

IDK[®] 25-OH-Vitamin D ELISA

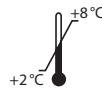
*Zur in-vitro-Bestimmung von 25-OH-Vitamin D
in humanem Serum*

*For the in vitro determination of 25-OH-vitamin D
in human serum*

Gültig ab / Valid from 2023-10-12



K 2020



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. KLINISCHE BEDEUTUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG	4
<i>Gewinnung von humanem Serum</i>	4
<i>Lagerung der Proben</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
<i>Messbereich</i>	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	7
<i>Referenzwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Genauigkeit – Präzision</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	9
<i>Analytische Spezifität</i>	9
<i>Genauigkeit - Richtigkeit</i>	9
12. ENTSORGUNG	9
13. VORSICHTSMASSNAHMEN	9
14. TECHNISCHE MERKMALE	10
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
16. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

IDK® 25-OH-Vitamin D ELISA ist ein Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für die quantitative Bestimmung von 25-OH-Vitamin D (D₂ und D₃) in humanem Serum. Mittels dieses Wertes kann der Vitamin-D-Status beobachtet und eine etwaige Über- oder Unterversorgung erkannt werden. Das Produkt ist ein *in-vitro*-Diagnostikum und für den Gebrauch durch Fachpersonal im Labor geeignet. Die Abarbeitung erfolgt manuell.

2. KLINISCHE BEDEUTUNG

Vitamin D₃ wird in der Haut unter Einfluss von ultraviolettem Licht (UV-B) photochemisch aus der Vorstufe 7-Dehydrocholesterol gebildet. **Vitamin D₂** stammt aus pflanzlicher Nahrung und wird über den Dünndarm aufgenommen. Vitamin D₂ und D₃ werden vom Organismus in gleicher Weise verstoffwechselt.

Vitamin D wird in der Blutbahn an das Vitamin D bindendes Protein (VDBP) gebunden und in der Leber zu 25-OH-Vitamin D metabolisiert. Diese 25-Hydroxylierung ist im Wesentlichen vom Substratangebot abhängig. 25-OH-Vitamin D hat eine geringe biologische Aktivität, liegt aber mit der höchsten Konzentration von allen D-Metaboliten in der Zirkulation vor. Aufgrund seiner hohen Affinität zu VDBP stellt es die Speicherform des Vitamin D dar. Die Serumkonzentration von 25-OH-Vitamin D ist deshalb der beste Indikator für die Vitamin-D-Versorgung.

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 ausführt (D-Hormon). Es reguliert die Kalziumaufnahme aus dem Darm, die Knochenmineralisierung, die Osteoblastendifferenzierung und die Knochenmatrixsynthese. Weiterhin wird die neuromuskuläre Funktion durch das D-Hormon beeinflusst.

Bereits leichter Vitamin-D-Mangel mit einem 25-OH-Vitamin-D-Gehalt von 20–29 ng/ml bzw. 50–74 nmol/l führt über die verminderte Kalziumaufnahme zu einem sekundären Parathormonanstieg und zu einer gesteigerten Knochenresorption.

In der deutschen Normalbevölkerung mit einem Alter über 50 Jahren ist der Vitamin-D-Status signifikant mit der Knochendichte assoziiert. 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 < 20 ng/ml bzw. < 50 nmol/l führt zum Krankheitsbild der Rachitis (Kinder) oder der Osteomalazie (Erwachsene), das durch eine gestörte Knochenneubildung und durch eine mangelhafte Matrix-Mineralisierung

gekennzeichnet ist. Ein Überschuss an Vitamin D (Medikamenten-Überdosierung) ruft ein Hyperkalziämiesyndrom hervor.

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Label	Kit-Komponenten	Menge
K 2020	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 2020	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 50x	1 x 30 ml
K 2020	SAMDIL	Probenverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 2020	STD	Standards, gebrauchsfertig	6 x 200 µl
K 2020	CTRL 1	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 200 µl
	CTRL 2		1 x 200 µl
K 2020	CONJ	Konjugat, peroxidase markiert, gebrauchsfertig	1 x 22 ml
K 2020	SUB	Substrat, gebrauchsfertig	1 x 12 ml
K 2020	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 12 ml

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

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1 000 µl
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Mikrotiterplatten-Photometer mit 450-nm-Filter (Referenzfilter 620 oder 690 nm)
- saugfähiges Papier oder Papiertücher

*Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bringen Sie alle Reagenzien vor Verwendung auf Raumtemperatur.
- Der Test ist **temperatursensitiv** und sollte nur bei einer **Raumtemperatur von 20–25 °C** durchgeführt werden. Bei abweichenden Raumtemperaturen kann Immundiagnostik AG die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.
- Beim Mehrfachansatz der Platte ist darauf zu achten, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:50** in Reinstwasser verdünnt werden (15 ml WASHBUF + 735 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.
- **Achtung: Mikrotiterstreifen:** Nach Öffnen des verschweißten Aluminiumbeutel müssen nicht verwendete Streifen mit Trockenmittel im wieder verschlossenen Aluminiumbeutel bei 2–8 °C gelagert werden.

6. PROBENVORBEREITUNG

Gewinnung von humanem Serum

- a) Frisch abgenommenes Blut sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden.
- b) Stark hämolytische, lipämische oder trübe Serumproben sind zu vermeiden.
- c) Vor der Messung müssen die Proben gut gemischt werden.

Lagerung der Proben

Vitamin D in humanem Serum ist eine stabile Substanz (Wielders & Wijnberg, 2009). Wir empfehlen, Serum bei **2–8 °C** zu lagern. Sollte innerhalb von **48 Stunden** keine Messung erfolgen, sind die Proben bei **-20 °C** einzufrieren.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Dieser **Sandwich-ELISA** dient der quantitativen Bestimmung von 25-OH-Vitamin D (D₂ und D₃) aus Serum. Die Standards, Kontrollen und vorbereiteten Proben werden mit dem ersten und zweiten Antikörper in der Mikrotiterplatte für 20 Minuten inkubiert. Der resultierende Vitamin D-Antikörper-Immunkomplex wird mit einem dritten, peroxidasemarkierten Antikörper unter Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) detektiert. 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 proportional.

Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Pipettierschema

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

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bei 2–8 °C gelagert werden.

Der Test sollte aufgrund von seiner Temperatursensitivität nur bei einer Raumtemperatur von 20–25 °C durchgeführt werden. Nur so können valide Testergebnisse gewährleistet werden.

Des Weiteren empfehlen wir die Bestimmung in Doppelwerten.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

1.	10 µl Serum und 10 µl der Standards/Kontrollen in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren.
2.	200 µl Probenverdünnungspuffer (SAMDIL) in jede Vertiefung pipettieren und für 30 s vorsichtig mischen.
3.	20 min bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren.
4.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	200 µl Konjugat (CONJ) in jede Vertiefung pipettieren und für 30s vorsichtig mischen.
6.	10 min bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren.
9.	5–10 min bei Raumtemperatur (20–25 °C) im Dunkeln inkubieren.
10.	100 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren und mischen bis sich die blaue Farbe komplett in Gelb umgewandelt hat.
11.	Extinktion sofort im Mikrotiterplatten-Photometer bei 450 nm messen. Sofern die höchste Extinktion der Standards 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

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

4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

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

Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Messbereich

Proben mit Konzentrationen unterhalb oder oberhalb des Messbereichs können nicht klar quantifiziert werden. Der Konzentrationsbereich ist der Produktspezifikation zu entnehmen.

Serumproben können nicht verdünnt werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Referenzwerte

Defizienz (schwerer Mangel)	< 20 ng/ml bzw. < 50 nmol/l
Insuffizienz (Mangel)	20–29 ng/ml bzw. 50–74 nmol/l
Suffizienz (gut versorgt)	> 30 ng/ml bzw. > 75 nmol/l

Literaturreferenzen

Folgende Literaturreferenzen zum Vitamin-D-Referenzwert finden Sie im Literaturverzeichnis: Grant et al., Soldin et al., Visser et al., Wicherts et al.

Umrechnungsfaktor

$$1 \text{ ng/ml} = 2,5 \text{ nmol/l}$$

$$1 \text{ nmol/l} = 0,4 \text{ ng/ml}$$

Achtung

Die Produktion von Vitamin D in der Haut ist hoch variabel und abhängig von Jahres- und Tageszeit, Breitengrad, Alter, Sonnenschutz und anderen Faktoren.

Die Referenzbereiche sind von der verwendeten Untersuchungsmethode abhängig (z. B. Vitamin-D-Freisetzung vom Vitamin-D-Bindeprotein, VDBP) und können daher nur zur Orientierung dienen.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Genauigkeit – Präzision

Serum:

Wiederholbarkeit (Intra-Assay); n = 20

Probe	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung	VK [%]
1	24,55	0,83	3,4
2	47,24	1,68	3,5

Reproduzierbarkeit (Inter-Assay); n = 48

Probe	Mittelwert [ng/ml]	Standardabweichung	VK [%]
1	21,18	2,92	13,8
2	32,26	2,89	9,0

Analytische Sensitivität

Serum:

Leerwert (limit of blank, LoB)	0,16 ng/ml
Nachweisgrenze (limit of detection, LoD)	0,62 ng/ml
Bestimmungsgrenze (limit of quantitation, LoQ)	0,62 ng/ml
Messbereich	siehe Produkt-spezifikation

Analytische Spezifität

Es besteht zu 100% eine Kreuzreaktivität mit 25-OH Vitamin D₃ und 25-OH Vitamin D₂.

Genauigkeit - Richtigkeit

Es wurden 28 Serumproben mit 25-OH Vitamin D Werten in einem Bereich von 9,9ng/ml bis 53,9ng/ml getestet. Die Testergebnisse wurden mit den Ergebnissen eines kommerziell erhältlichen 25(OH)-Vitamin D ELISA Kits verglichen. Die Vergleichsdaten zeigten eine lineare Regression mit einer Steigung von 0,97 einem y-Schnittpunkt von 2,01 und einem Korrelationskoeffizienten (R) von 0,91.

12. ENTSORGUNG

Proben und andere potenziell infektiöse Materialien müssen entsprechend den behördlichen Vorschriften entsorgt werden.

13. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.

- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind gesundheitsgefährdend und umweltschädlich. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen können zu Haut- und/oder Atemwegsreizungen führen. Jeder Kontakt mit den Substanzen ist zu vermeiden. Weiterführende Sicherheitsinformationen sind dem Sicherheitsdatenblatt zu entnehmen, welches Sie auf Anfrage bei der Immundiagnostik AG erhalten.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Salzsäure (HCl). HCl ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. HCl verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.

- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Alle im Zusammenhang mit dem Produkt auftretende schwerwiegende Vorkommnisse sind der Immundiagnostik AG und (innerhalb des Unionsmarkt) der zuständigen Meldebehörde des jeweiligen Mitgliedsstaats zu melden.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zur Immundiagnostik AG zurück zu senden.

16. LITERATUR

1. Zerwekh J.E. (2008). Blood biomarkers of Vitamin D status. *Am. J.Clin. Nutr.*, 87(suppl):1087S-91S.
2. Holick M.F. (2006). Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.*, 116:2062-2072.
3. Heaney R.P. (2000). Vitamin D: how much do we need, and how much is too much. *Osteoporos. Int.*, 11:553-555.
4. Dawson-Hughes B., Heaney R.P., Holick M.F., Lips P., Meunier P.J. (1997). Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal Population. *Osteoporos. Int.*, 7:439-443.
5. Bischoff-Ferrari H.A., Giovannucci E., Willett W.C., Dietrich T., Dawson-Hughes B. (2006). Estimation of optimal serum Concentrations of 25-hydroxyVitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84:18-28.
6. Holick M.F. (2004). Sunlight and Vitamin D for bone health and Prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80:16788S-1688S.
7. Heaney R.P. (2010). Defining deficiency of Vitamin D. *Clinical Laboratory International*, October 2010, vol.34 : 16-19.
8. Holick M.F. (2007). Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.*, 357:266-281.
9. Taha N. M., Vieth R. (2010). The problem of an optimal target level for 25-Hydroxy-Vitamin D, the test for Vitamin D nutritional status. *Clinical Laboratory International*, November 2010, vol.34 : 28-30

