

Arbeitsanleitung/Manual

1,25-(OH)₂-Vitamin D ELISA Kit

Zur in vitro Bestimmung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D in Plasma und Serum

For the in vitro determination of 1,25-(OH)₂ vitamin D in plasma and serum

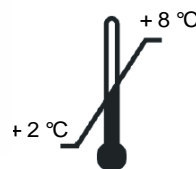
Gültig ab/valid from 05.11.2008



K 2112



48



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D 64625 Bensheim
Tel.: ++49 6251 70190-0
Fax: ++ 49 6251 849430
e.mail: Info@immundiagnostik.com
www.immundiagnostik.com

Inhalt / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist für die quantitative Bestimmung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D in Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in vitro* Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin D wird entweder in der Haut (unter Einfluss von UV-Licht) gebildet oder aus der Nahrung aufgenommen. In der Leber entsteht die Speicherform des Vitamin D, das 25-Hydroxy-Vitamin D. In der Niere wird in einem 2. Hydroxylierungsschritt die Hormonform des Vitamin D, das 1,25-Dihydroxy-Vitamin D (D-Hormon) gebildet. Das dafür verantwortliche Enzym, die 1 α -Hydroxylase der Niere, unterliegt einer strengen Kontrolle durch Hormone (insbesondere Parathormon) und wird in seiner Aktivität auch durch die Serumkonzentrationen von Calcium und Phosphat beeinflusst.

Die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D richtet sich also normalerweise nach den Erfordernissen des Stoffwechsels. Abweichungen der 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration von der Norm müssen also immer im Kontext mit den übrigen Parametern des Calciumstoffwechsels interpretiert werden. Erst bei ausgeprägtem Vitamin D-Mangel wird auch die Serumkonzentration von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D absinken. Zur Diagnostik des Vitamin D-Mangels sollte man deshalb den Vorläufermetabolit, das 25-Hydroxy-Vitamin D messen. Ursachen für einen unphysiologischen Mangel an 1,25-Dihydroxy-Vitamin D können jedoch Metabolisierungsstörungen entweder aufgrund genetischer Defekte der 1 α -Hydroxylase (selten) oder aufgrund von Nierenfunktionsstörungen (häufiger) auftreten. Bereits bei leicht eingeschränkter Nierenfunktion kommt es zu einem Abfall der 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration.

Da 1,25-Dihydroxy-Vitamin D wichtige Funktionen im Calciumstoffwechsel hat und insbesondere auch die Parathormonsekretion in den Nebenschilddrüsen supprimiert, kommt es mit zunehmender Niereninsuffizienz zur Ausbildung der renalen Osteopathie, die durch Mineralisierungsstörungen (Osteomalazie) und fibröse Veränderungen (Osteitis fibrosa) gekennzeichnet ist.

Die Behandlung der renalen Osteopathie besteht in der Gabe von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D (Calcitriol) oder des Prohormons 1 α -Hydroxy-Vitamin D. Erniedrigte oder relativ niedrige 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Spiegel findet man bei renalen Tubulusfunktionsstörungen (z.B. Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom). Eine unphysiologische Überproduktion von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D tritt bei granulomatösen Systemerkrankungen (z.B.

Sarkoidose) auf, wo eine extrarenale 1,25-Dihydroxy-Vitamin D Synthese stattfindet. Diese kann zur Hypercalciämie führen. Auch bei der idiopathischen Hypercalciurie findet man relativ hohe 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Spiegel. Erhöhte 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentrationen wurden des Weiteren in folgenden Fällen ermittelt: bei Störungen des Vitamin D-Rezeptors (selten), bei calciumarmer Ernährung, sowie bei Parathormonüberschuß (primärer Hyperparathyreoidismus) und bei manchen Tumorarten (infolge Sekretion von parathormonähnlichem Peptid, PTHrP).

Indikationen:

- Nierenfunktionsstörungen
Chronische Niereninsuffizienz
Hämodialyse nach Nierentransplantation
- Renale Osteopathie
- Osteomalazie bei V.a. gestörten Vitamin D-Metabolismus
- Nierentubulusfunktionsstörungen (Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom)
- Überwachung einer Therapie mit aktiven Vitamin D-Metaboliten
- Ideopathische Hypercalciurie
- Hypercalciämie

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 2112MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 2112WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K 2112E	ETHANOL	Ethanol, gebrauchsfertig	1.5 ml
K 2112TP	TRIS-HCL	Tris-HCL Puffer, gebrauchsfertig	30 ml
K 2112A1	AB	Detektionsantikörper, anti-1,25-(OH) ₂ -Vitamin D, gebrauchsfertig	25 ml
K 2112ST	STD	Standard incl. NSB, gebrauchsfertig (Bereich siehe Spezifikation oder Etikett)	7 x 2.5 ml
K 2112KO	CTRL	Kontrollen, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 x 2.5 ml
K 2112K	CONJ	Konjugat, polyklonaler peroxidase- markierter Antikörper, gebrauchsfertig	22 ml
K 2112TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K 2112AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- 48 Chromabond Säulen (Artikelnr.: Se2112)
- 48 Silica Kartuschen (Festphasen-Extraktionskartuschen, Artikelnr.: Sb2221)
- Diisopropylether (p.A.) 99.0 %
- Isopropanol (p.A.) 99.9 %
- n-Hexan (p.A.) 98.3 %
- Methanol (p.A.) 99.9 %
- 75 x 12 Reagenzgefäße aus Glas (kein Plastik)
- Extraktionsständereinheit (Artikelnr.: K2221sv)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Laborübliche Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

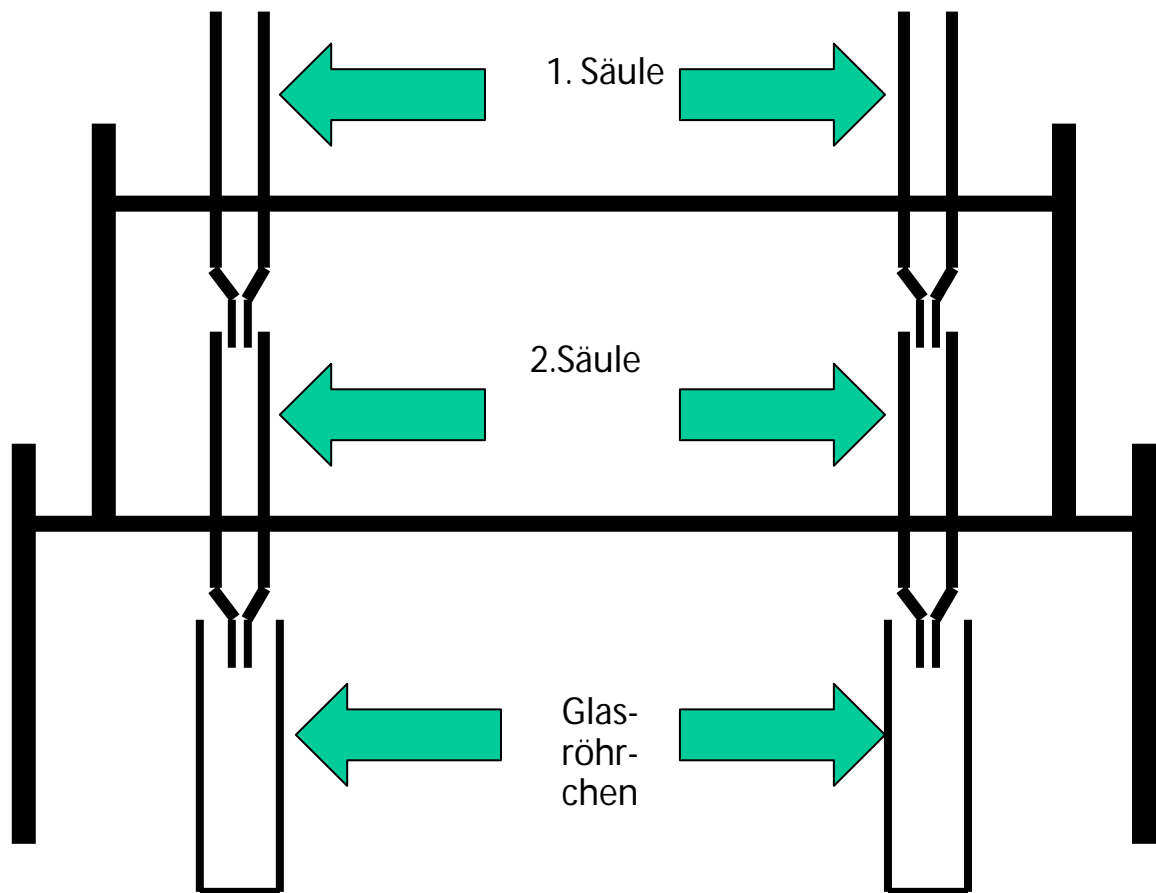
- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien, wie in der Vorschrift beschrieben, gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 2 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Plasma/Serum Proben

Frisch abgenommenes Blut sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20°C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden. Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

Wir empfehlen ein Probenvolumen von 1000 µl. Das Probenvolumen sollte jedoch nicht kleiner als 500 µl gewählt werden (Kapazität der Säulen ist 1000 µl). Wird ein Probenvolumen von 500 µl gewählt, muss die Säule mit 500 µl Tris-HCL vorgepuffert werden. Das Ergebnis wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Extraktion der Proben

- Der Extraktionsständer besteht aus 3 Plexiglas-Untereinheiten, die übereinander gestellt werden.
- In den oberen Teil werden die Chromabond-Säulen (Ständereinheit I) und in den unteren Teil (Ständereinheit II) die Silica Kartuschen (regenerierbar) eingesetzt.
- Für die Extraktion und das Waschen wird die Extraktionseinheit (I und II) in eine Auffangschale gestellt. Nach dem Extraktionsschritt (Ether) werden die Chromabond-Säulen entfernt (Ständereinheit I).
- Für den Elutionsschritt wird die Ständereinheit III mit den Reagenzgläsern (kein Plastik) unter die Ständereinheit II gestellt.

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf einer kompetitiven Enzyme-Immuno-Assay (EIA) Technik. Es wird ein ausgewählter monoklonaler Antikörper, der 1,25-Dihydroxy-Vitamin D erkennt, verwendet.

Standards, NSB (nicht spezifische Bindung), Kontrollen und Patientenseren, die auf 1,25-Dihydroxy-Vitamin D zu untersuchen sind, werden nach dem Extraktionsschritt mit dem Detektionsantikörper versetzt. In einer Vorinkubation bindet das 1,25-Dihydroxy-Vitamin D an den Antikörper. Das Vorinkubat wird in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit 1,25-Dihydroxy-Vitamin D beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt kompetitiert das 1,25-Dihydroxy-Vitamin D aus der Probe mit dem auf der Platte gekoppeltem 1,25-Dihydroxy-Vitamin D um die Bindungsstelle am Detektionsantikörper. Dann wird das Konjugat (ein Peroxidase markierter anti-Maus Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: 1,25-Dihydroxy-Vitamin D - Detektionsantikörper – Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidase-substrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt, wobei ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Gehalt umgekehrt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – Optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration - erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Extraktion

1. **1000 µl** Standards, Kontrollen, NSB bzw. Proben in Einzelwerten auf die Chromabond auftragen und 10 min. einziehen lassen. Bei Proben-
volumena < 1000 µl werden die Säulen mit Tris-HCl vorgepuffert, z.B. 500
µl Tris-HCl Puffer auf die Säule geben + 500 µl Probe
2. Mit **4 x 1 ml** Diisopropylether in je 3 min. Abstand das 1,25-Dihydroxy-
Vitamin D von den Chromabond-Säulen direkt in die Silica-Kartuschen
extrahieren. **Nach der Extraktion müssen die Chromabond Säulen
entfernt werden (Ständereinheit I)**
3. Mit **5 x 2 ml Isopropanol/Hexan (4/96 v/v)** die Silica-Säulen waschen
(Ständereinheit II)
4. Mit **3 x 2 ml Isopropanol/Hexan (6/94)** die Silica-Säulen waschen
(Ständereinheit II)
5. Die Elution des 1,25-Dihydroxy-Vitamin D erfolgt mit **2 x 2 ml
Isopropanol/Hexan (25/75 v/v)**. Hinweis: Es ist darauf zu achten, dass
**die Reagenzgläser (kein Plastik) (Ständereinheit III) exakt unter den
Säulen stehen**
6. Die eluierten Proben werden unter leichtem Stickstoffstrom bei 37 °C
oder in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet

Vorinkubation

1. **20 µl** Ethanol zu jeder eingetrockneten Probe bzw. jedem Standard, NSB
und Kontrollen pipettieren und nach der Ethanol Zugabe vorsichtig
vortexen.
2. **450 µl** Antikörperlösung zu den Proben, Standards, NSB und Kontrollen
pipettieren und gut vortexen. Die Antikörperlösung ist viskos, daher
langsam pipettieren.
3. **Genau 1 Stunde** bei Raumtemperatur inkubieren.

