

25-OH-Vitamin D direct ELISA Kit

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

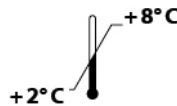
25-OH-Vitamin D direct ELISA Kit

For the determination of 25-OH-Vitamin D in human serum

Gültig ab / Valid from 12.02.2009



K 2106



EU Patent #EP1097132

Australisches Patent/Australian patent # 763458



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

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00
info@immundiagnostik.com

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30
www.immundiagnostik.com

Inhalt

Content	16
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
Testprinzip	5
Pipettierschema	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
Erwartete Ergebnisse	8
Präzision und Reproduzierbarkeit	9
Spezifität	9
Nachweisgrenze	9
Linearität	10
Korrelationsdaten	10
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	12
13. TECHNISCHE MERKMALE	12
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	13
15. LITERATUR	13

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die quantitative Bestimmung von 25-OH-Vitamin D aus humanem Serum. 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 (DBP) 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 DBP 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.

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 12–30 ng/ml bzw. 30–75 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 < 12 ng/ml bzw. < 30 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.

Häufigkeit von Vitamin D-Mangel:

Leichter Vitamin-D-Mangel aufgrund mangelnder UV-B-Bestrahlung (Sonnenmangel) oder verminderter Fähigkeit zur kutanen Vitamin D-Synthese (ältere Menschen) ist in Europa sehr häufig (Scharla 1998). In Deutschland leiden im Winter bis zu 1/3 der Normalbevölkerung über 50 Jahre an Vitamin-D-Mangel. Eine besondere Risikogruppe stellen Immigranten mit dunklerer Hautfarbe dar. Schwere Vitamin-D-Mangel kann bei geriatrischen Patienten in ca. 3 % der Behandlungsfälle nachgewiesen werden (Oster et al. 1983). Auch jüngere Menschen können bei Vorliegen gastrointestinaler Erkrankungen (Leberfunktionsstörungen, Malabsorption) oder bei verstärktem Metabolismus (Medikamente wie Antiepileptika) einen Vitamin-D-Mangel aufweisen.

In Deutschland liegen auch bei „Normalpersonen“ häufig niedrigere Spiegel vor. Diese sind jedoch bereits mit einem sekundären Parathormonspiegel assoziiert. 25-OH-Vitamin-D-Werte von 12–30 ng/ml bzw. 30–75 nmol/l werden deshalb von den meisten Autoren übereinstimmend als erniedrigt angesehen (subklinischer Vitamin D-Mangel).

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 2106MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 2106WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 20x	50 ml
K 2106RS	RECSOL	Rekonstitutionslösung	20 ml
K 2106RR	RELREAG	Freisetzungsreagenz	1 vial
K 2106AK	AB	Anti-25-OH-Vitamin D3 Antikörper, gebrauchsfertig	18 ml
K 2106CAL	CAL	Calibrator, gebrauchsfertig	1 x 300 µl
K 2106KO	CTRL	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 300 µl
K 2106K	CONJ	Konjugat (Peroxidase markiert), gebrauchsfertig	22 ml
K 2106TMB	SUB	TMB Substrat, gebrauchsfertig (Tetramethylbenzidine)	2 x 15 ml
K 2106SD	SAMDIL	Probenverdünnungspuffer	35 ml
K 2106AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Tiefkühlschrank -20 °C
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Wasserbad bzw. Heizblock
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)
- Kühlschrank mit definierten 8–10 °C

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Beim Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden. Der Kit kann bis zu 3 x je nach Probenaufkommen (Innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:20** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (50 ml Konzentrat + 950 ml aqua bidest), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C** in einem geschlossenen Gefäß **2 Wochen** haltbar.
- **RECSOL (Rekonstitutionslösung) 5 min im Wasserbad bei 37 °C erwärmen.**
- Das **RELREAG** (Freisetzungsreagenz) in **16 ml RECSOL** (Rekonstitutionslösung) auflösen, leicht mischen (nicht vortexen), 5 min bei RT stehen lassen. Nach Gebrauch restliches Freisetzungsreagenz aliquotieren und bei -20 °C einfrieren. Eingefrorenes Freisetzungsreagenz muss vor Gebrauch auf RT gebracht werden (z.B. **5 Minuten im Wasserbad** bei 37 °C inkubieren).
- **AB** (Antikörper) mindestens 1 Stunde vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar. **Ausnahme:** Nicht-verwendete Mikrotiterstreifen werden **abgeklebt** bei (2-8 °C) gelagert, und sind innerhalb von 4 Wochen zu verwenden.

6. PROBENVORBEREITUNG

1. Vitamin D ist eine stabile Substanz; die Proben können deshalb in der Regel bei Raumtemperatur gelagert werden. **Wir empfehlen aber**, die Proben nach der Abnahme bei 2-8 °C zu lagern. Sollte innerhalb dieser 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. Bevorzugt ist **Serum** als Probenmatrix einzusetzen; Vollblut ist nicht als Probenmaterial geeignet.
3. Bei der Durchführung des Assays sind die in der Anleitung genannten Inkubationszeiten und Temperaturen sorgfältig zu beachten.
4. 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-DBP-Komplex freigesetzt.

Standards, 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 pipettiert, welche mit 25-Hydroxyvitamin D beschichtet wurden. Anti-25-OH-Vitamin-D-Antikörper wird dazu pipettiert. In diesem über Nacht-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 – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben vorsichtig mischen. Schaumbildung vermeiden
2.	Positionen für CTRLA (Kontrolle A) / CTRLB (Kontrolle B) / CAL (Calibrator) / PROBE im Protokollblatt markieren
3.	RELREAG (Freisetzungsreagenz) rekonstituieren (siehe P. 5., Seite 4)
4.	V-Tubes (z.B. Eppendorf-Tube) beschriften
5.	30 µl CTRLA (Kontrolle A) / CTRLB (Kontrolle B) / CAL (Calibrator) / PROBE in die Tubes vorlegen
6.	300 µl RELREAG (Freisetzungsreagenz) zugeben und kurz vortexen
7.	1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad oder Heizblock (kein Brutschrank) inkubieren
8.	Tubes vorsichtig öffnen, 600 µl SAMDIL (Probenverdünungspuffer) in alle Tubes zugeben. Tubes wieder verschließen, kurz vortexen
9.	Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht-verwendete Mikrotiterstreifen werden abgeklebt bei (2-8 °C) gelagert, und sind innerhalb von 4 Wochen zu verwenden.
10.	50 µl CTRLA (Kontrolle A) / CTRLB (Kontrolle B) / CAL (Calibrator) / PROBE aus den V-Tubes in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren
11.	150 µl AB (anti 25-OH-Vitamin D3 Antikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
12.	Streifen abdecken und über Nacht (min. 18 – max. 22 Stunden) bei 8-10 °C im Dunkeln inkubieren
13.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Verwendung einer 8-Kanalpipette 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.	200 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
15.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren

16. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und **5x mit je 250 µl** verdünntem Waschpuffer waschen. Verwendung einer **8-Kanalpipette** wird empfohlen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
17. **200 µl SUB** (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
18. **15 - 20 Minuten** bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren
19. **50 µl STOP** (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren
20. **Extinktion** sofort im Mikrotiterplattenphotometer **bei 450 nm** gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

8. ERGEBNISSE

Verwenden Sie zur Auswertung des Testes die 4-Parameter-Funktion unter Berücksichtigung der Parameter (A,B,C und D) sowie der optischen Dichte des Kalibrators (CAL), welche auf dem QC-Datenblatt der jeweiligen Kitcharge zu finden sind. Die Konzentrationen der Proben werden anhand der, so erstellten Standardkurve ermittelt.

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

Proben mit einer 25-OH Vitamin D Konzentration größer dem größten Standard sollten mit RECSOL (Rekonstitutionslösung) verdünnt werden und nochmals im Assay eingesetzt werden.

Vollblut kann nicht verwendet werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz (wenn vorhanden) von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle.

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

Erwartete Ergebnisse

Normwert-Bereiche für 25-OH-Vitamin D₃

1 ng/ml = 2.5 nmol/l

1 nmol/l = 0.4 ng/ml

Information vom ASBMR 2006

Defizienz (schwerer Mangel)	< 12 ng/ml	bzw. < 30 nmol/l
Insuffizienz (Mangel)	12 – 30 ng/ml	bzw. 30 – 75 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

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 von dem Vitamin D Bindeprotein, DBP) und können daher nur zur Orientierung dienen.

Literaturreferenzen

Visser M, Deeg DJ, Puts MT, Seidell JC, Lips P. (2006) Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am J Clin Nutr.* Sep;84(3):616-22; quiz 671-2

Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. (2005) *Altern Med Rev.* Jun;10(2):94-111. Review

Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, Knol DL, Lips P. (2007) Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun;92(6):2058-65

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n = 20)		
Probe	25-OH-Vitamin D [nmol/l]	VK [%]
1	41.4	10.0

Inter-Assay (n = 20)		
Probe	25-OH-Vitamin D [nmol/l]	VK [%]
1	39.0	8.0

Spezifität

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

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 %

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als 2.0 nmol/l. (B₀ - 2SD). Standard Null wurde 20-mal gemessen.

