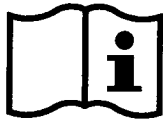


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

25-OH Vitamin D total RIA



DER1971



96 tubes



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

1.	INTENDED USE	3
2.	CLINICAL BACKGROUND.....	3
3.	PRINCIPLES OF THE METHOD	3
4.	REAGENTS PROVIDED	4
5.	SUPPLIES NOT PROVIDED.....	4
6.	REAGENT PREPARATION	4
7.	STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS.....	5
8.	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	5
9.	PROCEDURE.....	5
10.	CALCULATION OF RESULTS.....	6
11.	TYPICAL DATA	6
12.	PERFORMANCE AND LIMITATIONS	6
13.	INTERNAL QUALITY CONTROL.....	7
14.	EXPECTED VALUES	8
15.	PRECAUTIONS AND WARNINGS	8
16.	SUMMARY OF THE PROTOCOL.....	8
1.	VERWENDUNGSZWECK.....	9
2.	KLINISCHER HINTERGRUND	9
3.	GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG.....	9
4.	MITGELIEFERTE REAGENZIEN.....	10
5.	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL	10
6.	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN.....	10
7.	AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	11
8.	PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG.....	11
9.	DURCHFÜHRUNG.....	11
10.	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE.....	12
11.	TYPISCHE WERTE.....	12
12.	LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK.....	12
13.	INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE	14
14.	ZU ERWARTENDER BEREICH.....	14
15.	VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN	14
16.	ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS.....	15
	LITERATUR	15
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS.....	16

1. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the in vitro quantitative measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ and D₂ (25-OH-D₃ and 25-OH-D₂) in serum.

2. CLINICAL BACKGROUND

Vitamin D is the generic term used to designate Vitamin D₃ or cholecalciferol and Vitamin D₂ or ergocalciferol. Humans naturally produce Vitamin D₃ when the skin is exposed to ultraviolet sun rays. In the liver mainly, Vitamin D₃ is metabolised into 25-Hydroxyvitamin D₃ (25 OH D₃) which is the main form of Vitamin D circulating in the body. 25 OH D₃ is a precursor for other Vitamin D metabolites and has also a limited activity by itself. The most active derivative is 1,25-Hydroxyvitamin D₃, produced in the kidney (or placenta) by 1 α -hydroxylation of 25OHD₃. 25OHD₃ stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus and also bone resorption and mineralisation. 25OH Vitamin D might also be active in other tissues responsible for calcium transport (placenta, kidney, mammary gland) and endocrine gland (parathyroid glands, beta cells). Vitamin D₃ and Vitamin D₂ are also available by ingestion through food or dietary supplementation. As Vitamin D₂ is metabolised in a similar way to vitamin D₃, both contribute to the overall Vitamin D status of an individual. It is the reason why it is very important to measure both forms of 25 OH Vitamin D equally for a correct diagnosis of Vitamin D deficiency, insufficiency or intoxication. Vitamin D deficiency is an important risk factor for rickets, osteomalacia, senile osteoporosis, cancer and pregnancy outcomes. The measurement of both 25 OH Vitamin D forms is also required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients. Vitamin D intoxication has been shown to cause kidney and tissue damages.

3. PRINCIPLES OF THE METHOD

At first, calibrators, controls and samples (serum) are incubated with the incubation buffer, directly in coated tubes for 2 hours at room temperature (18-25°C), on a shaker, to release 25OH Vitamin D₃ and 25OH Vitamin D₂ from Vitamin D Binding Protein (DBP). Then, without washing steps, a fixed amount of ¹²⁵I labelled 25OH Vitamin D is added in each tube to compete with the 25OH Vitamin D₃ and 25OH Vitamin D₂ from samples, controls or calibrators, for a fixed amount of a specific monoclonal antibody sites immobilized to the lower and inner surface of plastic tubes. After 1 hour incubation at room temperature (18-25°C), on a tube shaker, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed twice and aspirated again. A calibration curve is plotted and the total 25 OH Vitamin D (D₃ and D₂) concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

4. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
SORB CT Tubes coated with Mab anti 25OH Vit D3 and D2	2 x 48	pink	Ready for use
Ag I-125 LYO ¹²⁵ Iodine labelled 25OH Vit D (HPLC grade).	1 vial 168 kBq lyophilised	red	Add 10.5 ml of Tracer Buffer
CAL 0 LYO Calibrator 0: in horse serum and phosphate buffer with gentamycin.	1 vial lyophilised	yellow	Add 0.5 ml distilled water
CAL 1 – 5 LYO Calibrators 1-5 in horse serum (see exact values on QC data sheet)	5 vials lyophilised	yellow	Add 0.5 ml distilled water
SAM DIL LYO Specimen diluent in horse serum	1 vial lyophilised	black	Add 1 ml distilled water
WASH SOLN 70x Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL 1 & 2 LYO Controls 1 and 2 in human plasma with Proclin (see exact values on QC datasheet)	2 vials lyophilised	silver	Add 0.5 ml distilled water
TRACER BUF Tracer Buffer with casein, gentamycin and red dye	1 vial 11.5 ml	red	Ready for use
INC BUF Incubation Buffer with casein and proclin.	1 vial 55 ml	green	Ready for use

Note: Use Specimen diluent for dilution of samples with values above the highest calibrator before pre-treatment step.
No international reference material is available.

5. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 25 µl, 100 µl, 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Tube shaker (300 to 700 rpm)
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system
8. Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

6. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators :** Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water.
- B. Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. Tracer:** Reconstitute the lyophilised tracer with 10.5 ml of the Tracer Buffer.
- D. Specimen diluent :**Reconstitute the lyophilised diluent with 1 ml distilled water.
- E. Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

7. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at
- -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable, if kept in the original well-closed vial at 4°C for maximum one week or at -20°C (with one thawing) until the tracer expiry date.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

8. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- This kit is suitable for serum samples.
- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, samples storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

9. PROCEDURE

A. Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature (18-25°C), prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
- Each tube can only be used once.

B. Procedure

The Incubation Buffer must be brought to room temperature (18-25°C), before beginning incubation.

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Dispense 25 µl of calibrator or control or sample.
3. Dispense 500 µl of Incubation Buffer into each tube, except those for total counts.
4. Incubate for 2 hours at room temperature (18-25°C) on a tube shaker (300 to 700 rpm).
Be careful : don't aspirate and don't wash tubes before dispensing the tracer.
5. Dispense 100 µl of ¹²⁵Iodine labelled 25OH Vitamin D into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
6. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
7. Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) on a tube shaker (300 to 700 rpm).
8. Aspirate the content of each tube (except total counts). Be sure that the tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
9. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate. Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
10. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate.
11. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
12. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

10. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of 25OH vitamin D concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B₀ (%)) values, determine the total 25OH vitamin D concentrations of the samples from the calibration curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 25 OH vitamin D (B₀/T) must be checked.

11. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

25OH Vitamin D total	cpm	B/Bo (%)
Total count	67320	
Calibrator 0.0 ng/ml	20520	100.0
5.8 ng/ml	16288	79.4
13 ng/ml	10274	50.0
35 ng/ml	6398	31.2
50 ng/ml	3926	19.1
100 ng/ml	1190	5.8

Note : 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

12. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

- The LOB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank several times and was calculated as the mean - 1.65 Standard Deviation of the distribution of these values.
- The LOB was calculated to be 0.8 ng/ml.
- The LOD (limit of detection) was calculated as the LOB + 1.65 Standard Deviation of a low concentration sample tested in 10 different runs.
- The LOD was calculated to be 1.9 ng/ml.
- The LOQ (Limit of Quantitation) was calculated by testing 5 samples of low values 10 times. The LOQ was calculated to be 2.6 ng/ml.

B. Specificity

The percentage of cross reaction was determined by testing sera with spiked and unspiked crossreactants. The results are summarized in the following table:

Compound	Cross-Reactivity (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	85
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	4.1
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	0.2
Vitamin D ₃	ND
Vitamin D ₂	0.1
3-epi-25 hydroxy Vitamin D ₃	0.4
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	23
25,26(OH) ₂ -Vitamin D ₃	26.5

ND : Not detectable

The assay performance is not affected by hemolysis (5 g/L hemoglobin tested) and by bilirubinemia (1 g/L bilirubin tested). Bilirubin conjugate (1g/L tested), triglycerides (2 g/L tested) and ascorbic acid (Vitamin C) (1 g/L) don't interfere with this assay.

