

FluoBolt™-Vitamin D

METALL-VERSTÄRKTER FLUORESZENZ IMMUNOASSAY FÜR
DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON VITAMIN D IN
HUMANEM SERUM UND KAPILLARTROCKENBLUT

Kat. Nr. FIA-1709-C5
96 Well Format

CE



FIANOSTICS GmbH, A-2700 Wiener Neustadt, Viktor Kaplan Strasse 2

Tel: + 43/2622/27514, E-Mail: office@fianostics.at

rev.no. 230927

INHALT

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG	2
3. INHALT DES KITS	4
4. ZUSÄTZLICHES, MITGELIEFERTES MATERIAL	4
5. ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE MATERI- LIEN UND GERÄTE	4
6. REAGENZIEN- UND PROBENVORBEREITUNG	5
7. ASSAY-VERFAHREN	7
8. BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	10
9. LEISTUNGSMERKMALE	12
10. LIMITIERUNGEN & TECHNISCHE HINWEISE	13
11. VORSICHTSMASSNAHMEN	15
12. LITERATUR	16
13. NOTIZEN	17

1) VERWENDUNGSZWECK

Der FluoBolt™-Vitamin D Kit ist ein metallverstärkter Fluoreszenz-Immunoassay (MEF-FIA) zur quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin D3 [25(OH)D3] in humanem Serum und getrocknetem Kapillarblut. Der ermittelte Wert dient zur Beobachtung des Vitamin D Status und kann auf eine Unter- oder Überversorgung hinweisen.

Die Anwendung des Tests ist auf zertifizierte Labore beschränkt, die die Anforderungen zur Durchführung von Tests mit mittlerer oder hoher Komplexität erfüllen.

Der Vitamin D Status im Blut ist sehr variabel und abhängig von der Jahreszeit, Tageszeit, Exposition mit Sonnenlicht, Verwendung von Sonnenschutz und Alter.

2) ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Vitamin D wird in der Haut durch Einwirkung von UV-Licht gebildet (~90%) oder zu einem geringeren Teil mit der Nahrung aufgenommen (~10%). Die beiden Hauptmetaboliten sind Vitamin D3 (Cholecalciferol), das hauptsächlich in der Haut gebildet wird bzw. über tierische Produkte aufgenommen wird, und Vitamin D2 (Ergocalciferol), welches hauptsächlich in pflanzlichen Lebensmitteln vorhanden ist.

Zirkulierendes Vitamin D2 und D3 wird in der Leber zu 25(OH)D umgewandelt und in weiterer Folge in der Niere zum aktiven 1,25(OH)2D. Im Blut liegen die Vitamin D Metaboliten hauptsächlich gebunden an das Vitamin D Bindeprotein (VDBP) vor, weniger als 1% zirkuliert in freier Form. Aufgrund der geringen biologischen Aktivität und einer längeren Halbwertszeit gilt 25(OH)D als Speicherform und ist ein guter Indikator für den Vitamin D Status im Blut.

Vitamin D hat wichtige Funktionen im Knochen- und Mineralstoffwechsel, sowie für das Immun- und Herzkreislaufsystem und das allgemeine Wohlbefinden. Ein Mangel (Hypovitaminose D) mit einer Serumkonzentration ≤ 20 ng/ml (50 nmol/l) ist weltweit verbreitet und wird durch unzureichende Aufnahme oder zu wenig Exposition mit Sonnenlicht verursacht. Allgemein wird geschätzt, dass ~50% der Bevölkerung unzureichend versorgt sind. Ein niedriger Vitamin D Spiegel kann Müdigkeit begünstigen, ein chronischer Mangel verursacht Rachitis bei Kindern und Osteomalazie bei Erwachsenen und kann durch Vitamin D Einnahme behandelt werden.

Eine regelmäßige Überwachung des Vitamin D Status vor allem bei Menschen mit erhöhtem Risiko für einen Mangel kann eine frühzeitige Erkennung ermöglichen und dazu beitragen, gesundheitliche Folgeschäden zu verhindern.

Testprinzip:

Beim FluoBolt™-Vitamin D Kit handelt es sich um einen kompetitiven Fluoreszenz-Immunoassay auf der FluoBolt™-Plattform (FIA-1700). Das in der Patientenprobe (Serum oder getrocknetes Kapillarblut) vorhandene 25(OH)D3 konkurriert mit Biotin-markiertem 25(OH)D3 um die Bindungsstellen von Anti-25(OH)D3-Antikörpern, die auf der Metal Enhanced Fluorescence-Mikrotiterplatte (MEF-MTP) beschichtet sind. Die Menge an Fluoreszenzeinheiten (FUs), die nach Zugabe einer fluoreszenzmarkierten Streptavidinlösung (SA) mit einem Fluoreszenz-Mikroplattenlesegerät gemessen werden, ist indirekt proportional zur 25(OH)D3-Konzentration in der Probe. Kalibratoren mit bekannter Menge an 25(OH)D3 werden verwendet, um Eichkurven zu erstellen und so die Konzentration einer unbekannt Probe zu quantifizieren.

3) INHALT DES KITS

ID	KIT-KOMPONENTE	Menge
MIX	Transparente Mikrotiterplatte für Standard- und Proben- vorbereitung, verpackt in Plastikbeutel	1x 96 well
PM	Schwarze MEF-MTP vorbeschichtet mit Anti-25(OH)D3 Antikörper; vakuumverpackt in einem Aluminiumbeutel	1x 96 well
PA5	Detektionslösung bestehend aus Biotin-markiertem 25(OH)D3 und fluoreszenzmarkiertem Streptavidin in Puffer mit Freisetzungsreagens; in dunklem Glasfläsch- chen mit Schraubverschluss, lyophilisiert	1x 5 ml
PS	Standards 1-6 bestehend aus 25(OH)D3 in humanem Serum (200, 100, 50, 25, 12.5, 0 ng/ml), in Glasfläsch- chen mit weißem Schraubverschluss, lyophilisiert	6x 0.1 ml
PCA/B	Kontrolle A (hoch, gelber Schraubverschluss) und B (niedrig, grüner Schraubverschluss) in Glasfläschchen, lyophilisiert; die Zielwerte sind auf dem Etikett angege- ben.	2x 0.1 ml
PR	Proben-Release Puffer, in Kunststoffflasche mit farblos- er Kappe, gebrauchsfertig	1x 12 ml
PD	Probenverdünnungspuffer, in Kunststoffflasche mit farb- loser Kappe, gebrauchsfertig	1x 10 ml
WP	Waschpufferkonzentrat 20x, in Kunststoffflasche mit farbloser Kappe	1x 25 ml

4) ZUSÄTZLICHES, MITGELIEFERTES MATERIAL

- 1 selbstklebende Kunststoffolie
- Datenblatt der Qualitätskontrolle
- Protokollblatt
- Bedienungsanleitung
- Trockenmittelbeutel zur Plattenaufbewahrung

5) ERFORDERLICHE, NICHT GELIEFERTE MATERIALIEN UND GERÄTE

- Präzisionspipetten kalibriert auf 10µl, 20µl, 50µl, 200µl,
500µl und Einwegspitzen
- Plattenwaschgerät, Mehrkanalpipette oder

- Mehrkanaldispenser zum Waschen
- Kühlschrank mit 4°C (2-8°C)
- Fluoreszenz-Mikroplattenleser
- Millimeterpapier oder Software zur Berechnung der Ergebnisse

Zusätzlich bei Verwendung getrockneter Kapillarblutproben:

- Mikrotiterplatte für Probenextraktion
- Mikrotiterplattenschüttler

6) REAGENZIIEN- UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind bei 4 °C (2-8 °C) bis zum auf dem Etikett jedes Reagens angegebenen Verfallsdatum stabil.

Probensammlung

1) Serumproben

Sammeln Sie venöse Blutproben, indem Sie standardisierte Blutentnahmeröhrchen für Serum verwenden. Wir empfehlen die Serumtrennung durch Zentrifugation so schnell wie möglich durchzuführen, z.B. 10 min bei 2000 x g, vorzugsweise bei 4°C (2-8°C). Die gewonnenen Serumproben sollten so schnell wie möglich gemessen werden. Für längere Lagerung sollten die Proben aliquotiert und bei Temperaturen von -20°C oder darunter gelagert werden. Proben nicht mehr als 4mal einfrieren und auftauen. Lipämische oder hämolytische Proben können fehlerhafte Ergebnisse liefern. Die Proben sollten vor der Analyse gut gemischt werden. Für weitere Informationen zur Probenstabilität kontaktieren Sie uns per E-mail unter support@fianostics.at oder telefonisch unter + 43/2622/27514.

2) Kapillarblutproben

Dieser Assay wurde auch für die Verwendung von getrockneten Kapillarblutproben validiert, die mit 20 µl Mitra® - Microsamplern gesammelt wurden (Neoteryx LLC,

Torrence CA 90501, USA). Mitra-Proben müssen vor Verwendung im Assay mit Release-Puffer (PR) extrahiert werden (siehe "7.2 Assay-Verfahren"). Details zum Entnahmeverfahren finden Sie im Handbuch unseres separat erhältlichen Blutentnahme-Kits (Cat. No. INO-2201B).

Reagenzienvorbereitung:

1) Vorbereitung des Waschpuffers

Bringen Sie das 20x Waschpufferkonzentrat (WP) auf Raumtemperatur. Achten Sie darauf, dass die Lösung klar und ohne jegliche Salzpräzipitate vorliegt, bevor das Konzentrat weiter verdünnt wird. Verdünnen Sie das WP vor dem Einsatz im Assay auf die Arbeitskonzentration, indem Sie die entsprechende Menge destilliertes oder deionisiertes Wasser (dH₂O) zugeben, z.B. 25 ml WP + 475 ml Wasser. Unverdünnter WP ist bei 4°C (2-8°C) bis zum auf dem Etikett aufgedruckten Verfallsdatum haltbar. Verdünnter WP ist bei 4°C (2-8°C) bis zu einem Monat haltbar. Verwenden Sie nur verdünnten WP im Assay.

2) Vorbereitung der Standards und Kontrollen

Rekonstituieren Sie die Standards und Kontrollen, indem Sie 100µl dH₂O zum gefriergetrockneten Feststoff am Boden der Fläschchen hinzufügen. Überprüfen Sie, ob sich der Feststoff tatsächlich unten und nicht an anderer Stelle im Fläschchen (z.B. an den Seiten) befindet, bevor Sie dH₂O hinzufügen. Schließen Sie die Fläschchen und lassen Sie sie 10 Minuten bei RT stehen. Danach kurz mit z.B. einem Vortexmischer homogenisieren. Rekonstituierte Standards/Kontrollen können bis zu fünfmal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

3) Vorbereitung der Detektionslösung

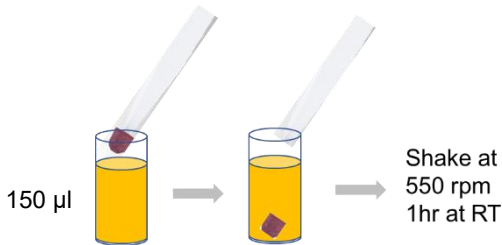
Rekonstituieren Sie die Detektionslösung, indem Sie 5 ml Probenverdünnungspuffer (PD) zum gefriergetrockneten

Feststoff am Boden des Fläschchens hinzufügen. Vorgehensweise wie bei Punkt 2). Die rekonstituierte Detektionslösung kann bis zu 4 mal eingefroren und wieder aufgetaut werden.

7) ASSAY-VERFAHREN

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Verwendung im Assay auf Raumtemperatur (18-26°C) gebracht werden.

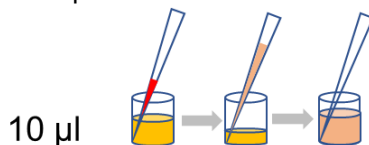
- 1) **Erstellen des Plattenlayouts**
Tragen Sie die Positionen der Standards, Kontrollen und Proben auf dem Protokollblatt ein. Wir empfehlen grundsätzlich Doppelwerte anzusetzen.
- 2) Wenn Sie **Serumproben** verwenden, dann fahren Sie bitte mit Schritt 4 fort.
- 3) Wenn Sie auf **Mitra-Microsampler** getrocknete Kapillarblutproben verwenden, dann fahren Sie wie folgt fort:
 - Pipettieren Sie 150 µl **Proben-Release Puffer (PR)** für jede gesammelte Probe in geeignete Reaktionsgefäße (1-1.5ml) oder in eine Mikrotiterplatte.
 - Fügen Sie das adsorbierende Pad der 20 µl Mitra® - Microsampler Proben durch vorsichtiges Abstreifen am Rand des Reaktionsgefäßes oder des Wells der Mikrotiterplatte hinzu. **Geben Sie dabei acht, das adsorbierende Pad der Mitra® - Microsampler nicht zu berühren.**
 - Schütteln Sie die Proben mit einem geeigneten Mikrotiterplattenschüttler für 1 Stunde mit 550 rpm bei Raumtemperatur.Weiter mit Schritt 4!



- 4) Entfernen Sie die **transparente Mikrotiterplatte (MIX)**, die zum Vormischen der Standards bzw. Proben und Detektionslösung verwendet wird, aus dem Plastikbeutel. Pipettieren Sie 50 μ l **Detektionslösung (PA5)** in jede erforderliche Vertiefung (Well) der MIX-Platte.

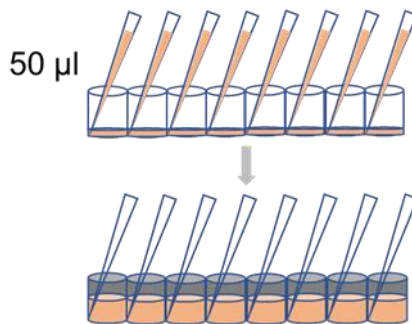


- 5) Fügen Sie nun 10 μ l Standard, Kontrolle oder Probe zu den Wells der MIX-Platte entsprechend den markierten Positionen auf dem Protokollblatt hinzu. Es ist wichtig sicherzustellen, dass die Pipettenspitze am Rand bis zum Boden der Vertiefung geführt wird, um eine ausreichende Vermischung mit der Detektionslösung zu gewährleisten. Verwenden Sie für jedes Well eine frische Pipettenspitze.



- 6) Entfernen Sie die **schwarze MEF-Mikrotiterplatte (PM)** aus den Aluminiumbeuteln. Verschließen Sie alle Wells, die nicht im folgenden Assay benutzt werden, mit der mitgelieferten selbstklebenden Plastikfolie (passend zugeschnitten).

- 7) Übertragen Sie nun zügig 50µl der vorgemischten Standards, Kontrollen, Serum-/Plasmaproben von der transparenten MIX-Platte auf die schwarze PM-Platte mit einer 8-Kanal Pipette. Führen Sie die Pipettenspitzen erneut am Rand zum Boden des Wells, bevor die Spitzen geleert werden.



- 8) Wenn alle vorgesehenen Wells gefüllt sind, schließen Sie die Wells gründlich mit der mitgelieferten selbstklebenden Abdeckfolie und inkubieren Sie die Platte für 60 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur (18-26°C).
- 9) Entfernen Sie den Inhalt der Vertiefungen durch Ausleeren oder Ansaugen und waschen Sie die Platte 3x mit 200 µl verdünntem WP pro Well. Nach dem letzten Waschschrift entfernen Sie die verbleibende Flüssigkeit, indem Sie die Platte kräftig mit den Wells nach unten gegen einen Stapel Papiertücher oder ein ähnliches saugfähiges Material klopfen.
- 10) Messen Sie die leere Platte sofort bzw. maximal 5 Minuten nach dem Waschen mit einem Mikrotiterplattenleser mit Anregungs-/Emissionswellenlängen, die für verwendeten Fluoreszenzfarbstoff geeignet sind (die Ex/Em Maxima betragen für FITC: 495/518 nm, Cy3: 550/570 nm, Cy5: 650/670 nm und AlexaFluor680: 679/702 nm).

Die Empfindlichkeitseinstellung des Lesegeräts (Gain) sollte so gewählt werden, dass eine Differenz von mindestens 10 000 FUs zwischen dem 0 µg/ml und dem 200 ng/ml Standard erreicht werden.

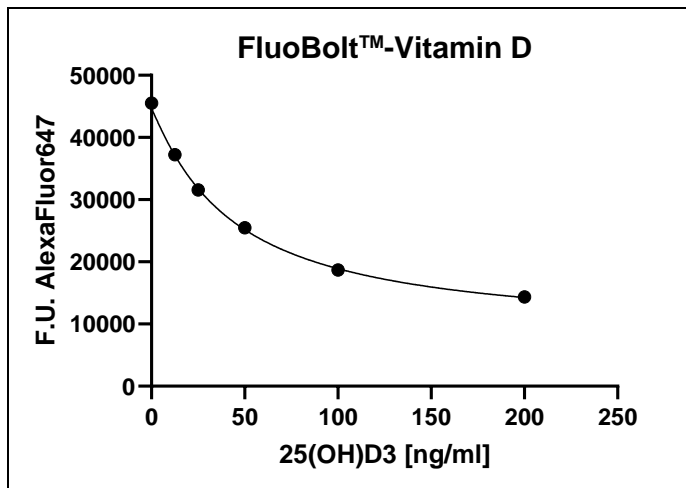
- 11) Proben, die das Signal des höchsten Standards überschreiten, müssen nach Verdünnung mit dem mitgelieferten Probenverdünnungspuffer (PD) erneut getestet werden.

8) BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Berechnung

Erstellen Sie eine Kalibrierkurve aus den FUs der Standards mit handelsüblich erhältlicher Software oder Millimeterpapier. Lesen Sie Konzentrationen der Kontrollen und Proben aus dieser Kalibrierkurve ab. Der Assay wurde mit einem 4PL-Algorithmus validiert. Andere Kurvenanpassungsmethoden müssen vom Benutzer evaluiert werden.

Beispiel für typische Kalibrierkurve:



Das mit dem Kit gelieferte Qualitätskontroll (QC)-Protokoll zeigt die Ergebnisse der finalen Freigabe-QC für jede Kit-Lot zum Produktionsdatum an. Die vom Kunden erhaltene Fluoreszenzintensität kann aufgrund verschiedener Einflüsse und/oder aufgrund der normalen Abnahme der Signalintensität während der Haltbarkeit variieren. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Ergebnisse, solange die mitgelieferten Kit-Kontrollen innerhalb der Spezifikationen liegen (Zielbereiche: siehe Etiketten).

Die aus der jeweiligen Kalibrierkurve abgelesenen Konzentrationen ergeben die Konzentrationen von 25(OH)D3 in ng/ml.
Umrechnung: 25-OH-Vitamin D [ng/mL] x 2.5 = nmol/L

Interpretation

<10 ng/ml	schwerer Mangel
10-30 ng/ml	unzureichende Versorgung
30-50 ng/ml	ausreichende Versorgung
50-100 ng/ml	erhöhter Spiegel (Substitution?)
>100 ng/ml	Überdosierung (Toxizität)

Die angegebenen Konzentrationsbereiche zur Einstufung des Vitamin D Versorgungsstatus sollten als Empfehlung angesehen werden. Faktoren wie z.B. Ernährung, Jahreszeit, Hautfarbe, Alter und Kulturkreis den normalen 25(OH)D-Spiegel beeinflussen.

Die Ergebnisse dieses Tests sollten immer in Verbindung mit der Krankengeschichte, der klinischen Präsentation und anderen Befunden der getesteten Personen interpretiert werden.

9) LEISTUNGSMERKMALE

Analytische Spezifität:

Der Assay detektiert 25(OH)D3 und 3-epi-25(OH)D3. Es besteht keine Kreuzreaktivität mit 25(OH)D2.

Messtechnische Rückführbarkeit

Die folgenden internationalen Referenzproben, wurden im Assay getestet:

Quantimetrix Complete D[®] 25-OH Vitamin D Control (Katalog#1290-01), rückführbar auf den NIST-Standard SRM 972a

Ergebnisse:

25(OH)D3 [ng/ml]		
Target Values (LC-MS/MS)	FluoBolt™-Vitamin D	
Level 1	9	6
Level 2	29	20

Präzision:

Intra-Assay Präzision: 4 Proben mit bekannten Konzentrationen wurden 3-mal innerhalb eines Assay-Laufes getestet.

Inter-Assay Präzision: 4 Proben mit bekannten Konzentrationen wurden in Duplikaten in 3 verschiedenen Assay-Läufen getestet.

Inter-Charge Präzision: 3 Proben mit bekannten Konzentrationen wurden in Duplikaten mit 3 verschiedenen Kit Chargen getestet.

Intra-Assay (n=3)	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Mean [ng/ml]	24,7	34,6	57,6	69,4
SD [ng/ml]	2,6	2,7	4,0	7,5
CV (%)	10,3%	7,7%	7,0%	10,7%
Inter-Assay (n=3)	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Mean [ng/ml]	45,7	28,8	20,9	42,0
SD [ng/ml]	4,1	2,8	0,8	2,4
CV (%)	9,0%	9,7%	3,6%	5,7%

Inter-Charge (n=3)	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Mean [ng/ml]	42	23	17	134
SD [ng/ml]	2,5	3,9	0,5	11,5
CV (%)	6%	17%	3%	9%

Nachweisgrenze:

Untere Nachweisgrenze (Lower Limit of Detection, LoD):

Die LoD entspricht der niedrigsten Konzentration von 25(OH)D₃, die nachgewiesen werden kann. Die LoD dieses Tests wurde entsprechend der Konzentration, die sich durch den Mittelwert des 0 ng/ml Kalibrators mit drei Standardabweichungen in 6 Assay-Läufen ergibt, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden, ermittelt und wird auf 9,8 ng/ml geschätzt.

Quantifizierungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LLoQ):
12,5 ng/ml

Linearität: Für die Linearitätsstudie wurden drei verschiedene Serumproben innerhalb des Konzentrationsbereichs der Standards gemessen und seriell mit Standard 5 verdünnt. Die mittlere Linearitätswiederfindung betrug 121 %.

Klinische Übereinstimmung: Für einen Methodenvergleich mit einem automatisierten Immunoassay eines Mitbewerbers wurden 48 Humanserumproben mit dem FluoBolt™-Vitamin D Assay gemessen und die Messwerte verglichen:
Pearson $r = 0.9384$ (***) $p < 0,0001$).

10) LIMITIERUNGEN & TECHNISCHE HINWEISE

Limitierungen:

Die folgenden Informationen beziehen sich auf Einschränkungen des Assays:

- Die Verwendung des FluoBolt™-Vitamin D Assays ist auf geschultes Laborpersonal beschränkt. Nicht für den

Heimgebrauch.

- Leistungsmerkmale dieses Assays wurden nicht in Verbindung mit Assays anderer Hersteller für Vitamin D festgelegt. Labore sind für die Etablierung eigener Leistungsmerkmale verantwortlich.
- Die mit dem Assay erzielten Ergebnisse dürfen nicht austauschbar mit Werten verwendet werden, die mit den Testmethoden anderer Hersteller erzielt wurden.
- Die Leistungsfähigkeit wurde nur mit den im Verwendungszweck aufgeführten Probentypen festgestellt. Andere Probentypen wurden nicht evaluiert und sollten nicht mit diesem Assay verwendet werden.
- Die Ergebnisse sind nicht als Grundlage für Entscheidungen des Patientenmanagements gedacht.

Technische Hinweise:

- Mischen oder ersetzen Sie Reagenzien nicht mit denen anderer Chargen oder Quellen.
- Mischen Sie keine Stopfen oder Kappen von verschiedenen Reagenzien und verwenden Sie keine Reagenzien verschiedener Chargen.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach Ablauf des Haltbarkeitsdatums.
- Schützen Sie Reagenzien vor direkter Sonneneinstrahlung.
- Um genaue Ergebnisse zu gewährleisten, achten Sie auf die richtige Haftung der selbstklebenden Plastikfolien für eine vollständige Versiegelung der Wells während der Inkubationsschritte.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

11) VORSICHTSMASSNAHMEN

- Flüssige Reagenzien enthalten $\leq 0,1\%$ Proclin 300 als Konservierungsmittel. Proclin 300 ist nicht toxisch in den im Kit verwendeten Konzentrationen. Es kann allergische Hautreaktionen verursachen – vermeiden Sie den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten.
- Pipettieren Sie nicht mit dem Mund.
- Wenn Reagenzien verwendet werden, essen, trinken und rauchen Sie nicht und tragen Sie keine Kosmetika auf.
- Tragen Sie Handschuhe, Schutzbrillen und einen Labormantel, wenn Sie diesen Assay durchführen.
- Chemikalien und vorbereitete, gebrauchte, ungebrauchte oder ablaufende Reagenzien sind unter Beachtung der jeweiligen nationalen Bestimmungen als Gefahrstoffabfall zu entsorgen.
- Alle schwerwiegenden Zwischenfälle im Zusammenhang mit diesem Produkt sind dem Hersteller und der zuständigen Behörde des Mitgliedstaates zu melden, in dem der Anwender und/oder der Patient niedergelassen ist.
- Alle Reagenzien dieses Kits, die humanes Serum enthalten, ergaben bei der Prüfung auf anti-HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV 1 und HCV RNA-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potenziell infektiöses Material behandelt werden.

12) LITERATUR

Vitamin D status in healthy populations worldwide: a systematic review protocol. Dunlop E et al., JBI Evid Synth. 2023;10.11124/JBIES-22-00354. doi:10.11124/JBIES-22-

Prevalence of vitamin D deficiency and associated risk of all-cause and cause-specific mortality among middle-aged and older adults in the United States. Wang TY et al., Front Nutr. 2023;10:1163737. doi:10.3389/fnut.2023.1163737

Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. Pilz S et al., Endocr Connect. 2019 Feb 1;8(2):R27-R43. doi: 10.1530/EC-18-0432.

Vitamin D Testing-Where Are We and What Is on the Horizon? Heurreux N. Adv Clin Chem. 2017;78:59-101. doi:10.1016/bs.acc.2016.07.002

Relative Efficacy of Vitamin D2 and Vitamin D3 in Improving Vitamin D Status: Systematic Review and Meta-Analysis. Balachandar R et al., Nutrients. 2021 Sep 23;13(10):3328. doi: 10.3390/nu13103328

Vitamin D Standardization Program (VDSP). Standardizing vitamin D assays: the way forward. Binkley N, Sempos CT. J Bone Miner Res. 2014;29(8):1709-1714. doi:10.1002/jbmr.2252

An assessment of 25-hydroxyvitamin D measurements in comparability studies conducted by the Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program. Bedner M, Lippa KA, Tai SS. Clin Chim Acta. 2013 Nov 15;426:6-11. doi: 10.1016/j.cca.2013.08.012.