Probe	Vitamin D Mittelwert [OD]	Standard- abweichung	Detektionslimit [nmol/l]
1	1.31	0.05	2.0

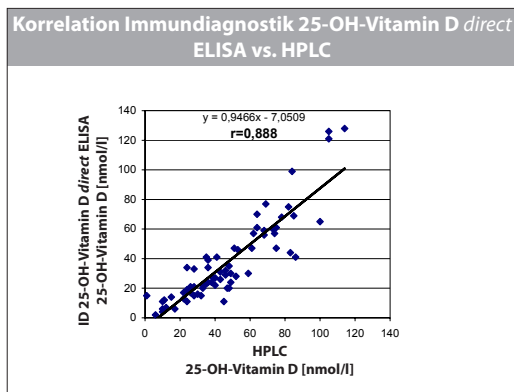
Linearität

Zwei Patientenproben wurden mit RECSOL (Rekonstitutionslösung) verdünnt. Die Ergebnisse in nmol/l werden in der folgenden Tabelle angezeigt.

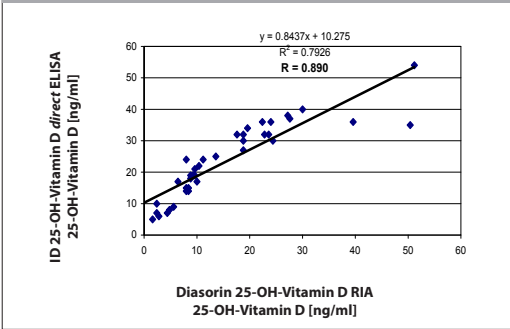
Probe	Verdünnung	Gemessen [nmol/l]	Sollwert [nmol/l]
A	unverdünnt	35.9	36.0
	1 : 2	18.4	18.0
	1 : 4	9.9	9.0
B	unverdünnt	118.0	120.0
	1 : 2	61.8	60.0
	1 : 4	27.8	30.0

Korrelationsdaten

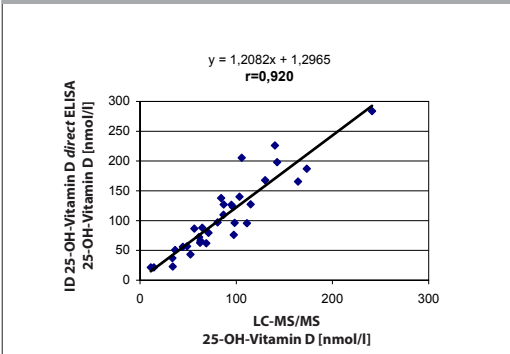
Gute Korrelation des Immundiagnostik 25-OH-Vitamin D direct ELISAS mit HPLC, RIA, LC-MS und ELISA:



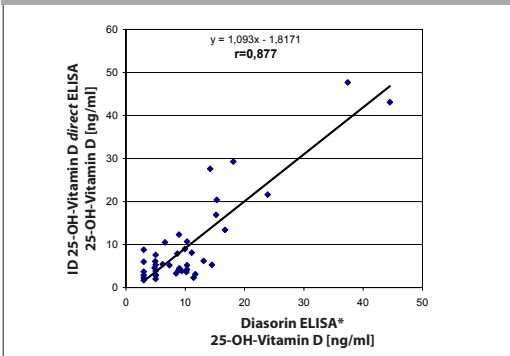
**Korrelation Immundiagnostik 25-OH-Vitamin D *direct*
ELISA vs. DiaSorin 25-OH-Vitamin D RIA**



**Korrelation Immundiagnostik 25-OH-Vitamin D *direct*
ELISA vs. LC-MS/MS (Massenspektrometrie)**



**Korrelation Immundiagnostik 25-OH-Vitamin D *direct*
ELISA vs. DiaSorin 25-OH-Vitamin D ELISA**



* Kollektiv: hauptsächlich Mangelpatienten

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Nur zur in vitro Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV und Hepatitis B und C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter 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 und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Inkubationszeit, Temperatur und Pipettierolumina sind vom Hersteller festgelegt. Jegliche Abweichung der Testvorschrift, die nicht mit dem Hersteller abgesprochen wurde, kann zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Immundiagnostik übernimmt keine Haftung.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik 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 zurück zu senden.

15. LITERATUR

1. Scharla SH et al. (1996) Exp Clin Endocrinol Diabetes 104:289-292
2. Scharla SH et al. (1998) Osteoporos Int 8 (Supplement 2):S7-S12
3. Chapuy MC et al. (1996) J Clin Endocrinol Metab 81:1129-33
4. Oster P et al. (1983) Akt Gerontol 13:221-2
5. Scharla S (1997) Schattauer Verlag, Stuttgart, Seiten 217-242
6. Offermann G (1978) Dtsch med Wschr 103:1387-1388

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

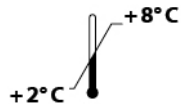
25-OH-Vitamin D direct ELISA Kit

For the determination of 25-OH-Vitamin D
in human serum

Valid from 12.02.2009



K 2106



EU patent #EP1097132

Australian patent # 763458

Content

1. INTENDED USE	17
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	17
3. MATERIAL SUPPLIED	18
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	19
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	19
7. ASSAY PROCEDURE	20
Principle of the test	20
Test procedure	20
8. RESULTS	22
9. LIMITATIONS	22
10. QUALITY CONTROL	22
Expected values	22
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	23
Precision and reproducibility	23
Specificity	24
Sensitivity	24
Linearity	24
Correlation data	25
12. PRECAUTIONS	26
13. TECHNICAL HINTS	27
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	27
15. REFERENCES	28

1. INTENDED USE

The Immundiagnostik ELISA is intended for the quantitative determination of the 25-OH-Vitamin D in serum. 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 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 (1,2).

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.

Frequency of vitamin D deficiency

Mild vitamin D deficiency caused by too low exposure to UV-B rays (sunlight deficiency) or decreased ability of cutaneous vitamin D synthesis (older persons) is very common in Europe. In Germany and France, approximately one third of the population over 50 years of age suffer from vitamin D deficiency during winter. Immigrants with dark skin present a special risk group. Serious vitamin D deficiencies can be detected in 3% of all geriatric patients. Vitamin D deficiencies can be observed even in young persons with gastrointestinal illnesses (liver function defects, malabsorption) or accelerated metabolism (from drugs such as antiepileptics).

In Germany, low values are very often detected in the general population. However, most of the cases are associated with a pre-existing secondary hyperparathyroidism. 25-hydroxyvitamin D values in the range 12-30 ng/ml, 30-75 nmol/l respectively, are considered as "decreased values" by the most authors (sub-clinical vitamin D deficiency).

3. MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No.	Content	Kit Components	Quantity
K 2106MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 2106WP	WASHBUF	ELISA wash concentrate 20x	50 mL
K 2106RS	RECSOL	Reconstitution solution	20 mL
K 2106RR	RELREAG	Releasing reagent	1 vial
K 2106AK	AB	Anti 25-OH-Vitamin D3 antibody ready to use	18 mL
K 2106CAL	CAL	Calibrator, ready to use	1 vial 300 µL
K 2106KO	CTRL	Controls, ready for use (see specification for range)	2 vials 300 µL each
K 2106K	CONJ	Conjugate, peroxidase labeled, ready to use	22 mL
K 2106TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	2 x 15 mL
K 2106SD	SAMDIL	Sample Dilution Buffer	35 mL
K 2106AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 mL

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Deep freezer -20 °C
- Precision pipettors calibrated to deliver 10–1000 µl
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Vortex-Mixer
- Water bath or heating block
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc. (one time products)
- Microtiter plate reader 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)
- Refridgerator with defined 8–10 °C

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. The kit can be used up to 3 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:20** before use (50 ml WASHBUF + 950 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or at 37°C in a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** can be stored in a closed flask at **2-8°C for two weeks**.
- **Pre-heat RECSOL (reconstitution solution) for 5 min at 37°C in a water bath before use.**
- Reconstitute **RELREAG** (releasing reagent) in **16 ml RECSOL** (reconstitution solution), mix gently (do not vortex), and leave at room temperature for 5 min. After use, aliquot, freeze remaining releasing reagent and store at -20 °C. Bring thawed releasing reagent **to room temperature before use** (e.g. incubate for 5 minutes at 37 °C in a water bath).
- 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:** Unused strips are covered and stored at 2-8° C. The covered strips should be used within 4 weeks.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. Vitamin D is an inert substance. The samples can be stored at room temperature. However, sample storage at 2-8°C is recommended when the analysis is performed within 24 h after collection. Otherwise, the samples must be stored at -20°C until analyzed. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
2. Prefer **serum** as sample matrix; whole blood is not suitable.
3. Indicated incubation times and temperatures must be strictly observed.
4. 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-hydroxy vitamin D. For a reliable determination of 25-OH-Vitamin D, it is necessary to release it from the 25-OH-Vitamin D-DBP-complex.

Standards, controls and patient samples which are assayed for 25-hydroxy vitamin D are incubated with the releasing reagent. The pre-incubated solutions are then transferred to the microplate coated with 25-hydroxy vitamin D, and an anti-25-hydroxy vitamin D antibody is added. During an over night incubation step, 25-hydroxy vitamin D in the sample and a fixed amount of 25-hydroxy 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-hydroxy vitamin D - anti-25-hydroxy 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-hydroxy 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-hydroxy vitamin D in the samples is determined from this curve.

Test procedure

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18 - 26 °C) and mix gentle, avoid foam formation
2.	Mark the positions of CTRLA (control A) / CTRLB (control B) / CAL (Calibrator) / SAMPLE on a protocol sheet
3.	Reconstitute RELREAG (Releasing reagent) (see P.5., Page 19)
4.	Label V-tubes (e.g. 1.5 ml Eppendorf-tubes)
5.	Pipette 30 µl of CTRLA (control A) / CTRLB (control B) / CAL (Calibrator) / SAMPLE into the corresponding tube
6.	Add 300 µl of RELREAG (releasing reagent) into each tube, vortex shortly
7.	Incubate for 1 hour at 37 °C in a water bath or heating block (do not use an incubator)
8.	Open tubes carefully and add 600 µL SAMDIL (sample dilution buffer). Close the tubes and vortex carefully.

9.	Take microtiter strips out of the kit. Unused strips are covered and stored at 2-8° C. The covered strips should be used within 4 weeks
10.	Transfer 50 µl of CTRLA (control A) / CTRLB (control B) / CAL (Calibrator) / SAMPLE from the V-tubes in duplicate to respective well
11.	Add 150 µl of AB (anti 25-OH-Vitamin D ₃ antibody) into each well
12.	Cover the plate tightly and incubate over night (min. 18 – max. 22 hours) at 8-10 °C in the dark
13.	Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. The use of 8-channel pipette 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 200 µl CONJ (Conjugate) into each well
15.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature while shaking
16.	Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer. The use of 8-channel pipette is recommended. Remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel after the last wash
17.	Add 200 µl of SUB (Substrate) into each well
18.	Incubate for 15 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark
19.	Add 50 µl of STOP (Stop solution) into each well
20.	Determine the absorption with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wave length is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm (690 nm) as a reference

8. RESULTS

For evaluation of the test results, a single-point calibration via a standard curve described by a 4 parameter curve fit is used. The four parameters A, B, C and D as well as the OD value of the calibrator (CAL) are given on the QC certificate of the kit. Results of the samples are read from the constructed calibration curve.

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

Samples with a 25-OH Vitamin D level greater than the highest calibrator should be diluted with RECSOL (reconstitution solution) and re-assayed.

Whole blood is not suitable.

10. QUALITY CONTROL

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

Expected values

Normal ranges for 25-OH-Vitamin D₃

1 ng/ml = 2.5 nmol/l

1 nmol/l = 0.4 ng/ml

Information from ASBMR 2006

Deficiency (seriously deficient)	< 12 ng/ml	resp. < 30 nmol/l
Insufficiency (deficient)	12 - 30 ng/ml	resp. 30 - 75 nmol/l
Sufficiency (adequately supplied)	> 30 ng/ml	resp. > 75 nmol/l

Society of Osteology **SACHSEN E. V.**

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

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, DBP) and serve only as orientation.

Literature references

Visser M, Deeg DJ, Puts MT, Seidell JC, Lips P. (2006) Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am J Clin Nutr.* Sep;84(3):616-22; quiz 671-2

Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. (2005) *Altern Med Rev.* Jun;10(2):94-111. Review

Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, Knol DL, Lips P. (2007) Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun;92(6):2058-65

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)		
Sample	25-OH-Vitamin D [nmol/L]	CV [%]
1	41.4	10.0

Inter-Assay (n = 20)		
Sample	25-OH-Vitamin D [nmol/L]	CV [%]
1	39.0	8.0

Specificity

The specificity was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds having structural similarity to 25-OH-Vitamin D. The specificity is calculated in per cent, based on the cross-reactivity with the anti-25-OH-Vitamin D antibody:

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 %

Sensitivity

The sensitivity was set as B₀ - 2SD. The zero-standard was measured 20 times.

Sensitivity n=20

Sample	Vitamin D mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [nmol/L]
1	1.31	0.05	2.0

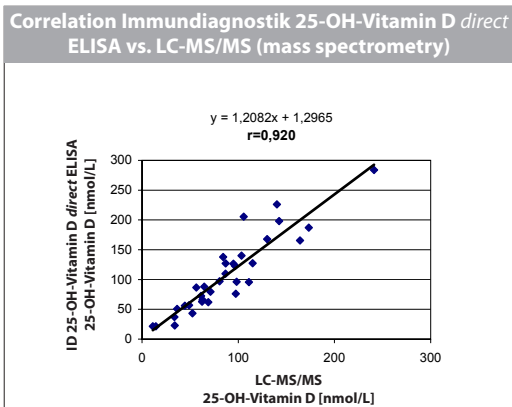
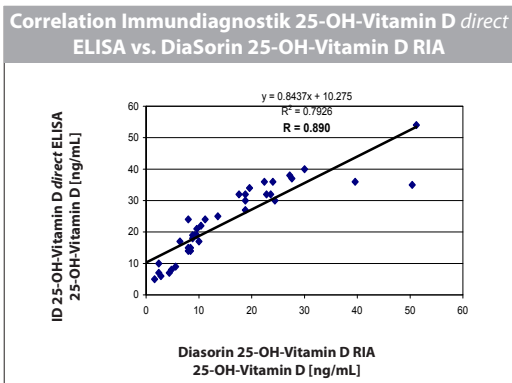
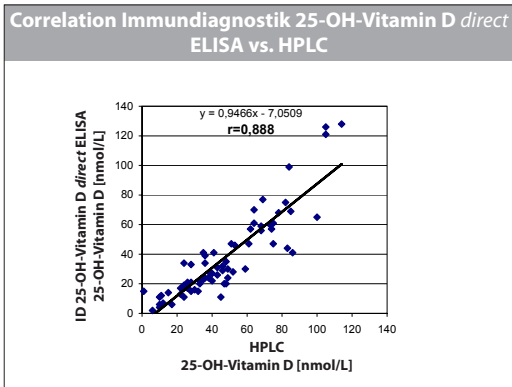
Linearity

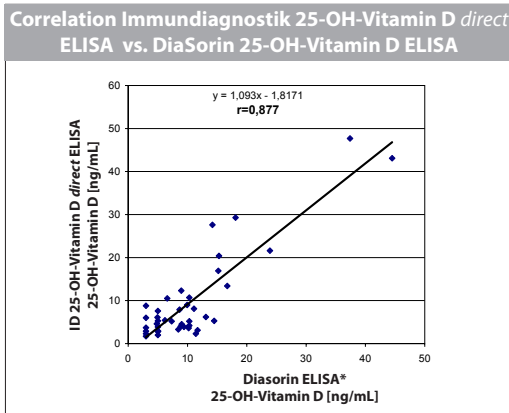
Two patient's serum samples were diluted with RECSOL (reconstitution solution) and analyzed. The results in nmol/l are shown below:

Sample	Dilution	Observed [nmol/L]	Expected [nmol/L]
A	undiluted	35.9	36.0
	1 : 2	18.4	18.0
	1 : 4	9.9	9.0
B	undiluted	118.0	120.0
	1 : 2	61.8	60.0
	1 : 4	27.8	30.0

Correlation data

Good correlation with HPLC / RIA / LC-MS / ELISA:





** mainly patients with Vitamin-D deficiencies were tested.*

12. PRECAUTIONS

- For in vitro diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be observed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide and thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are described to be also toxic and carcinogenic. Contact with skin or mucous membranes has to be avoided.
- Stop solution consists of sulfuric 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 out immediately with copious quantities of water.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

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

15. REFERENCES

1. Scharla SH et al. (1996) Exp Clin Endocrinol Diabetes 104:289-292
2. Scharla SH et al. (1998) Osteoporos Int 8 (Supplement 2):S7-S12
3. Chapuy MC et al. (1996) J Clin Endocrinol Metab 81:1129-33
4. Oster P et al. (1983) Akt Gerontol 13:221-2
5. Scharla S (1997) Schattauer Verlag, Stuttgart, Seiten 217-242
6. Offermann G (1978) Dtsch med Wschr 103:1387-1388

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49(0) 62 51/70 19 00

Fax: +49(0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com