

## User's Manual



# 25-OH Vitamin D (total) ELISA

IVD

REF

**EIA-5396**



**96 wells**



Legal Manufacturer:

**DRG**

DRG Instruments GmbH, Germany

Division of DRG International, Inc

Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg

Telefon: +49 (0)6421-17000 Fax: +49-(0)6421-1700 50

Internet: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)

E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:



## Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu

1	INTRODUCTION.....	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS .....	3
4	REAGENTS .....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	6
6	ASSAY PROCEDURE .....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	QUALITY CONTROL .....	9
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	9
10	LIMITATIONS OF USE .....	10
11	LEGAL ASPECTS .....	11
12	REFERENCES / LITERATURE.....	11

1	EINLEITUNG.....	12
2	TESTPRINZIP.....	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN .....	13
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	14
5	PROBENVORBEREITUNG .....	16
6	TESTDURCHFÜHRUNG .....	16
7	ERWARTETE WERTE .....	18
8	QUALITÄTS-KONTROLLE .....	18
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	19
10	GRENZEN DES TESTS.....	19
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN .....	20
12	REFERENZEN / LITERATUR .....	20

	SYMBOLS USED WITH DRG ELISAS .....	21
--	------------------------------------	----

## 1 INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **DRG 25-OH Vitamin D (total) ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of total 25-OH Vitamin D (Vitamin D<sub>2</sub> and Vitamin D<sub>3</sub>) in serum and plasma.

### 1.2 Summary and Explanation

Vitamin D is a steroid hormone involved in the intestinal absorption of calcium and the regulation of calcium homeostasis. The two major forms of Vitamin D, named Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) and Vitamin D<sub>2</sub> (ergocalciferol), have isomeric structures, but D<sub>2</sub> is supposed to be less active than D<sub>3</sub><sup>1</sup>. Physiological Vitamin D<sub>3</sub> levels result not only from dietary uptake but can also be produced from a cholesterol precursor, 7-dehydrocholesterol, in the skin during sun exposure. D<sub>2</sub> is obtained from plant sources and only represents less than 5% of the total Vitamin D in the body<sup>2</sup>. In the liver, the Vitamin D is hydroxylated to 25-hydroxyvitamin D (25-OH D), the major circulating metabolite of Vitamin D. Vitamin D and 25-OH D enter the circulation bound to Vitamin D binding protein (VDBP). Upon request, a small portion of 25-OH D is further hydroxylated in the kidney to form the biologically active hormone 1,25 dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)<sub>2</sub> D)<sup>3</sup>. This process is tightly regulated by the concentration of 1,25-(OH)<sub>2</sub> D, parathyroid hormone, hypophosphatemia and ionized calcium levels. Concentrations of 1,25-(OH)<sub>2</sub> are about 1000-fold lower than that of 25-OH D<sup>4</sup>. Although 1,25-(OH)<sub>2</sub> D portrays the biological active form of Vitamin D, it is widely accepted that the measurement of circulating 25-OH D provides better information with respect to patients Vitamin D status and allows its use in diagnosis of hypovitaminosis<sup>5</sup>.

The concentration of 25-OH D decreases during winter time (reduced sun exposure), with dark skin colour and with age<sup>6</sup>.

Determination of 25-OH D in serum or plasma will support the diagnosis and therapy control of postmenopausal osteoporosis, rickets in children, osteomalacia, renal osteodystrophy, neonatal hypocalcemia and hyperparathyroidism. In addition, the effects of prevailing subclinical Vitamin D deficiency in different European countries is critically discussed<sup>6</sup>.

Vitamin D intoxication mostly occurs during a large intake of pharmaceutical preparations of Vitamin D and may lead to hypercalcemia and nephrocalcinosis in susceptible infants.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG 25-OH Vitamin D total ELISA Kit** is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

