 4-parameter algorithm is strongly recommended. If it is not possible to use the 4-parameter algorithm for result calculation, it is possible to switch to a point-to-point calculation.

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.

9. LIMITATIONS

Samples with 25(OH)-vitamin D concentrations higher than the highest standard should be diluted e.g. 1+1 with standard 1 (= 0 nmol/l) (e.g. 50 µl sample + 50 µl standard 1) and re-assayed.

Whole blood is not suitable as a sample.

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 [nmol/l]	CV [%]
1	71.6	5.0
2	20.1	9.6

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

Sample	25(OH)-vitamin D [nmol/l]	CV [%]
1	33.3	12.1
2	48.5	9.2
3	79.6	8.6
4	109.9	8.8

Dilution recovery

Two samples were diluted with standard 1 (0 nmol/l) and used in the test. The results are shown in the following table.

Sample	Dilution	Observed [nmol/l]	Expected [nmol/l]	Recovery [%]
A	undiluted	80.7	80.7	
	75%	62.6	60.5	103.5
	50%	41.7	40.4	103.2
	25%	18.9	20.2	93.6
B	undiluted	100.8	100.8	
	75%	78.1	75.6	103.3
	50%	52.3	50.4	103.8
	25%	26.7	25.2	106.0

Spiking Recovery

This table shows the recovery rate of 25(OH) vitamin D₃ which was added to 3 different serum samples. Standard 5 (220 nmol/l) and standard 6 (600 nmol/l) were used for this test. All samples were measured in triplicates on three days. The table shows the average target values and obtained values.

Sample	Obtained value [nmol/l]	Target value [nmol/l]	Recovery [%]
A	57.5	56.5	101.8
	68.8	65.1	105.7
	79.1	75.5	104.8
	108.1	103.1	104.8
	161.2	158.4	101.8
B	33.2	32.2	103.1
	40.5	42.1	96.2
	47.5	51.2	92.8
	75.4	80.1	94.1
	129.4	137.9	93.8
C	36.6	35.6	102.8
	43.2	45.3	95.4
	52.8	54.6	96.7
	82.0	83.3	98.4
	142.8	140.7	101.5

Analytical Sensitivity

Limit of blank, LoB	1,08 ng/ml	2,7 nmol/l
Limit of detection, LoD	2,64 ng/ml	6,6 nmol/l
Limit of quantitation, LoQ	6,08 ng/ml	15,2 nmol/l
Measurement range	6–160 ng/ml	15–400 nmol/l

The evaluation was performed according to the CLSI guideline EP-17-A.

NIST standard reference material (SRM) 972 traceable.

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% |

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 the enclosed plate sealers during incubation steps is necessary.

- 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.
- 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-hydroxyvitamin 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