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	20	23.1 ± 1.1	4.7	A	12	21.0 ± 1.4	6.7
B	20	37.1 ± 1.7	4.7	B	12	36.6 ± 2.1	5.8

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Recovery (%)
25.4	82
14.3	81
7.8	104
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Recovery (%)
13.8	92
9.0	85
4.2	81

DILUTION TEST

Sample dilution	Theoretical concent. (ng/ml)	Measured concent. (ng/ml)
1/1	95.1	95.1
1/2	47.6	43.1
1/4	23.8	24.3
1/1	61.8	61.8
1/2	30.9	31.7
1/4	15.4	14.0
1/1	76.8	76.8
1/2	38.4	37.9
1/4	19.2	17.9

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 20 and 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY

	0 minute (ng/ml)	20 minutes (ng/ml)	30 minutes (ng/ml)
Sample 1	12.2	8.9	9.7
Sample 2	27.9	31.6	28.6
Sample 3	44.2	45.6	45.3

13. INTERNAL QUALITY CONTROL

If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.

If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.

Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

14. EXPECTED VALUES

Dietary intake, race, season and age are known to affect the normal levels of 25OH.Vit.D3. Each laboratory should establish its own range based on their local population. Recent literature has suggested the following ranges for the classification of 25 OH Vitamin D status: Deficiency: <10 ng/mL; Insufficiency: 10-29 ng/mL; Sufficiency: 30 to 100 ng/mL; Potential toxicity: >100 ng/mL.

15. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals. All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes. Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection. The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures. All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious. Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up. Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves. For more information, see Material Safety Data Sheet (MSDS).

16. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS μl	CALIBRATORS μl	SAMPLE (S) CONTROLS μl
INCUBATION (in coated tubes)			
Calibrators	-	25	-
Samples / controls	-	-	25
Incubation Buffer	-	500	500
Incubation	2 hours at RT (18-25°C) on a shaker (300 to 700 rpm)		
	!Don't aspirate tubes		
Tracer	100	100	100
Incubation	1 hour at RT (18-25°C) on a shaker (300 to 700 rpm)		
Separation Working Wash solution	-	Aspirate 2 ml	
Separation Working Wash solution	-	Aspirate 2 ml	
		Aspirate	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

1. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative in vitro Bestimmung von 25-Hydroxy Vitamin D₃ und D₂ (25-OH-D₃ und 25-OH-D₂) in Serum.

2. KLINISCHER HINTERGRUND

Vitamin D ist der allgemeine Ausdruck zur Bezeichnung von Vitamin D₃, oder Cholecalciferol und Vitamin D₂, oder Ergocalciferol. Menschen produzieren Vitamin D₃ auf natürliche Weise, wenn die Haut ultravioletten Sonnenstrahlen ausgesetzt wird. Hauptsächlich wird Vitamin D₃ in der Leber in 25-Hydroxyvitamin D₃ (25 OH D₃) metabolisiert, welches die Hauptform von im Körper zirkulierendem Vitamin D darstellt. 25 OH D₃ ist ein Vorläufer für andere Vitamin D Metaboliten und ist in begrenztem Umfang selbst aktiv. Das am meisten aktive Derivat ist 1,25-Hydroxyvitamin D₃, welches in den Nieren (oder in der Plazenta) durch eine 1 α -Hydroxylierung produziert wird. 25 OH Vitamin D stimuliert die intestinale Absorption von Kalzium und Phosphor und auch die Knochenresorption und -Mineralisierung. 25 OH Vitamin D kann auch in anderen Geweben aktiv für den Kalziumtransport verantwortlich sein (Plazenta, Nieren, Milchdrüsen,...) und für die Endokrinen Drüsen (Nebenschilddrüse, Beta Zellen,...). Vitamin D₃ und Vitamin D₂ werden ebenfalls über die Nahrung oder diätische Ergänzungsmittel verfügbar gemacht. Da Vitamin D₂ auf ähnliche Weise metabolisiert wird wie Vitamin D₃, tragen auch beide zum Vitamin D Gesamtstatus einer Person bei. Das ist der Grund, warum eine Bestimmung der beiden Formen von 25 OH Vitamin D für eine korrekte Diagnose des Vitamin D Mangels, der Insuffizienz oder der Intoxikation so wichtig ist. Vitamin D Mangel ist ein wichtiger Risikofaktor für Rachitis, Knochenerweichung, altersbedingte Osteoporose, Krebs und Schwangerschaftsvorfällen. Die Messung von beiden Formen von 25 OH Vitamin D ist ebenso erforderlich zur Bestimmung der Ursachen von anormalen Konzentrationen von Serum Kalzium Spiegeln bei Patienten. Vitamin D Intoxikationen verursachen Nieren und Gewebeschäden.

3. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Zuerst werden die Kalibratoren, Kontrollen und (Serum) Proben direkt in beschichteten Röhrchen mit Inkubationspuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Schüttler inkubiert, um 25OH Vitamin D₃ und 25OH Vitamin D₂ aus dem Bindungsprotein (DBP) freizusetzen. Dann wird, ohne Waschschrte, eine festgelegte Menge von ¹²⁵I markiertem 25OH Vitamin D zu jedem Röhrchen gegeben, um mit dem 25OH Vitamin D₃ und 25OH Vitamin D₂ der Proben, Kontrollen oder Kalibratoren um eine festgelegte Menge eines spezifischen monoklonalen Antikörpers zu konkurrieren, der an die innere Wand der Plastikröhrchen gebunden ist. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Röhrchenschüttler beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend zweimal gewaschen und erneut abgesaugt. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die Gesamtkonzentrationen von 25 OH Vitamin D (D₃ und D₂) der Proben durch Dosis Interpolation aus der Kalibrationskurve abgelesen.

4. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests pro Kit	Farbcode	Wiederherstellung
SORB CT Röhrchen beschichtet mit Mab anti 25OH Vit D3 und D2	2 x 48	Rosa	Gebrauchsfertig
Ag I-125 LYO ¹²⁵ Iod markiertes 25OH Vitamin D (HPLC Grad)	1 Röhrchen 168 kBq lyophilisiert	Rot	10,5 ml des Tracerpuffer hin-zufügen
CAL 0 LYO Kalibrator 0: Pferdeserum und Phosphatpuffer mit Gentamycin	1 Röhrchen lyophilisiert	Gelb	0,5 ml destilliertes Wasser hin-zufügen
CAL 1 - 5 LYO Kalibratoren 1-5 in Pferdeserum (exakte Werte befinden sich auf den QC Zertifikat)	5 Röhrchen lyophilisiert	Gelb	0,5 ml destilliertes Wasser hin-zufügen
SAM DIL LYO Probenverdünnung in Pferdeserum	1 Röhrchen lyophilisiert	Schwarz	1 ml destilliertes Wasser hin-zufügen
WASH SOLN 70x Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Röhrchen 10 ml	Braun	70 x verdünnen mit destilliertes Wasser (Magnetrührer benutzen)
CONTROL 1 & 2 LYO Kontrollen 1 und 2 in Humanplasma mit Proclin (exakte Werte befinden sich auf den QC Zertifikat)	2 Röhrchen lyophilisiert	Silber	0,5 ml destilliertes Wasser hin-zufügen
TRACER BUF Tracerpuffer mit Kasein und Gentamycin und roter Farbe	1 Röhrchen 11,5 ml	Rot	Gebrauchsfertig
INC BUF Inkubationspuffer mit Kasein und Proclin	1 Röhrchen 55 ml	Grün	Gebrauchsfertig

Bemerkung: Benutzen Sie Probenverdünnung vor dem Vorbehandlungsschritt zur Verdünnung der Proben, die Werte oberhalb des höchsten Kalibrators aufweisen.
Es sind keine internationalen Referenzen vorhanden.

5. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 25 µl, 100 µl, 500 µl und 1 ml (die Benutzung von genauen Pipetten mit Einmalspitzen ist vorgeschrieben)
3. Vortexmixer
4. Magnetrührer
5. Röhrchenschüttler (300 bis 700 upm)
6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem
8. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

6. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen :** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. Tracer:** Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Tracer mit 10,5 ml des Tracerpuffer.
- D. Probenverdünner:** Rekonstituieren Sie die lyophilisierte Verdünnung mit 1 ml destilliertes Wasser.
- E. Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

7. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8 °C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden für maximal 3 Monate. Vermeiden Sie wiederholte Einfrier- Auftau Zyklen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Nach dem Erstgebrauch ist der Tracer bis zum Verfallsdatum stabil, wenn er in der gut verschlossenen Originalflasche bei -20°C (mit einmal Auftauen) aufbewahrt wird, oder bei 4°C: maximal eine Woche.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

8. PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG

- Dieser Kit ist für Serumproben geeignet.
- Serumproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholte Einfrier- Auftau Zyklen.

9. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

- Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (18-25°C).
- Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren.
- Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision.
- Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
- Jedes Röhrchen kann nur einmal verwendet werden.

B. Vorgehen

Der Inkubationspuffer muss vor der Verwendung auf Raumtemperatur(18-25°C) gebracht werden.

1. Beschriften Sie beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und Probe. Zur Bestimmung der Gesamtzählung beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Dispensieren Sie 25 µl Kalibrator, Kontrolle oder Probe.
3. Dispensieren Sie 500 µl Inkubationspuffer in jedes Röhrchen, außer in die für die Gesamtzählung vorgesehenen.
4. Inkubieren Sie für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Röhrchenschüttler (300 bis 700 upm)
ACHTUNG: Waschen oder saugen Sie die Röhrchen nicht ab, ehe Sie den Tracer dispensieren.
5. Dispensieren Sie 100 µl mit ¹²⁵Iod markiertes 25OH Vitamin D in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtzählung.
6. Schütteln Sie den Röhrchenständer vorsichtig von Hand, um eingeschlossene Luftblasen freizusetzen.
7. Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Röhrchenschüttler (300 bis 700 upm)
8. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (Ausnahme: Röhrchen für die Gesamtzählung). Stellen Sie sicher, dass die Spitze des Absaugers den Boden der beschichteten Röhrchen erreicht, um alle Flüssigkeit zu entfernen.
9. Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (Ausnahme: Gesamtzählung) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei der Zugabe der Waschlösung.
10. Waschen Sie die Röhrchen erneut mit 2 ml Gebrauchswaschlösung (Ausnahme: Gesamtzählung) und saugen Sie ab.
11. Lassen Sie die Röhrchen für 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Tropfen Flüssigkeit ab.
12. Zählen Sie die Röhrchen in einem Gamma Counter für 60 Sekunden.

10. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

2. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
3. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Gesamtzählung (Kalibrator oder Proben)}}{\text{Gesamtzählung (Null Kalibrator)}} \times 100$$

4. Tragen Sie die (B/B₀(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 25-OH Vitamin D Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
5. Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4-Parameter“-Kurvenfunktion.
6. Bestimmen Sie die gesamt 25-OH Vitamin D Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B₀(%) der Kalibrationskurve.
7. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 25-OH Vitamin D (B₀/T) geprüft werden.

11. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationekurve verwendet werden.

25OH Vitamin D komplett	Cpm	B/Bo(%)
Gesamtaktivität	67320	
Kalibrator 0,0 ng/ml	20520	100,0
5,8 ng/ml	16288	79,4
13 ng/ml	10274	50,0
35 ng/ml	6398	31,2
50 ng/ml	3926	19,1
100 ng/ml	1190	5,8

Bemerkung: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

12. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK**A. Nachweisgrenze**

Die Leerwert-Grenze (LOB) wurde durch mehrmaliges Messen des Leerwerts berechnet und ist definiert als Mittelwert, abzüglich der 1,65+ fachen Standardabweichung der Mehrfachmessung des Leerwertes. Das LOB wird mit 0,8 ng / ml berechnet.

Die LOD (Nachweisgrenze) wurde als LOB + 1,65 Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration, die in 10 verschiedenen Assays getestet wurde, berechnet. Die LOD wird mit 1,9 ng / ml berechnet. Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde durch zehnmaliges Testen von 5 Proben mit niedrigen Werten berechnet. Die Bestimmungsgrenze wurde mit 2,6 ng / ml berechnet.

B. Spezifität

Der Prozentanteil der Kreuzreaktion wurde durch Testen von Seren mit zugefügten und ohne zugefügte Kreuzreaktanten bestimmt.

