

25-OH Vitamin D EIA Kit

(EPBA)

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

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

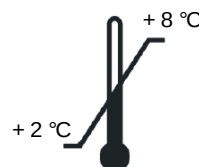
Gültig ab / Valid from 29.10.2009



K 2110



96



EU Patent
Australisches Patent/Australian patent

#EP1097132
763458

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 / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Immuno-Assay (EIA) ist für die quantitative Bestimmung von 25-OH Vitamin D aus humanem Serum und 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 (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. 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 Hyperkalziämiesyndrom 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. Schwerer 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.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 2110MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 2110WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 2110AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 2110BP	VDBP	Vitamin D Bindungsprotein (VDBP, blauer Verschluss), lyophilisiert	1 vial
K 2110AK	AB	Anti VDBP Antikörper, gebrauchsfertig (gelbe Flüssigkeit)	1 x 11 ml
K 2110F	PREC	Fällungsreagenz (blaue Flüssigkeit), gebrauchsfertig	1 x 50 ml
K 2110ST	STD	Standards und NSB,(O; 6.4; 16; 40; 100; 250 nmol/l), (weißer Verschluss), gebrauchsfertig	7 vials
K 2110KO	CTRL	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 vials
K 2110K	CONJ	Konjugat (Peroxidase markiertes), gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 2110TMB	SUB	TMB Substrat, gebrauchsfertig (Tetramethylbenzidine)	2 x 15 ml
K 2110AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Tiefkühlschrank -20 °C
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenreader mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

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 und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 4 x je nach Probenaufkommen (Innerhalb des angegebenen Verfallsdatums) verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch kurz anzentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 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 1 Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **ASYBUF** (Assaypuffer) muss vor Gebrauch **10 Minuten im Wasserbad bei 37 °C** inkubieren.

- **Vitamin D-bindendes Protein** (Blaue Verschlußkappe): Auflösen in **11 ml** Assay-Puffer, gut mischen (nicht vortexen). Mehrfaches Auftauen/Einfrieren soll vermieden werden (*Hinweis*: es wird ein portioniertes Einfrieren des gelösten VDBP in entsprechenden Aliquots empfohlen (verschließbare Glasgefäße). Eingefrorenes Bindungsprotein muss vor Gebrauch **10 Minuten im Wasserbad** bei 37 °C inkubieren.
- *Anmerkung*: es wird empfohlen, während der Inkubation der Proben das VDBP bei **Raumtemperatur 30 Minuten** aufzulösen.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND LAGERUNG

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. **Hämolyse** stört das Ergebnis nicht; **Vollblut** darf aber nicht als Probenmaterial eingesetzt werden.
3. **Lipämisches** Probenmaterial führt- falls unbehandelt- zu falschen Ergebnissen. Wir empfehlen daher:
 - a.) Lipämische Proben scharf abzentrifugieren (10 min. bei ca. 13.000 x g)
Dabei schwimmt die Fettphase nach oben; die wässrige Phase kann dann durch die Fettschicht hindurch mit der Pipette abgenommen werden.
 - b.) Für stark lipämisches Material empfehlen wir die Verwendung unseres Delipidierungs-Kits (Bestell-Nr. K 1003A), der speziell für lipämisches Probenmaterial im klinischen Labor entwickelt wurde.
4. Bei der Durchführung des Assays sind die in der Anleitung genannten Inkubationszeiten und Temperaturen sorgfältig zu beachten.
5. Vor der Fällung müssen die Proben gut gemischt werden.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser Testkit arbeitet nach dem Prinzip eines kompetitiven Protein-Bindungs-Assay. Das 25-(OH)-Vitamin D der Probe konkurriert mit dem Tracer (25-OH-Vit. D) um die Bindung an das Vitamin D-bindende Protein (VDBP, Gc-Globulin). Da *in vivo* das gesamte zirkulierende 25-(OH)-Vit D an VDBP gebunden vorliegt, müssen die Proben mit Fällungsreagenz präzipitiert werden, um den Analyt freizusetzen. Der alkoholische Überstand kann dann ohne weitere Vorbehandlung im Test eingesetzt werden.