10. Wielders J.P., Wijnberg F.A. (2009) Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. Clin. Chem., 55(8):1584-5.
11. Wicherts I.S., van Schoor N.M., Boeke A.J., et al. (2007). Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. J. Clin. Endocrinol. Metab., 92(6):2058-2065.
12. Visser M., Deeg D.J., Puts M.T., Seidell J.C., Lips P. (2006). Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. Am. J. Clin. Nutr., 84(3): 616-672.
13. Grant W.B., Holick M.F. (2005). Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. Altern. Med. Rev., 10(2):94-111.
14. Soldin O.P., Sharma H., Husted L., Soldin S.J. (2009). Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. Clin. Biochem., 42(9):823-827.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung



Gebrauchsanweisung beachten



Spezifikationsdatenblatt beachten



Reizend

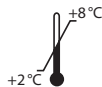
IDK[®] 25-OH-Vitamin D ELISA

*For the in vitro determination of 25-OH-vitamin D
in human serum*

Valid from 2023-10-12



K 2020



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	16
2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	16
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	17
5. PREPERATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
6. PREPARATION OF THE ASSAY	18
<i>Obtaining serum samples</i>	18
<i>Sample storage</i>	18
7. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Test procedure</i>	19
8. RESULTS	20
9. LIMITATIONS	21
<i>Measurement range</i>	21
10. QUALITY CONTROL	21
<i>Reference ranges for 25-OH-vitamin D₃</i>	21
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Accuracy – Precision</i>	22
<i>Analytical sensitivity</i>	22
<i>Analytical specificity</i>	22
<i>Accuracy</i>	22
12. DISPOSAL	23
13. PRECAUTIONS	23
14. TECHNICAL HINTS	23
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
16. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

IDK® 25-OH-Vitamin D ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative determination of 25-OH-vitamin D (D₂ and D₃) in human serum. This value allows monitoring of the vitamin D status and detection of a possible insufficiency or excess. The assay is an *in vitro* diagnostic medical device and intended to be used by professional users in a laboratory environment. It is performed manually.

2. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Vitamin D₃ is photochemically synthesised from its precursor 7-dehydrocholesterol in the skin under the influence of ultraviolet light (UV-B). **Vitamin D₂** originates from plant food and is resorbed via the small intestine. Vitamin D₂ and D₃ are metabolised in the same way.

Vitamin D is bound to vitamin D binding protein (VDBP) in the bloodstream and metabolised to 25-OH vitamin D in the liver. This 25-hydroxylation is dependent on the substrate supply. 25-OH-vitamin D has a low biological activity, but is present in the circulation with the highest concentration of all D metabolites. Due to its high affinity to VDBP, it represents the storage form of vitamin D. The serum concentration of 25-OH vitamin D is therefore the best indicator of vitamin D supply.

In the kidneys, 25-hydroxyvitamin D is further metabolised to 1,25-dihydroxyvitamin D, which is the most active vitamin D metabolite and acts as a hormone (D hormone). It regulates calcium resorption from the intestine, bone mineralisation, osteoblast differentiation and bone matrix synthesis. Furthermore, the neuromuscular function is influenced by the D hormone.

Even mild vitamin D deficiency with a 25-OH vitamin D content of 20–29 ng/ml or 50–74 nmol/l leads to a secondary parathyroid hormone increase and increased bone resorption via reduced calcium absorption.

In the German general population aged > 50 years, vitamin D status is significantly correlated with bone density. Therefore, vitamin D deficiency is one of the most important risk factors for senile osteoporosis. The early detection of a vitamin D deficiency allows for an effective prevention of fractures by vitamin D supplementation. Severe vitamin D deficiency (< 20 ng/ml or < 50 nmol/l) results in rickets (in children) or osteomalacia (in adults), which are both characterised by a disturbed bone formation and defective matrix mineralisation. An excess of vitamin D (drug overdose) leads to a hypercalcemia syndrome.

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 2020	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 2020	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 50x	1 x 30 ml
K 2020	SAMDIL	Sample diluent, ready-to-use	1 x 22 ml
K 2020	STD	Standards, ready-to-use	6 x 200 µl
K 2020	CTRL 1 CTRL 2	Controls, ready-to-use (see specification for range)	1 x 200 µl 1 x 200 µl
K 2020	CONJ	Conjugate, peroxidase labelled, ready-to-use	1 x 22 ml
K 2020	SUB	Substrate, ready-to-use	1 x 12 ml
K 2020	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 12 ml

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

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1 000 µl single-use tips
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Vortex
- Absorbent paper or paper towel
- Microplate reader (450 nm, reference wave length 620 or 690 nm)

*Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPERATION AND STORAGE OF REAGENTS

- Bring all **reagents and samples to room temperature** (20–25 °C) and mix well.
- The test is **temperature-sensitive** and should only be carried out at a **room temperature of 20–25 °C**. Immundiagnostik AG cannot guarantee the accuracy of the measurement results at deviating room temperatures.
- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:50** before use (15 ml WASHBUF + 735 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. The crystals must be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C before dilution of the buffer solution. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label.
- All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.
- **Note: Microtiter strips:** Once the vacuum-sealed aluminum bag has been opened, all unused strips must be put back into the aluminium bag together with the desiccant bag. Close the aluminium bag and store it at 2–8 °C.

6. PREPARATION OF THE ASSAY

Obtaining serum samples

- a) Freshly collected blood should be centrifuged within one hour.
- b) Avoid hemolytic, lipemic or turbid samples.
- c) Mix samples well before use.

Sample storage

Vitamin D in human serum is a stable substance (Wielders & Wijnberg, 2009). We recommend storing serum at **2–8 °C**. If no measurement is carried out within **48 hours**, the samples should be stored at **-20 °C**.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

This **sandwich ELISA** is intended for the quantitative determination of 25-OH vitamin D (D₂ and D₃) from serum. The standards, controls and prepared samples are incubated with the first and second antibody in the microtitre plate for 20 minutes. The resulting vitamin D antibody-immune complex is detected with a third, peroxidase-labelled antibody by adding tetramethylbenzidine (TMB). The colour development is stopped by the addition of stop solution, and the resulted yellow colour is measured at 450 nm using a microtiter plate reader. The colour intensity is positively proportional to the concentration of Vitamin D in the sample.

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 patient sample is determined directly from this curve.

Test procedure

Only reagents and samples that are at room temperature 20–25 °C may be used in the test. For this purpose, open the kit and remove the individual components required. Mix reagents and samples carefully before use and avoid foam formation. Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8 °C.

Due to its temperature sensitivity, the test should only be performed at a room temperature of 20–25 °C. This is the only way to guarantee valid test results.

Furthermore, we recommend the determination of duplicate values.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

1.	Add 10 µl of serum and 10 µl of the standards/controls into the respective wells.
2.	Add 200 µl sample diluent (SAMDIL) into each well and mix gently for 30 s .
3.	Incubate for 20 min at room temperature (20–25 °C).
4.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the last washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
5.	Add 200 µl conjugate (CONJ) into each well and mix gently for 30 s .
6.	Incubate for 10 min at room temperature (20–25 C).

7.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the last washing step, the inverted microtiter plate should be firmly tapped on absorbent paper.
8.	Add 100 µl substrate (SUB) into each well and mix gently for 10 s .
9.	Incubate for 5–10 min at room temperature (20–25 °C) in the dark.
10.	Add 100 µl stop solution (STOP) into each well and mix gently until the blue colour completely changes to yellow.
11.	Determine absorption within 15 min with an ELISA reader at 450 nm . If the highest extinction of the standards 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

We recommend the 4-parameter algorithm for result calculation.

4-parameter algorithm

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

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

Point-to-point calculation

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

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the used program, a control of the paired values should be done manually.

9. LIMITATIONS

Measurement range

Samples with concentrations lower than the measurement range or above cannot be clearly quantified. For concentration range see product specification.

Serum samples cannot be diluted.

10. QUALITY CONTROL

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

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

Reference ranges for 25-OH-vitamin D₃

Deficiency (seriously deficient)	< 20 ng/ml or < 50 nmol/l
Insufficiency (deficient)	20–29 ng/ml or 50–74 nmol/l
Sufficiency (adequately supplied)	> 30 ng/ml or > 75 nmol/l

Literature references

The following literature for the vitamin D reference values can be found in the references: Grant et al., Soldin et al., Visser et al., Wicherts et al.