Substanz	Kreuz-Reaktivität (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	85
1,25(OH) ₂ -Vitamin, D ₃	4,1
1,25(OH) ₂ -Vitamin, D ₂	0,2
Vitamin D ₃	ND
Vitamin D ₂	0,1
3-epi-25 hydroxy Vitamin D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -Vitamin, D ₃	23
25,26(OH) ₂ -Vitamin D ₃	26,5

ND : Nicht nachweisbar

Die Leistung des Testsystems wird nicht durch Hämolyse (getestet wurden 5 g/l Hämoglobin) oder Bilirubinämie (getestet wurden 1 g/l Bilirubin) beeinträchtigt. Bilirubinkonjugat (1 g/l), Triglyceride (2 g/l) und Ascorbinsäure (Vitamin C) (1 g/l) interferieren nicht mit diesem Testsystem.

C. Präzision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	20	23,1 ± 1,1	4,7	A	12	21,0 ± 1,4	6,7
B	20	37,1 ± 1,7	4,7	B	12	36,6 ± 2,1	5,8

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST	
Zugeg. 25-OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
25,4	82
14,3	81
7,8	104
Zugeg. 25-OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
13,8	92
9,0	85
4,2	81

VERDÜNNUNGSTEST		
Probe- verdün- nung	Theoreti- sche Kon- zent. (ng/ml)	Gemes- sene Kon- zent. (ng/ml)
1/1	95,1	95,1
1/2	47,6	43,1
1/4	23,8	24,3
1/1	61,8	61,8
1/2	30,9	31,7
1/4	15,4	14,0
1/1	76,8	76,8
1/2	38,4	37,9
1/4	19,2	17,9

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 20 oder 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND			
	0 Minuten (ng/ml)	20 Minuten (ng/ml)	30 Minuten (ng/ml)
Probe 1	12,2	8,9	9,7
Probe 2	27,9	31,6	28,6
Probe 3	44,2	45,6	45,3

13. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Liegen die erhaltenen Ergebnisse der Kontrolle 1 und/oder der Kontrolle 2 nicht innerhalb des, auf dem Fläschchen Etikett, festgelegten Bereichs, kann das Ergebnis so lange nicht verwendet werden, bis eine zufriedenstellende Erklärung für die Diskrepanz gefunden wurde.

Wenn gewünscht, kann jedes Labor eigene Pools von Kontrollproben erstellen, die aliquotiert eingefroren werden. Diese Proben sollten nicht häufiger als zweimal eingefroren und aufgetaut werden. Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Doppelergebnissen der Proben sollten auf den Regeln für gute Laborpraxis beruhen

14. ZU ERWARTENDER BEREICH

Nahrungsaufnahme, Rasse, Jahreszeit und Alter haben einen Einfluss auf die Normalwerte des 25-OH-Vitamin D₃.

Jedes Labor sollte seinen eigenen Bereich, basierend auf der lokalen Bevölkerung, etablieren.

Die gegenwärtige Literatur schlägt die folgenden Bereiche zur Klassifizierung des 25OH Vitamin D Status vor: Mangel: <10 ng/ml; Ungenügend: 10-29 ng/ml; Normal: 30 bis 100 ng/ml; Potentielle Giftigkeit: >100 ng/ml.

15. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert. Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden. Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern. Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschriffe den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).

16. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-ZÄHLUNG µl	KALIBRATOREN µl	PROBEN-KONTROLLEN µl
<u>INKUBATION</u> (in beschichteten Röhrchen) Kalibratoren Proben/Kontrollen Inkubationspuffer	- - -	25 - 500	- 25 500
Inkubation	2 Stunden bei RT (18-25°C) auf einem Schüttler (300 bis 700 Upm) Röhrchen nicht absaugen !!		
Tracer	100	100	100
Inkubation	1 Stunde bei RT (18-25°C) auf einem Schüttler (300 bis 700 Upm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung	- - -	Absaugen 2 ml Absaugen 2 ml Absaugen	
Zählung	Zählen Sie die Röhrchen für 60 Sekunden		

LITERATUR

ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status**. Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets**. J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much**. Osteoporos. Int., 11:553-555.

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.

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.












HOLICK M.F.(2004) **Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease**. Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.

HEANEY R.P. (2010) **Defining deficiency of vitamin D**. Clinical Laboratory International, October 2010, vol.34 : 16-19.

HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency**. N. Engl. J. Med., 357:266-281.

TAHA N. M., VIETH R.(2010) **The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status**. Clinical Laboratory International, November 2010, vol.34 : 28-30

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore