

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

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

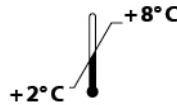
25(OH)-Vitamin D *direct* ELISA Kit

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

Gültig ab / Valid from 28.03.2011



K 2109



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	18
1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG	4
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	6
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Erwartete Ergebnisse</i>	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	9
<i>Spezifität</i>	10
<i>Tag-zu-Tag Variation</i>	10
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	11
<i>Spike-Wiederfindung</i>	12
<i>Korrelationsdaten</i>	13
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	13
13. TECHNISCHE MERKMALE	14
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	14
15. LITERATUR	15

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 ultravioletem 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.

Die Präanalytische Stabilität von 25(OH)-Vitamin D in humanem Blut oder Serum bei Raumtemperatur: stabil wie ein Fels in der Brandung (Wielders 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 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. Schwerer 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.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K 2109MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 2109WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 20x	50 ml
K 2109RS	RECSOL	Rekonstitutionslösung	2 x 20 ml
K 2109RR	RELREAG	Freisetzungsreagenz	2 x 1 vial
K 2109AK	AB	Anti-25(OH)-Vitamin D Antikörper, gebrauchsfertig	18 ml
K 2109ST	STD	Standards, gebrauchsfertig	6 x 300 µl
K 2109KO	CTRL	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 300 µl
K 2109K	CONJ	Konjugat (Peroxidase markiert), gebrauchsfertig	22 ml
K 2109TMB	SUB	TMB Substrat, gebrauchsfertig (Tetramethylbenzidine)	2 x 15 ml
K 2109SD	SAMDIL	Probenverdünnungspuffer	60 ml
K 2109AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 2109FOL	FOL	Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	2 x 1

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) aus Polypropylen
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)
- Kühlschrank mit **definierten 8–10 °C**

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Kitkonfektionierung für 96 Einfachbestimmungen. Eine Volumenreduzierung der Probe und der Puffer führt zu falschen Ergebnissen.
- Beim Mehrfachansatz der Platte ist bitte darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden. Der Kit kann bis zu 2 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) **mind. 20 min im Wasserbad bei 37 °C erwärmen.**
- Das **RELREAG** (Freisetzungsreagenz) in **16 ml vorgewärmten RECSOL** (Rekonstitutionslösung) auflösen, leicht durch vorsichtiges Schwenken mischen (nicht vortexen). Das rekonstituierte RELREAG kann direkt auf die vorbereiteten Proben pipettiert bzw. bis zur Benutzung bei 37 °C im Wasserbad zwischengelagert werden. Nach Gebrauch restliches Freisetzungsreagenz aliquotieren und bei -20 °C einfrieren. Es kann nach dem Einfrieren noch 1x aufgetaut bzw. genutzt werden. Eingefrorenes Freisetzungsreagenz muss vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt werden (z.B. **mind. 20 Minuten im Wasserbad bei 37 °C** inkubieren). Danach kann es sofort verwendet werden.
- **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:** 1. Nicht-verwendete Mikrotiterstreifen werden **abgeklebt** bei 2-8 °C gelagert, und sind innerhalb von 4 Wochen zu verwenden. 2. Restliches RELREAG bei -20 °C lagern.

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.
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-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(OH)-Vitamin 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 erstellt – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – 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. Hierfür Kit öffnen und benötigte Einzelkomponenten entnehmen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben vorsichtig mischen. Schaumbildung vermeiden
2.	Positionen für STD (Standards)/PROBE/CTRL (Kontrolle) im Protokollblatt markieren
3.	V-Tubes (z.B. Eppendorf-Tube) beschriften
4.	30 µl STD (Standard)/ PROBE/CTRL (Kontrolle) in die Tubes vorlegen
5.	RELREAG (Freisetzungsreagenz) rekonstituieren (siehe P. 5., Seite 4)
6.	300 µl RELREAG (Freisetzungsreagenz) zugeben und kurz vortexen
7.	1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad oder Heizblock (kein Brutschrank) inkubieren. Es sollte gewährleistet sein, dass das Wasserbad bzw. der Heizblock die 37° C vor Inkubationsbeginn erreicht hat
8.	Tubes vorsichtig öffnen, 600 µl SAMDIL (Probenverdünnungspuffer) in alle Tubes zugeben. Tubes wieder verschließen, kurz vortexen
9.	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
10.	50 µl STD (Standard)/ PROBE/CTRL (Kontrolle) aus den V-Tubes in die Mikrotiterstreifen pipettieren
11.	150 µl AB (anti 25(OH)-Vitamin D Antikörper) in alle Vertiefungen pipettieren
12.	Streifen mit beiliegender Abdeckfolie abkleben 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 Resten 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 mit beiliegender Abdeckfolie abkleben 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. | 10 - 15 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren |
| 19. | 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren |
| 20. | 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. |

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 von 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

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 gebrauchsfertigem 1x Waschpuffer maximal 1+1 verdünnt werden (z. B. 50 µl Probe + 50 µl 1x Waschpuffer) 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 mitzumessen. 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

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

Umrechnungsfaktor

1 ng/ml = 2.5 nmol/l

1 nmol/l = 0.4 ng/ml

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

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

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 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

Soldin OP, Sharma H, Husted L, Soldin SJ. (2009) Pediatric reference intervals for aldosterone, 17 α -ph-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* Jun;42(9):823-7.

11. TESTCHARAKTERISTIKA*Präzision und Reproduzierbarkeit*

Intra-Assay (n = 20)		
Probe	25(OH)-Vitamin D [nmol/l]	VK [%]
1	72,3	7,0

Inter-Assay (n = 20)		
Probe	25(OH)-Vitamin D [nmol/l]	VK [%]
1	84,0	7,0

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 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 %

Leerwert (LoB) = 1.04 ng/ml bzw. 2.6 nmol/l

Nachweisgrenze (LoD) = 1.28 ng/ml bzw. 3.2 nmol/l

Bestimmungsgrenze (LoQ) = 4.80 ng/ml bzw. 12 nmol/l

Messbereich = 4.80 - 96 ng/ml bzw. 12 - 240 nmol/l

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

Tag-zu-Tag Variation

Vier Proben wurden innerhalb von 21 Tagen jeden Tag gemessen. Die Ergebnisse in nmol/l sind in der folgenden Tabelle angezeigt.

Probe	Vitamin D Mittelwert [nmol/l]	VK [%]
1	29,8	14,6
2	45,5	13,1
3	70,8	7,3
4	104,3	7,5

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben wurden mit gebrauchsfertigem 1x Waschpuffer versetzt und gemessen. Die Ergebnisse in nmol/l sind in der folgenden Tabelle angezeigt.

Probe	Verdünnung	Gemessen [nmol/l]	Sollwert [nmol/l]	Wiederfindung [%]
A	unverdünnt	54,5	54,5	
	90%	50,1	49,1	102
	80%	43,4	43,6	100
	70%	36,4	38,2	95
	60%	31,2	32,7	95
	50%	27,4	27,3	101
B	unverdünnt	77,0	77,0	
	90%	68,0	69,3	98
	80%	59,5	61,6	97
	70%	54,8	53,9	101
	60%	44,6	46,2	97
	50%	31,5	38,5	82

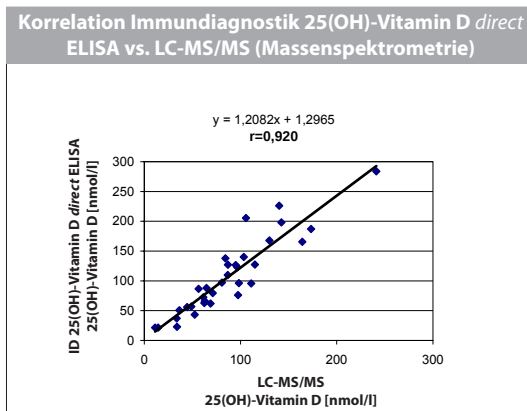
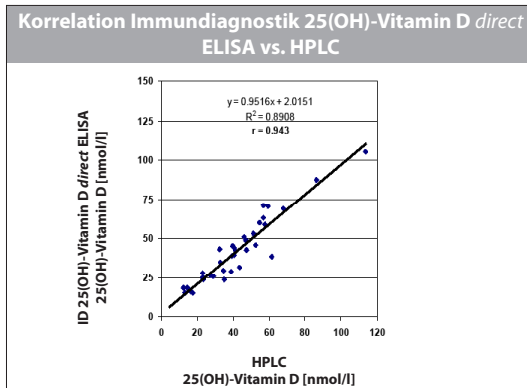
Spike-Wiederfindung

Drei Proben wurden mit verschiedenen Standardmengen versetzt und gemessen. Die Ergebnisse in nmol/l sind in der folgenden Tabelle angezeigt.

Sample	Spike [nmol/L]	Sollwert [nmol/L]	Gemessener Wert [nmol/L]	Wiederfindung [%]
6,4	0			
	18,75	25,15	25,80	102,6
	37,50	43,90	35,70	81,3
	75,00	81,40	66,50	81,7
	150,00	156,40	126,90	81,1
	225,00	231,40	204,70	88,5
33,9	0			
	18,75	52,65	49,30	93,6
	37,50	71,40	73,50	102,9
	75,00	108,90	104,80	96,2
	150,00	183,90	185,70	101,0
	225,00	258,90	256,80	99,2
17,2	0			
	18,75	35,95	34,30	95,4
	37,50	54,70	48,00	87,8
	75,00	92,20	81,20	88,1
	150,00	167,20	151,80	90,8
	225,00	242,20	240,80	99,4

Korrelationsdaten

Exzellente Korrelation des Immundiagnostik 25(OH)-Vitamin D *direct* ELISAs mit HPLC und LC-MS/MS:



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 Pipettiervolumina 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 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 Firma Immundiagnostik AG 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
7. Wienders JP, Wijnberg FA. (2009) Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. Clin Chem. Aug;55(8):1584-5

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

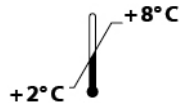
25(OH)-Vitamin D *direct* ELISA Kit

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

Valid from 28.03.2011



K 2109



EU patent #EP1097132

Australian patent # 763458

Content

1. INTENDED USE	19
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	20
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	21
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	21
7. ASSAY PROCEDURE	22
<i>Principle of the test</i>	22
<i>Test procedure</i>	22
8. RESULTS	24
9. LIMITATIONS	24
10. QUALITY CONTROL	24
<i>Expected values</i>	24
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	26
<i>Precision and reproducibility</i>	26
<i>Specificity</i>	26
<i>Day-to-Day Variation</i>	27
<i>Dilution Recovery</i>	27
<i>Spiking Recovery</i>	28
<i>Correlation data</i>	29
12. PRECAUTIONS	29
13. TECHNICAL HINTS	30
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	30
15. REFERENCES	31

1. INTENDED USE

The 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 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).

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

Catalogue No.	Content	Kit Components	Quantitiy
K 2109MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 2109WP	WASHBUF	ELISA wash concentrate 20x	50 mL
K 2109RS	RECSOL	Reconstitution solution	2 x 20 mL
K 2109RR	RELREAG	Releasing reagent	2 x 1 vial
K 2109AK	AB	Anti 25(OH)-vitamin D antibody ready to use	18 mL
K 2109ST	STD	Standards, ready to use	6 vials 300 µL each
K 2109KO	CTRL	Controls, ready for use (see specification for range)	2 vials 300 µL each
K 2109K	CONJ	Conjugate, peroxidase labeled, ready to use	22 mL
K 2109TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	2 x 15 mL
K 2109 SD	SAMDIL	Sample Dilution Buffer	60 mL
K 2109AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 mL
K 2109FOL	FOL	Foil to cover the microtiter plate	2 x 1

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) made of polypropylene
- Microtiter plate reader 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- 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 kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- The **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 at least 20 min at 37°C in a water bath before use.**
- Reconstitute **RELREAG** (releasing reagent) in **16 ml pre-heated RECSOL** (reconstitution solution), mix gently by careful swinging (do not vortex). The reconstituted RELREAG can be directly added into the prepared samples or kept at 37 °C in a water bath until use. After use, aliquot, freeze remaining releasing reagent and store at -20 °C. Frozen RELREAG can be defrosted and used only once. Pre-heat frozen releasing reagent to 37° C before use (e.g. incubate for **at least 20 minutes at 37° C in a waterbath**). Subsequently, it can be used right away.
- 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:** 1. Unused strips are covered and stored at 2-8° C. The covered strips should be used within 4 weeks. 2. The remaining RELREAG is stored at -20 °C.

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.
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-DBP-complex.

Standards, controls and patient samples which are assayed for 25(OH)-vitamin D are incubated with the releasing reagent. The pre-incubated solutions are then transferred to the microplate coated with 25(OH)-vitamin D, and an anti-25(OH)-vitamin D antibody is added. During an over night 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

- | | |
|----|---|
| 1. | Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18 - 26 °C). For this purpose, open the kit, take out the needed individual components and mix gentle avoiding foam formation |
| 2. | Mark the positions of STD (Standards)/SAMPLE/CTRL (Control) on a protocol sheet |
| 3. | Label V-tubes (e.g. 1.5 ml Eppendorf-tubes) |
| 4. | Pipette 30 µl of STD (Standard)/ SAMPLE/CTRL (Control) respectively, into the corresponding tube |
| 5. | Reconstitute RELREAG (Releasing reagent) (see P. 5., Page 21) |
| 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). Before starting the incubation, ensure that the temperature of the water bath or heating block has reached 37 °C and is maintained constant during the incubation
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 microtiter module. Unused strips must be covered with the enclosed foil, stored at 2-8° C and used within 4 weeks
10.	Transfer 50 µl of STD (Standard)/ SAMPLE/CTRL (Control) from the V-tubes to respective well
11.	Add 150 µl of AB (anti 25(OH)-Vitamin D antibody) into each well
12.	Cover the plate tightly with the enclosed foil 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 with the enclosed foil 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 10 - 15 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark
19.	Add 50 µl of STOP (Stop solution) into each well
20.	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.

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. 0.01).

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.

9. LIMITATIONS

Samples with 25(OH)-vitamin D concentrations higher than the highest standard should be diluted maximally 1+1 with ready-prepared 1x wash buffer (e. g. 50 µl sample + 50 µl 1x wash buffer) and re-assayed.

Whole blood is not suitable as a sample.

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

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

Conversion factor

1 ng/ml = 2.5 nmol/l

1 nmol/l = 0.4 ng/ml

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

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

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, 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

Soldin OP, Sharma H, Husted L, Soldin SJ. (2009) Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* Jun;42(9):823-7.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)		
Sample	25(OH)-Vitamin D [nmol/L]	CV [%]
1	72.3	7.0

Inter-Assay (n = 20)		
Sample	25(OH)-Vitamin D [nmol/L]	CV [%]
1	84.0	7.0

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 per cent, 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 %

Limit of Blank (LoB) =	1.04 ng/ml	resp. 2.6 nmol/l
Limit of Detection (LoD) =	1.28 ng/ml	resp. 3.2 nmol/l
Limit of Quantitation (LoQ) =	4.80 ng/ml	resp. 12 nmol/l
Working range =	4.80 - 96 ng/ml	resp. 12 - 240 nmol/l

The evaluation is performed according to the CLSI-Guideline:EP-17-A.

Day-to-Day Variation

Four samples were measured every day within 21 days. The results in nmol/l are shown below:

Sample	Vitamin D mean value [nmol/l]	VC [%]
1	29.8	14.6
2	45.5	13.1
3	70.8	7.3
4	104.3	7.5

Dilution Recovery

To two serum samples were diluted with ready-prepared 1x wash buffer. The samples were analyzed and the results shown below:

Sample	Dilution	Observed [nmol/l]	Expected [nmol/l]	Recovery [%]
A	undiluted	54.5	54.5	
	90%	50.1	49.1	102
	80%	43.4	43.6	100
	70%	36.4	38.2	95
	60%	31.2	32.7	95
	50%	27.4	27.3	101
B	undiluted	77.0	77.0	
	90%	68.0	69.3	98
	80%	59.5	61.6	97
	70%	54.8	53.9	101
	60%	44.6	46.2	97
	50%	31.5	38.5	82

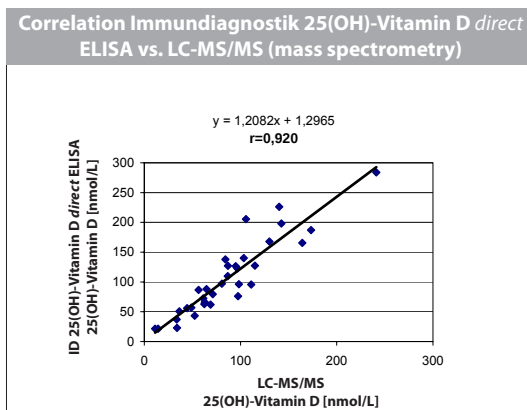
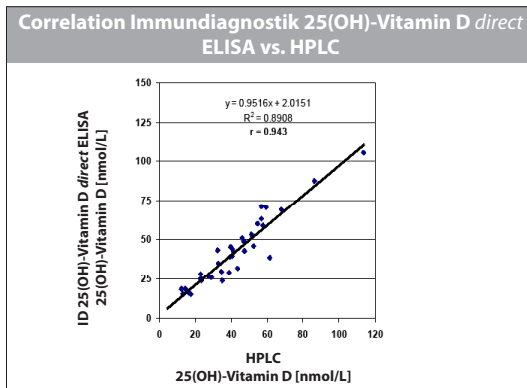
Spiking Recovery

To three serum samples different standard amounts were added. The samples were analyzed and the results shown below:

Sample	Spike [nmol/L]	Target Value [nmol/L]	Obtained Value [nmol/L]	Recovery [%]
6.4	0			
	18.75	25.15	25.80	102.6
	37.50	43.90	35.70	81.3
	75.00	81.40	66.50	81.7
	150.00	156.40	126.90	81.1
	225.00	231.40	204.70	88.5
33.9	0			
	18.75	52.65	49.30	93.6
	37.50	71.40	73.50	102.9
	75.00	108.90	104.80	96.2
	150.00	183.90	185.70	101.0
	225.00	258.90	256.80	99.2
17.2	0			
	18.75	35.95	34.30	95.4
	37.50	54.70	48.00	87.8
	75.00	92.20	81.20	88.1
	150.00	167.20	151.80	90.8
	225.00	242.20	240.80	99.4

Correlation data

Excellent correlation with *direct* ELISA and LC-MS/MS results.



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 AG 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
7. Wielders JP, Wijnberg FA. (2009) Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. Clin Chem. Aug;55(8):1584-5.

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