In the first step, samples have to be pretreated in separate vials with denaturation buffer to extract the analyte, since most circulating 25-OH Vit D is bound to VDBP *in vivo*. After neutralization, biotinylated 25-OH Vitamin D (enzyme conjugate) and peroxidase-labeled streptavidin- (enzyme complex) are added. After careful mixing, the solution is transferred to the wells of the microtiter plate. Endogenous 25-OH Vitamin D of a patient sample competes with a 25-OH Vitamin-D<sub>3</sub>-biotin conjugate for binding to the VDBG that is immobilized on the plate. Binding of 25-OH Vitamin D-biotin is detected by peroxidase-labeled streptavidin. Incubation is followed by a washing step to remove unbound components. The color reaction is started by addition enzyme substrate and stopped after a defined time. The colour intensity is inversely proportional to the concentration of 25-OH Vitamin D in the sample.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C – 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets. Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with Vitamin D binding protein (VDBG).
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 vials, 1 mL, ready to use;  
Concentrations: 0 – 4 – 10 – 25 – 60 – 130 ng/mL  
Conversion: 1 ng/mL = 2.5 nmol/L.  
*The standards are calibrated against the NIST Standard Reference Material (SRM) 2972;*  
Contain non-mercury preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, 1 mL each, ready to use;  
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.  
Contain non-mercury preservative.
4. **Denaturation Buffer**, 1 vial, 10 mL, ready to use
5. **Neutralization Buffer**, 1 vial, 25 mL, ready to use,  
Contains non-mercury preservative.
6. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 7 mL, ready to use,  
Vitamin D<sub>3</sub> conjugated to biotin;  
Contains non-mercury preservative.
7. **Enzyme Complex**, 1 vial, 7 mL, ready to use,  
Streptavidin-Peroxidase Conjugate  
Contains non-mercury preservative.
8. **Substrate Solution**, 1 vial, 25 mL, ready to use,  
Tetramethylbenzidine (TMB).
9. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
contains 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
10. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated),  
see „Preparation of Reagents“.
11. **Cover Foil**, 1 sheet of adhesive cover foil

**Note:** Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

### 4.2 Materials required but not provided

- Vials for the Vitamin D release step (e.g. rack with 96 vials, 0.65 mL; Code 781565; Brand)
- Incubator 37 °C (98.6 °F)
- A microtiter plate calibrated reader (450 ± 10 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic or linear graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

#### **4.4 Reagent Preparation**

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

##### ***Wash Solution***

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

*The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

#### **4.5 Disposal of the Kit**

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

#### **4.6 Damaged Test Kits**

In case of any severe damage to the test kit or components, DRG has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

## 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or plasma (EDTA-, heparin- or citrate plasma) can be used in this assay.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

### 5.1 Specimen Collection

#### Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette # 02.1388.001), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

#### Plasma:

Whole blood should be collected into centrifuge tubes containing anti coagulant and centrifuged immediately after collection.

(E.g. for EDTA plasma Sarstedt Monovette – red cap - # 02.166.001;  
for Heparin plasma Sarstedt Monovette – orange cap - # 02.165.001;  
for Citrate plasma Sarstedt Monovette – green cap - # 02.167.001.)

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 3 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying.

Specimens held for a longer time (up to two months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay.

Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

#### Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL sample + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

## 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

All standards, samples, and controls should be run in duplicate. All standards, samples, and controls should be run concurrently so that all conditions of testing are the same.

### 6.2.1 Release Procedure and Pretreatment

1. Secure the desired number of appropriate vials or uncoated plates for the Vitamin D release step (not included in the kit).
2. Dispense **25 µL** of each **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into the vials.
3. Dispense **50 µL Denaturation Buffer** into each vial.
4. Seal vials and incubate for **30 minutes** at 37 °C.
5. Add **200 µL** of **Neutralization Buffer** to each vial.
6. Add **50 µL** of **Enzyme Conjugate** to each vial.
7. Add **50 µL** of **Enzyme Complex** to each vial.
8. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing of the solution in this step. Use 200 µL of this mixed solution for the ELISA.

### 6.2.2 ELISA Procedure

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Transfer **200 µL** of the mixed solution of each **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into the appropriate wells.  
(E.g. if in step 6.2.1 a rack with 96 vials/wells is used, an 8-channel pipette can be used for the transfer.)
3. Seal wells carefully and incubate for **60 minutes** at 37 °C.
4. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **4 times** with diluted *Wash Solution* (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:**  
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Add **200 µL** of **Substrate Solution** to each well.
6. Incubate for **15 minutes** at room temperature.
7. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
8. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

## 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic or linear graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 130 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2.13
Standard 1 (4 ng/mL)	1.91
Standard 2 (10 ng/mL)	1.63
Standard 3 (25 ng/mL)	1.12
Standard 4 (60 ng/mL)	0.57
Standard 5 (130 ng/mL)	0.24

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

In a study conducted with apparently normal healthy Caucasian adolescents and adults, using the DRG 25-OH Vitamin D ELISA the following values were observed:

Population	Valid N	Age (years)	Mean Age	Mean Conc. (ng/mL)	5. Percentile (ng/mL)	95. Percentile (ng/mL)
Males	77	14 - 79	58	26.1	11.7	46.8
Females	82	17 - 79	55	30.2	14.3	56.9

Samples were collected in the month of September.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

A review of the literature suggests the following ranges for the classification of 25-OH Vitamin D status<sup>3</sup>:

Vitamin D status	25-OH Vitamin D (ng/mL)	25-OH Vitamin D (nmol/L)
Deficiency	< 10	< 25
Insufficiency	10 – 29	25 – 72.5
Sufficiency	30 – 100	75 – 250
Toxicity	> 100	> 250

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs like the international Vitamin D Quality Assessment Scheme (DEQAS) in order to ensure the accuracy of the results. Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid. In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DRG directly.

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 2.89 – 130 ng/mL.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

25-OH Vitamin D <sub>3</sub> :	100.0 %
25-OH Vitamin D <sub>2</sub> :	74.7 %
1,25 (OH) <sub>2</sub> Vitamin D <sub>3</sub> :	< 0.1 %
Vitamin D <sub>3</sub> :	3.6 %

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DRG ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the Zero Standard (S0) and was found to be < 2.89 ng/mL.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	25.1	4.4
2	20	43.2	3.0
3	20	93.7	6.6

#### 9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	40	23.7	9.9
2	40	47.8	10.7
3	40	64.2	8.6

### 9.5 Recovery

Samples have been spiked by adding 3 solutions with known concentrations in a 1:1 ratio. The % recovery has been calculated by multiplication of the ratio of the measurements and the expected values with 100 (expected value = (endogenous value + added value) / 2; because of a 1:2 dilution of serum with spike material).

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Concentration [IU/mL]</b>		60.5	36.4	82.6
<b>Average Recovery</b>		105.2	104.1	92.5
<b>Range of Recovery [%]</b>	from	96.9	92.9	88.2
	to	111.3	112.4	94.1

### 9.6 Linearity

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
<b>Concentration [IU/mL]</b>		104.8	69.4	88.7
<b>Average Recovery</b>		114.8	104.6	98.4
<b>Range of Recovery [%]</b>	from	105.7	85.8	94.7
	to	109.2	97.8	103.3

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

### 10.2 Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of 25-OH Vitamin D in a sample.

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

### 11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### 11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 12 REFERENCES / LITERATURE

1. Armas LAG., Hollis M., Heaney RP. Vitamin D<sub>2</sub> is much less effective than vitamin D<sub>3</sub> in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004; 89(11) 5387-91.
2. Houghton LA., Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D<sub>2</sub>) as a vitamin supplement. *Am. J. Nutr.* 2006; 84, 694-97.
3. Holick M. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes* 2002; 9(1) 87-98.
4. Pilz S. et al. Vitamin D: clinical implications beyond musculoskeletal diseases. *J. Lab. Med.* 2011; 35(4) 211-16.
5. Visser M. et al. Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006; 84(3) 616-22.
6. Souberbielle JC. Et al. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. *Autoimmun Rev.* 2010; 9 709-15.

## 1 EINLEITUNG

Der **DRG 25-OH Vitamin D ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Vitamin D in Serum und Plasma eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

### 1.1 Zusammenfassung und Erläuterung

Vitamin D ist ein Steroidhormon, das die Aufnahme von Kalzium aus dem Darm und die Kalzium-homöostase reguliert. Die zwei häufigsten Formen von Vitamin D sind Vitamin D<sub>3</sub> (Cholecalciferol) und Vitamin D<sub>2</sub> (Ergocalciferol), die isomere Strukturen aufweisen, wobei D<sub>2</sub> eine geringere biologische Aktivität zugeschrieben wird<sup>1</sup>.

Vitamin D<sub>3</sub> wird nicht nur durch die Nahrung aufgenommen, sondern auch in der Haut unter Einfluss von Sonnenlicht aus dem Cholesterin-Vorläufermolekül 7-Dehydrocholesterin gebildet. D<sub>2</sub> hingegen wird vorwiegend durch pflanzliche Nahrung zugeführt und stellt normalerweise weniger als 5% des gesamten Vitamin D-Gehaltes dar<sup>2</sup>. In der Leber wird Vitamin D zu 25-Hydroxy-Vitamin D (25-OH D) hydroxyliert, welches die wichtigste Speicherform des Vitamin D darstellt. Im Blut sind Vitamin D und 25-OH D fast vollständig an das Transportprotein Vitamin D Bindeprotein (VDBP) gebunden. Bei Bedarf wird 25-OH D in der Niere zur biologisch aktiven Form 1,25 Dihydroxy Vitamin D (1,25-(OH)<sub>2</sub> D) umgewandelt<sup>3</sup>.

Dieser Prozess wird durch die Konzentration von 1,25-(OH)<sub>2</sub> D, Parathormon, ionisiertem Kalzium sowie durch Hypophosphatämie streng reguliert. Der 1,25-(OH)<sub>2</sub> D-Spiegel liegt deshalb ungefähr 1000-fach niedriger als der 25-OH D-Spiegel<sup>4</sup>. Obwohl 1,25-(OH)<sub>2</sub> D die biologisch aktive Form von Vitamin D darstellt, wird die Bestimmung von 25-OH D inzwischen als geeignete Methode angesehen, um den Vitamin D Status zu erfassen und um eine Hypovitaminose zu diagnostizieren<sup>5</sup>.

Die Konzentration von 25-OH D sinkt während der Winterzeit (geringere Sonnenexposition), bei dunkler Hautfarbe sowie mit zunehmendem Alter<sup>6</sup>.

Die Bestimmung von 25-OH D aus Serum oder Plasma unterstützt die Diagnose und Therapie der postmenopausalen Osteoporose, der Rachitis bei Kindern, der Osteomalazie, der renalen Osteodystrophie, der neonatalen Hypokalzämie sowie des Hyperparathyreoidismus. Ferner werden die Auswirkungen des akuten subklinischen Vitamin D Mangels in verschiedenen europäischen Ländern kritisch diskutiert<sup>6</sup>.

Schädliche Effekte können bei Einnahme sehr hoch dosierter pharmazeutischer Vitamin D Präparate auftreten, und bei Kindern zu Hyperkalzämie und Nephrokalzinose führen.

## 2 TESTPRINZIP

Der **DRG 25-OH Vitamin D ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

In einem ersten Schritt werden Proben, Standards und Kontrollen in separaten Gefäßen mit Denaturations-Buffer vorbehandelt, um das Vitamin D aus seiner Bindung an Vitamin D Bindeprotein (VDBP) zu lösen. Nach Zugabe des Neutralization Buffers werden nacheinander biotinyliertes 25-OH Vitamin D (Enzyme Conjugate) und Peroxidase-markiertes Streptavidin- (Enzyme Complex) zugegeben. Nach sorgfältigem Mischen wird die Lösung auf die Wells der Mikrotiterplatte übertragen. Endogenes 25-OH Vitamin D der Probe kompetiert mit biotinyliertem 25-OH Vitamin-D<sub>3</sub> um die Bindung an das VDBG, das auf der Platte immobilisiert ist. Die Bindung von biotinyliertem 25-OH Vitamin D wird durch Peroxidase-markiertes Streptavidin nachgewiesen. Nach Inkubation werden ungebundene Substanzen durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt.

Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der 25-OH Vitamin D -Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

### 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Materialsicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich. Die Materialsicherheitsdatenblätter entsprechen den Verordnungen der EU-Richtlinie 91/155 EC.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit Vitamin D Bindeprotein (VDBP) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig;  
Konzentrationen: 0 – 4 – 10 – 25 – 60 – 130 ng/mL  
Umrechnungsfaktor: 1 ng/mL = 2,5 nmol/L.  
*Die Standards sind kalibriert gegen das NIST Standard Reference Material (SRM) 2972*  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 1 mL; gebrauchsfertig  
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Denaturation Buffer** (Denaturierungspuffer), 1 Fläschchen, 10 mL, gebrauchsfertig;
5. **Neutralization Buffer** (Neutralisierungspuffer), 1 Fläschchen, 25 mL, gebrauchsfertig;  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 7 mL, gebrauchsfertig;  
Vitamin D<sub>3</sub> mit Biotin konjugiert.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
7. **Enzyme Complex** (Enzymkomplex), 1 Fläschchen, 7 mL, gebrauchsfertig;  
Streptavidin mit Peroxidase markiert  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
8. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
9. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
10. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.
11. **Cover Foil**, 1 x selbstklebende Abdeckfolie

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Geeignete Reaktionsgefäße oder Mikrotiterplatten für die Freisetzung des 25-OH Vitamin D (z.B. Röhren-Rack mit 96 Röhren, 0.65 mL; Code 781565; Brand)
- Inkubator 37 °C (98,6 °F)
- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

#### **4.4 Vorbereitung der Reagenzien**

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

##### ***Wash Solution***

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

*Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

#### **4.5 Entsorgung des Kits**

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Materialsicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

#### **4.6 Beschädigte Testkits**

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DRG in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

## 5 PROBENVORBEREITUNG

Serum oder Plasma (EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma) kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.

*Achtung:* Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

### 5.1 Probenentnahme

#### Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette # 02.1388.001), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

#### Plasma:

Die Blutentnahme erfolgt mit Röhrchen, die ein Antikoagulantien enthalten. Das Plasma wird als Überstand nach einer Zentrifugation gewonnen.

(z.B.: für EDTA-Plasma Sarstedt Monovette – roter Deckel - # 02.166.001;  
für Heparinplasma Sarstedt Monovette – oranger Deckel - # 02.165.001;  
für Zitratplasma Sarstedt Monovette – grüner Deckel - # 02.167.001.)

### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 3 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 2 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchgemischt werden, ohne Schaumbildung.

### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### Beispiel:

- a) Verdünnung 1:10: 10 µL Patientenprobe + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)
- b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

## 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.  
Es wird empfohlen Doppelbestimmungen durchzuführen.

### 6.2.1 Freisetzung und Vorbereitung

1. Die benötigte Anzahl an Reaktionsgefäßen oder unbeschichtete Wells für die Freisetzung des Vitamin D bereitstellen (nicht im Kit enthalten).
2. Je **25 µL Standard, Control** und **Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Gefäße geben.
3. **50 µL Denaturation Buffer** in jedes Gefäß geben.
4. Gefäße verschließen und **30 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
5. **200 µL Neutralization Buffer** in jedes Gefäß geben.
6. **50 µL Enzyme Conjugate** in jedes Gefäß geben.
7. **50 µL Enzyme Complex** in jedes Gefäß geben.
8. Alle Gefäße für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung der Lösungen zu erreichen.  
200 µL dieser Lösung werden im ELISA eingesetzt.

### 6.2.2 ELISA-Durchführung

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung der Mikrotiterplatte befestigen.
2. **200 µL** der gut durchmischten Lösung von **Standard, Control** und **Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Wells überführen.  
(Falls für Schritt 6.2.1 ein Rack mit 96 Röhrchen/Wells eingesetzt wird, kann für den Transfer z.B. eine 8-Kanal-Pipette verwendet werden.)
3. Alle Wells sorgfältig mit Folie versiegeln und für **60 Minuten** bei 37 °C inkubieren.
4. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **4-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
5. **200 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
6. **15 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
7. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
8. Die Optische Dichte bei **450 ± 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

## 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt.  
Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	2,13
Standard 1 (4 ng/mL)	1,91
Standard 2 (10 ng/mL)	1,63
Standard 3 (25 ng/mL)	1,12
Standard 4 (60 ng/mL)	0,57
Standard 5 (130 ng/mL)	0,24

## 7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

In einer Studie wurden die Proben von gesunden kaukasischen Jugendlichen und Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DRG 25-OH Vitamin D ELISA folgende Werte:

Population	Anzahl N	Alter (Jahre)	Mittelwert Alter	Mittelwert (ng/mL)	5. Perzentile (ng/mL)	95. Perzentile (ng/mL)
Männer	77	14 - 79	58	26,1	11,7	46,8
Frauen	82	17 - 79	55	30,2	14,3	56,9

Die Proben wurden im Monat September gesammelt.

In der Literatur werden folgende Bereiche für die Klassifizierung des 25-OH-Vitamin D Status vorgeschlagen<sup>3</sup>:

Vitamin D Status	25-OH Vitamin D (ng/mL)	25-OH Vitamin D (nmol/L)
Defizienz (schwerer Mangel)	< 10	< 25
Insuffizienz (Mangel)	10 – 29	25 – 72,5
Suffizienz (gut versorgt)	30 – 100	75 – 250
Toxisch (schädlich)	> 100	> 250

## 8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen (z.B. International Vitamin D Quality Assessment Scheme; DEQAS) teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

## **9 ASSAY CHARACTERISTIKA**

### **9.1 Messbereich**

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 2,89 – 130 ng/mL.

### **9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)**

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### **9.3 Sensitivität**

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* ( $n = 20$ ), beträgt  $< 2,89$  ng/mL.

Die Daten zu:

### **9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)**

### **9.5 Wiederfindung**

### **9.6 Linearität**

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## **10 GRENZEN DES TESTS**

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### **10.1 Interferenzen**

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

### **10.2 Beeinflussung durch Medikamente**

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des 25-OH Vitamin D-Gehaltes der Probe beeinflussen würde.

### **10.3 High-Dose-Hook Effekt**

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**











Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## **12 REFERENZEN / LITERATUR**

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## SYMBOLS USED WITH DRG ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	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	Para uso 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
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température 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
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro-titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdunnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdunnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante
<i>Denaturation Buffer</i>	Denaturation Buffer	Denaturierungspuffer			
<i>Neutralization Buffer</i>	Neutralization Buffer	Neutralisierungspuffer			
<i>Cover Foil</i>	Cover foil	Abdeckfolie			