Conversion factor

$$1 \text{ ng/ml} = 2.5 \text{ nmol/l}$$

$$1 \text{ nmol/l} = 0.4 \text{ ng/ml}$$

Note

The vitamin D production in the skin is high variable and depends on the season and daily time, degree of latitude, age, sun protection etc. The normal ranges depend on the method used (e.g. vitamin D release from the vitamin D binding protein, VDBP) and serve only as orientation.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Accuracy – Precision

Serum:

Repeatability (Intra-Assay); n = 20

Sample	Mean value [ng/ml]	S.D.	CV [%]
1	24.55	0.83	3.4
2	47.24	1.68	3.5

Reproducibility (Inter-Assay); n = 48

Sample	Mean value [ng/ml]	S.D.	CV [%]
1	21.18	2.92	13.8
2	32.26	2.89	9.0

Analytical sensitivity

Serum:

Limit of blank, LoB	0.16 ng/ml
Limit of detection, LoD	0.62 ng/ml
Limit of quantitation, LoQ	0.62 ng/ml
Detection range	see product specification

Analytical specificity

100% cross-reactivity to 25-OH Vitamin D₃ and 25-OH Vitamin D₂.

Accuracy

28 serum samples were tested with 25-OH vitamin D levels ranging from 9.9 ng/ml to 53.9 ng/ml. The test results were compared with the results of a commercially available 25(OH)-vitamin D ELISA kit. The comparison data showed a linear regression with a slope of 0.97, a y-intercept of 2.01 and a correlation coefficient (R) of 0.91.

12. DISPOSAL

Specimens and other potentially infectious materials must be disposed of in accordance with regulatory requirements.

13. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analysed with each run.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide or ProClin are hazardous to health and the environment. Substrates for enzymatic colour reactions may also cause skin and/or respiratory irritation. Any contact with the substances must be avoided. Further safety information can be found in the safety data sheet, which is available from Immundiagnostik AG on request.
- The stop solution consists of diluted hydrochloric acid (HCl), a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

14. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to the enclosed manual.

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE













- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Quality control guidelines should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- All serious incidents occurring in connection with the product must be reported to Immundiagnostik AG and (within the Union market) to the competent reporting authority of the respective member state.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

16. REFERENCES

1. Zerwekh J.E. (2008). Blood biomarkers of Vitamin D status. *Am. J.Clin. Nutr.*, 87(suppl):1087S-91S.
2. Holick M.F. (2006). Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets. *J. Clin. Invest.*, 116:2062-2072.
3. Heaney R.P. (2000). Vitamin D: how much do we need, and how much is too much. *Osteoporos. Int.*, 11:553-555.
4. Dawson-Hughes B., Heaney R.P., Holick M.F., Lips P., Meunier P.J. (1997). Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal Population. *Osteoporos. Int.*, 7:439-443.
5. Bischoff-Ferrari H.A., Giovannucci E., Willett W.C., Dietrich T., Dawson-Hughes B. (2006). Estimation of optimal serum Concentrations of 25-hydroxyVitamin D for multiple health outcomes. *Am. J. Clin. Nutr.*, 84:18-28.
6. Holick M.F. (2004). Sunlight and Vitamin D for bone health and Prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80:16788S-1688S.
7. Heaney R.P. (2010). Defining deficiency of Vitamin D. *Clinical Laboratory International*, October 2010, vol.34 : 16-19.

8. Holick M.F. (2007). Vitamin D deficiency. N. Engl. J. Med., 357:266-281.
9. Taha N. M., Vieth R. (2010). The problem of an optimal target level for 25-Hydroxy-Vitamin D, the test for Vitamin D nutritional status. Clinical Laboratory International, November 2010, vol.34 : 28-30
10. Wielders J.P., Wijnberg F.A. (2009) Preanalytical stability of 25(OH)-vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. Clin. Chem., 55(8):1584-5.
11. Wicherts I.S., van Schoor N.M., Boeke A.J., et al. (2007). Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. J. Clin. Endocrinol. Metab., 92(6):2058-2065.
12. Visser M., Deeg D.J., Puts M.T., Seidell J.C., Lips P. (2006). Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. Am. J. Clin. Nutr., 84(3): 616-672.
13. Grant W.B., Holick M.F. (2005). Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. Altern. Med. Rev., 10(2):94-111.
14. Soldin O.P., Sharma H., Husted L., Soldin S.J. (2009). Pediatric reference intervals for aldosterone, 17alpha-hydroxyprogesterone, dehydroepiandrosterone, testosterone and 25-hydroxy vitamin D3 using tandem mass spectrometry. Clin. Biochem., 42(9):823-827.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		Irritant

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