Im ersten Inkubationsschritt wird Probe bzw. Standard und NSB, Vitamin D Bindungsprotein und ein VDBP-spezifischer Antikörper pipettiert. Das 25-(OH)-Vit D der Probe (Standard) kompetitiert mit dem Tracer um die spezifische Bindung an das VDBP. Mit steigender Analyt-Konzentration in der Probe (Standard) wird weniger VDBP über den Tracer auf der Platte immobilisiert. Anschließend wird gewaschen (ungebundenes VDBP wird entfernt). Über ein Antikörper-Peroxidase/TMB-System wird das VDBP schließlich quantifiziert. Nach Zugabe einer Stopplösung wechselt die Farbe von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard) umgekehrt proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

Extraktion

Vorbereitung der Proben, Standards, NSB und Kontrollen:

- **50 µl** Standard, Kontrolle, NSB und Proben in einem Glas- oder Plastikröhrchen (V-Tube) bei Raumtemperatur pipettieren.
- **400 µl** Fällungsreagenz zu Standard, Kontrolle, NSB und Proben geben, gut vortexen (10s) und dann für 30 min. bei –20 °C inkubieren.
- 10 min. bei 4 °C und 3000 x g zentrifugieren. Es ist unbedingt notwendig die zentrifugierten Proben sofort zu kühlen (Eis oder Kühllakku). Der Überstand sollte sofort nach dem Zentrifugieren in die Mikrotiterplatte überführt werden. **Die Kühlung der Proben sollte während des Transfers auf die Mikrotiterplatte gewährleistet sein.**

Wir empfehlen während der Inkubation der Proben, das VDBP bei **Raumtemperatur 30 Minuten** aufzulösen.

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. Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) im Protokollblatt
3. Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Ablaufdatum bei (2-8 °C) gelagert werden.
4. Stellen Sie die Mikrotiterplatte und die gefällten STD/PROBE/CTRL auf einen Kühlblock oder Eis . Die Mikrotiterplatte und gefällten STD/PROBE/CTRL müssen während des gesamten Pipettiervorgangs gekühlt werden.
5. Pipettieren Sie 20 µl STD /SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen
6. Pipettieren Sie 100 µl VDBP (Bindepotein) in alle Vertiefungen, außer der NSB
7. Pipettieren Sie 100 µl ASYBUF (Assaypuffer) in die NSB Vertiefungen
8. Pipettieren Sie 100 µl AB (anti-VDBP-Antikörper) in alle Vertiefungen
9. Streifen abdecken und 3 Stunden bei 8-10 °C im Dunkeln inkubieren
10. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
11. Pipettieren Sie 200 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen
12. Streifen abdecken und 1 Stunde bei 8 - 10°C im Dunkeln inkubieren

13. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpufferwaschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
14. Pipettieren Sie 200 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen
15. 20 -30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren
16. Pipettieren Sie 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen
17. 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

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

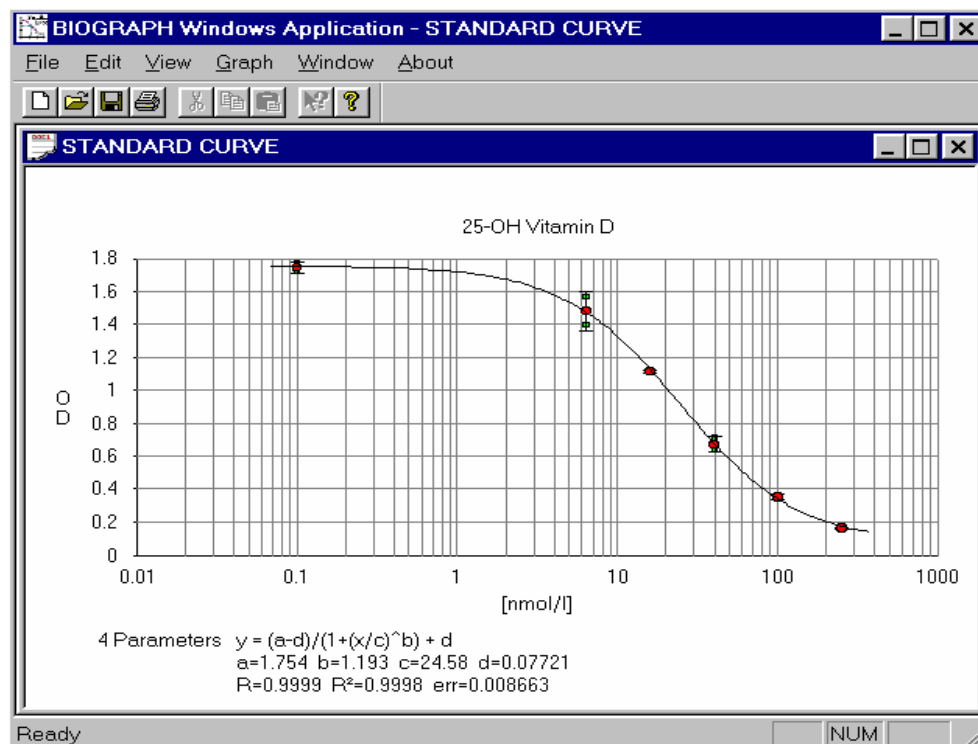
Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-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).

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.

Mustereichkurve



Standards	B/BO Mittelwert [%]	B/BO Median [%]	SD B/B0 [%] n = 17
NSB			
1	100	100	0
2	85	86	5.7
3	70	69	6.9
4	40	42	9.2
5	22	22	4.5
6	13	14	3.6

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer 25-OH Vitamin D Konzentration größer dem größten Standard sollten mit vorgewärmtem ASYBUF (Assaypuffer; 37°C) verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

Vollblut kann nicht verwendet werden. Lipämische Proben führen zu falschen Ergebnissen.

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	4,5	10.7

Inter-Assay (n=20)		
Probe	25-OH Vitamin D [nmol/l]	Vk [%]
1	39.8	13,2
2	86,7	11,8

Spezifität

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

24,25-(OH) ₂ Vit D ₃	100 %
25-(OH)-Vit D ₂	100 %
25-(OH)-Vit D ₃	100 %
1,25-(OH) ₂ Vit D ₃	< 1 %
Vit D ₂ & D ₃	< 1 %
Alphacalcidol	< 0.001 %

Wiederfindung

10 Plasmaproben wurden mit 156 nmol/l 25-(OH) Vit D Plasmastandard gespiked und im Assay bestimmt. Die Wiederfindung betrug 94%.

Spike [nmol/ml]	Vitamin D gemessen [nmol/l]	Wiederfindung [%]
156	146,7	94

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als 5.6 nmol/l. (B0 + 2SD)

Probe	Vitamin D Mittelwert [OD]	Standard- abweichung	Detektionslimit [nmol/l]
1	2.058	0.084	5.6

Linearität

Zwei Patientenproben wurden mit vorgewärmtem ASYBUF (Assaypuffer; 37°C) verdünnt. Die Ergebnisse in nmol/l werden in der folgenden Tabelle angezeigt.

Probe	Verdünnung	Gemessen [nmol/l]	Sollwert [nmol/l]
A	unverdünnt	135.8	135.8
	1:2	54.5	67.9
	1:4	30.8	33.9
	1:8	10.8	16.9
B	unverdünnt	127.8	127.8
	1:2	62.7	63.9
	1:4	33.4	31.9
	1:8	15.4	15.9

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

Dieser Assay ist eine Gemeinschaftsentwicklung der Firmen Immundiagnostik, Bensheim und Biomedica, Wien.

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

25-OH Vitamin D EIA Kit

(EPBA)

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

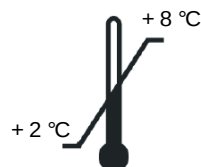
Valid from 29.10.2009



K 2110



96



EU Patent
Australisches Patent /Australien
patent

#EP1097132

763458

1. INTENDED USE

The *Immundiagnostik* Enzyme-Immuno-Assay (EIA) is intended for the quantitative determination of the 25-OH Vitamin D in plasma and 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 also by biosynthesis of 7-dehydrocholesterol and UV-light in skin because of 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 lately 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.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No	Content	Kit Components	Quantity
K 2110MTP	PLATE	one holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 2110WP	WASBUF	ELISA wash concentrate 10x	1 x 100 ml
K 2110AP	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	1 x 15 ml
K 2110BP	VDBP	Vitamin D binding protein (VDBP) (blue cap), lyophilized	1 vial
K 2110F	PREC	Precipitation Reagent (blue solution), ready to use	1 x 50 ml
K 2110AK	AB	Anti-VDBP antibody (yellow solution), ready to use	1 x 11 ml
K 2110ST	STD	Standards and NSB (0; 6.4; 16; 40; 100; 250 nmol/l) (white cap), ready to use	7 vials
K 2110KO	CTRL	Controls, ready for use (see specification for range)	2 vials
K 2110K	CONJ	Peroxidase labeled conjugate, ready to use	1 x 22 ml
K 2110TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine)	2 x 15 ml
K 2110AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Deep freezer -20 °C
- Precision pipettors calibrated to deliver 10-1000 µl
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc. (one time products)
- Microtiter plate reader 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are carefully stored at conditions stated on the label. Prepare just the appropriate amount necessary for the assay. The kit can be used up to 4 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with the less than **100 µl volume** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The ELISA **WASHBUF** (wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (add 900 ml of a. bidest. to 100 ml concentrate), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath **before dilution of the buffer solutions**. The buffer concentrates are stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** could be stored in a closed container at **2-8°C for 1 month**.
- Incubate the **ASYBUF** (Assay buffer) for **10 minutes at 37 °C** in a water bath before use.
- Dissolve **vitamin D binding protein** (VDBP, blue cap) in **11 ml** of assay buffer, mix well (no vortexer) and leave at room temperature for 30 min. Reconstituted VDBP is stable at -20°C until expiry date stated on the label. Avoid freezing/thawing cycles. We recommend to aliquot the VDBP (use glass containers). Frozen VDBP have to incubate for 10 minutes at 37 °C in a water bath before use. Avoid repeated freeze-thaw cycles!
- 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**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

1. Vitamin D is an inert substance. The samples can be stored at room temperature, however, Immundiagnostik AG recommends storage at 2-8°C after collection when the measurement will be performed within the first 24 h. Otherwise, the samples must be stored at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.
2. **Hemolysis** does not disturb the results; whole blood is not suitable.
3. Untreated **lipemic** samples lead to incorrect results. Therefore we recommend:

- a.) Centrifuge lipemic samples 10 min at 3.000xg.

The lipid phase floats up. Collect the aqueous phase.

- b.) For highly lipemic samples we recommend using a special delipidation kit (Catalogue No. K 1003A). This kit was developed for lipemic samples in clinical laboratories.

4. Indicated incubation times and temperatures must be observed exactly.
5. Mix samples well before use.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This test kit is a competitive protein binding assay for the measurement of 25-OH Vit D. It is based on the competition of 25-OH Vit D present in the sample with 25-OH Vit D tracer, for the binding pocket of vitamin D binding protein (VDBP, Gc-globulin). Since all circulating 25-OH Vit D is bound to VDBP in vivo, samples have to be precipitated with precipitation reagent to extract the analyte. The supernatant can be used without further treatment within the test.

In the first incubation step, sample, calibrator, control, the vitamin D binding protein and the VDBP-Antibody, an antibody specific for this protein is added to the solid phase.

25-OH Vit D present in the sample then competes with the tracer, coated on the well for the specific binding site of the binding protein and the VDBP-Antibody is bound to the vitamin binding protein. Hence, with increasing concentrations of 25-OH Vit D in the sample, the amount of binding protein, immobilized to the well via the tracer, is reduced. After a washing step to remove unbound components, the quantitation of VDBP is achieved by incubation with a host specific peroxidase labeled antibody using TMB (tetramethylbenzidine) as enzyme substrate. An acidic stopping solution is then added to stop the reaction. The colour converts to yellow. The intensity of the yellow colour is indirectly proportional to the concentration of 25-OH Vitamin D in the sample. A dose response curve of the absorbance unit vs. concentration is generated using the results obtained from the calibrators. Concentrations of 25-OH Vitamin D, present in the patient samples, are determined directly from this curve.

Extraction procedure

Sample, Calibrator, NSB and Control preparation:

- Add **50 µl** calibrator, control, NSB (non specific binding control, assay buffer only) and samples into plastic V tubes (we recommend Eppendorf tubes with a cap).
- Add **400 µl** of precipitation reagent to calibrator, control, NSB and samples. Mix thoroughly on a Vortex mixer. Incubate for 30 min at -20 °C.
- Centrifuge for 10 min at 3000xg and at 4 °C. The supernatant contains the extracted 25-OH Vit D and must be assayed immediately. Please note: Keep samples during the transfer to the microtiter plate at 4 °C.

We recommend reconstitution of VDBP at room temperature for 30 min. This can be done during the incubation of the samples.

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 STD (Standards)/SAMPLE/CTRL (Control) on a protocol sheet
3. Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label
4. Put the microtiterplate and the precipitated STD/PROBE/CTRL on a cool block or ice . The microtiterplate and the precipitated STD/PROBE/CTRL must be cooled during the complete pipetting step
5. Add 20 µl of STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well
6. Add 100 µl VDBP (binding protein) into each well, except the NSB

7. Add 100 µl ASYBUF (assay buffer) to the NSB wells
8. Add 100 µl AB (anti-VDBP antibody) into each well
9. Cover the plate tightly and incubate for 3 hours at 8 - 10 °C in the dark
10. Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel after the last wash
11. Add 200 µl CONJ (Conjugate) into each well
12. Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at 8 - 10 °C in the dark
13. Aspirate and wash the wells 5x with 250 µl of diluted wash buffer, remove remaining wash buffer by hitting the plate against paper towel after the last wash
14. Add 200 µl of SUB (Substrate) into each well
15. Incubate for 20 - 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark
16. Add 50 µl of STOP (Stop solution) into each well
17. 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

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. However, we recommend the use of option 1: 4-parameter-algorithm.

1. 4-parameter-algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

2. Point-to-point-calculation

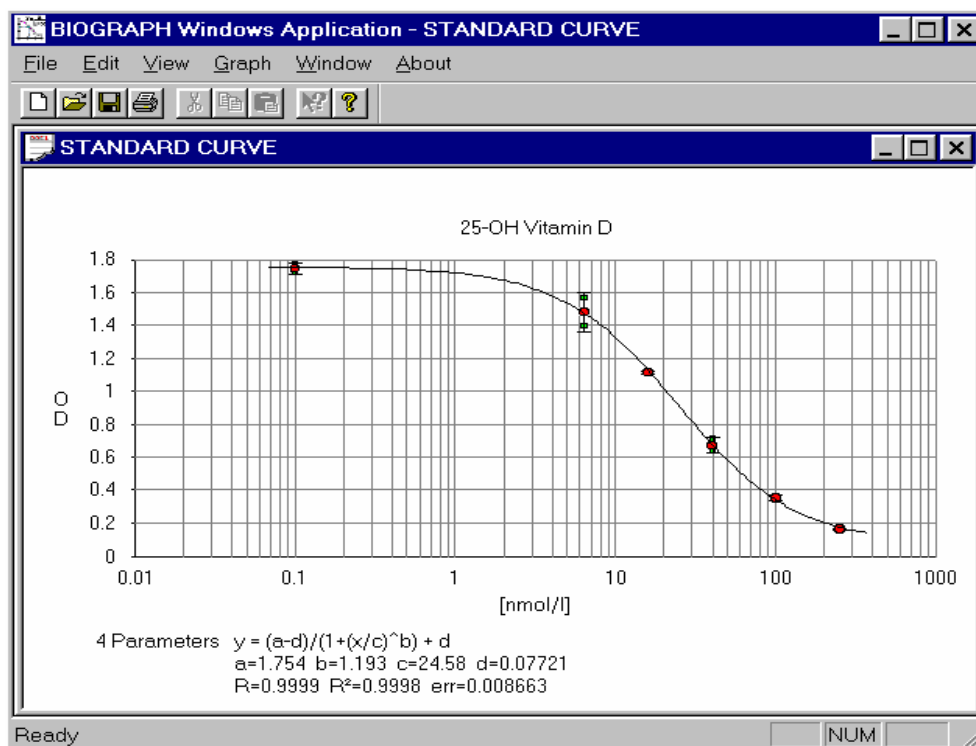
We recommend for the optical density a linear ordinate and for the concentration a linear abscissa.

3. Spline-algorithm

We recommend for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

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 manual control of the paired values should be made.

Typical calibration curve



Calibrators	B/B0 mean [%]	B/B0 median [%]	SD B/B0 [%] n = 17
NSB			
1	100	100	0
2	85	86	5.7
3	70	69	6.9
4	40	42	9.2
5	22	22	4.5
6	13	14	3.6

9. LIMITATIONS

Samples with a 25-OH Vitamin D level greater than the highest calibrator, should be diluted with pre-warmed ASYBUF (Assay buffer; 37 °C) and re-assayed.

Whole blood is not suitable. Untreated **lipemic** samples lead to wrong results.

10. QUALITY CONTROL

Control samples or serum pools should be analyzed with each run of calibrators and patient samples. Results generated from the analysis of the control samples should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. In assays in which one or more of the quality control sample values lie outside the acceptable limits, the results for the patient sample may not be valid.

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)		
Probe	25-OH Vitamin D [nmol/l]	VC [%]
1	4,5	10,7

Inter-Assay (n=20)		
Probe	25-OH Vitamin D [nmol/l]	VC [%]
1	39,8	13,2
2	86,7	11,8

Cross reactivity

24,25-(OH) ₂ Vit D ₃	100 %
25-(OH)-Vit D ₃	100 %
25-OH Vit D ₂	100 %
1,25-(OH) ₂ Vit D ₃	< 1 %
Vit D ₂ & D ₃	< 1 %
Alphacalcidol	< 0.001 %

Recovery

10 samples were spiked with 156 nmol/l 25-OH Vitamin D calibrator and measured in the kit. The recovery was 94 per cent.

Spike [nmol/ml]	Vitamin D measured Mean [nmol/l]	Recovery [%]
156	146,7	94

Sensitivity

The sensitivity or minimum detection limit of this assay is defined as the smallest single value that can be distinguished from zero at the 2 x standard variation as confidence limit. ($B0 + 2 \text{ SD}$)

Sensitivity n=20

Sample	Vitamin D mean value [OD]	Standard variation	Detection limit [nmol/l]
1	2.058	0.084	5.6

Sample dilution

Two patients' serum samples were diluted with pre-warmed ASYBUF (Assay buffer; 37 °C). The results in nmol/l are shown below:

Sample	Dilution	Observed [nmol/l]	Expected [nmol/l]
A	undiluted	135.8	135.8
	1:2	54.5	67.9
	1:4	30.8	33.9
	1:8	10.8	16.9
B	undiluted	127.8	127.8
	1:2	62.7	63.9
	1:4	33.4	31.9
	1:8	15.4	15.9

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 the volumes of the different components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the test results. Immundiagnostik can therefore not be held responsible for any damage resulting from this.

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 volumes of the different 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 can therefore not be held responsible for any damage resulting from this.
- 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. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1996; 104:289-292
2. Scharla SH. et al Osteoporos Int 1998;8 (Supplement 2):S7-S12
3. Chapuy MC,et al. J Clin Endocrinol Metab 1996;81:1129-33
4. Oster P et al.. Akt Gerontol 1983;13:221-2
5. Scharla S. Schattauer Verlag, Stuttgart,1997; Seiten 217-242
6. Offermann G. Dtsch med Wschr. 1978;103:1387-1388

This Assay is developed by

Immundiagnostik, Bensheim and Biomedica, Wien.

Used symbols:

Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number