Pipettierschema

<p>Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen</p>
<p>Die Positionen für STD/NSB/SAMPLE/CTRL (Standard/nicht spezifische Bindung/Probe/Kontrolle) im Protokollblatt markieren</p>
<p>Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden</p>
<p>200 µl STD/NSB/SAMPLE/CTRL in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren. Das Vorinkubat ist eine viskose Flüssigkeit. Wir empfehlen daher die Pipettenspitze vorzuspülen und langsam zu pipettieren</p>
<p>Streifen abdecken und 18-22 Stunden bei 6 - 10 °C inkubieren*</p>
<p>Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen</p>
<p>200 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren</p>
<p>Streifen abdecken und genau 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren</p>

Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen

200 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren

20 - 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren**

50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen

Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden

*Bei kompetitiven Assays ist darauf zu achten, dass die Inkubation immer unter konstanten Bedingungen (Temperatur, Dauer) erfolgt. Das trifft im Speziellen bei der über Nacht Inkubation zu. Wir empfehlen immer die gleiche Zeitspanne (z. B. 20 h) für die Inkubation.

**Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

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

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0.01).

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

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben mit einer 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-Konzentration größer als der höchste Standard sollten mit weniger Probenmaterial (z.B. 750 µl oder 500 µl) auf die vorgepufferte Säule aufgetragen und nochmals im Assay gemessen werden. Die Proben werden mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von kommerziell erhältlichen Kontrollen (wenn vorhanden) für die interne Qualitätskontrolle.

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

Erwartete Ergebnisse

Normbereich (Plasma oder Serum):

Gesunde Erwachsene 20-50 Jahre:	17 - 53 pg/ml
Kinder bis 12 Jahre:	bis zu 40% höhere Werte
Schwangere (8.-42. Gestationswoche):	bis zu 60% höhere Werte
Personen über 70 Jahre:	bis zu 40% niedrigere Werte

Es treten keine jahreszeitlichen Schwankungen auf.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay (n=20)		
Probe	1,25 (OH) ₂ Vitamin D [pg/ml]	VK [%]
1	55.3	6.69

Inter-Assay (n=20)		
Probe	1,25 (OH) ₂ Vitamin D [pg/ml]	VK [%]
1	39	9

Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20 mal der Standard null.

Probe	1,25 (OH) ₂ Vitamin D Mittelwert [OD]	Standardab- weichung (SD)	Nachweis- grenze [pg/ml]
1	1.201	0.025	4.8

Kreuzreaktivität

1,25-(OH) ₂ Vit D ₃	100 %
1,25-(OH) ₂ Vit D ₂	41 %
Vit D ₂ & D ₃	< 0.01 %
24,25-(OH) ₂ Vit D ₃	< 0.1 %
25-OH Vit D ₂	< 0.1 %
25-OH Vit D ₃	< 0.01 %
Alfacalcidol	< 0.003 %

Linearität

Unterschiedliche Verdünnungen von zwei Patientenproben wurden im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt.

n= 2

Probe	Verdünnung	Erwartet [pg/ml]	Gemessen [pg/ml]
A	1000	21.2	21.2
	750	15.9	15.9
	500	10.6	11.2
	250	5.3	8.5
B	1000	29.6	29.6
	750	22.2	27.3
	500	14.8	16.9
	250	7.4	7.2

12. REGENERIERUNG DER SILICA-KARTUSCHEN

Die Silica-Kartuschen (untere Säulen) werden nach folgendem Schema regeneriert. Die Säulen können direkt nach der Extraktion regeneriert werden und müssen vor dem nächsten Gebrauch trocken sein. Bis zu 5 Regenerierungszyklen sind möglich.

- 2 x 2 ml Methanol auftragen.
- 2 x 2 ml n-Hexan auftragen.
- Säulen danach unter dem Abzug **trocknen** lassen.

13. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder Thimerosal. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H₂SO₄). H₂SO₄ ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht verwendet werden. H₂SO₄ verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien soll vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

16. LITERATUR

1. Wildermuth S. et al., 1993; Clinica chimica Acta, 220, 61
2. Schilling M. et al., 1987; Clinical Chemistry, 33, 187
3. Armbruster F.P. et al., 1990; Ärztl. Lab., 36, 75
4. Durham B.W. et al., 1995; Ann. Clin. Biochem., 32, 77
5. Hollis B.W., 1996; Calcif. Tissue Int., 58, 4
6. Hollis B.W., 1995; Clinical Chemistry, 41, 1313
7. Iqbal S.J. et al., 1996; Clinical Chemistry, 42, 112
8. Withold W. et al., 1995; Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 33, 15

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

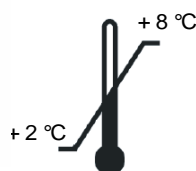
1,25 (OH)₂ Vitamin D ELISA Kit

For the in vitro determination of 1,25-(OH)₂ vitamin D in plasma and serum

Valid from 05.11.2008



K 2112



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) is intended for the quantitative determination of 1,25-dihydroxy vitamin D in serum and plasma. It is for *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Vitamin D is either produced in the skin (under the influence of UV light) or taken up from nourishment. The storage type of vitamin D, namely 25-hydroxy vitamin D, is formed in the liver. The hormone 1,25-dihydroxy vitamin D (D hormone) is formed in a second hydroxylation step in the kidney. The responsible enzyme, the kidney 1 α -hydroxylase, is subjected to a rigid control through hormones (especially parathyroid hormone) and its activity is influenced by the serum concentrations of calcium and phosphate.

The serum concentration of 1,25-dihydroxy vitamin D normally re-adjusts itself to the demands of metabolism. Deviations from the normal range of 1,25-dihydroxy vitamin D must therefore always be interpreted in the context of the remaining parameters of the calcium metabolism. The serum concentration of 1,25-dihydroxy vitamin D decreases only in seldom cases of vitamin D deficiency. For the diagnosis of vitamin D deficiency the precursor metabolite, 25-hydroxyvitamin D, should be measured.

The reason for a non-physiological deficiency of 1,25-dihydroxy vitamin D can be found in metabolic disturbances, caused either by genetic defects of the enzyme 1 α -hydroxylase (rare) or kidney malfunctions (more common). Even a slightly impaired kidney function can lead to a decrease of the 1,25-dihydroxy vitamin D concentration.

Since 1,25-dihydroxy vitamin D has important functions in calcium metabolism as well as supplementing secretion of parathyroid hormone from the parathyroid glands, increasing kidney malfunctioning leads to development of renal osteopathy, which is characterized by osteomalacia and osteitis fibrosa.

Treatment of renal osteopathy consists of the administration of 1,25-dihydroxy vitamin D (calcitriol) or the prohormone 1 α -hydroxy vitamin D. In renal tubules malfunctions decreased or relatively low levels of 1,25-dihydroxy vitamin D (e.g. diabetes insipidus, Fanconi-syndrom) are found. A non-physiological over-production of 1,25-dihydroxy vitamin D arises in granulomatosis (e.g. sarcoidosis), where extra-renal synthesis of 1,25-dihydroxy vitamin D occurs. This can lead to hypercalcaemia. Also in idiopathic hypercalciuria a relatively high level of 1,25-dihydroxy vitamin D is found. Increased concentrations of 1,25-dihydroxy vitamin D can be seen in case of non-functional vitamin D receptors (rare), during calcium deficient

nutrition, as well as a result from overproduction of parathyroid hormone (primary hyperthyroidism).

Indications

- Defect of kidney functions
Chronic kidney failure
Haemodialysis following kidney transplantation
- Renal osteopathy
- Osteomalacia from various types of vitamin D metabolism disturbances
- Kidney tubules function disturbances (diabetes insipidus, Fanconi-Syndrom)
- Monitoring of therapy with active vitamin D metabolites
- Ideopathic hypercalciuria
- Hypercalcaemia

3 MATERIAL SUPPLIED

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 2112MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 2112WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K 2112E	ETHANOL	Ethanol, ready-to-use	1.5 ml
K 2112TP	TRIS-HCL	Tris-HCL buffer, ready-to-use	30 ml
K 2112A1	AB	Detection antibody, anti 1,25-(OH) ₂ vitamin D, ready-to-use	25 ml
K 2112ST	STD	Standard incl. NSB, ready-to-use (for range see specification or label)	7 x 2.5 ml
K 2112KO	CTRL	Controls, ready-to-use (for range see specification)	2 x 2.5 ml
K 2112K	CONJ	Conjugate, polyclonal peroxidase- labeled antibody, ready-to-use	22 ml
K 2112TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 2112AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	15 ml

4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- 48 Chromabond columns (Catalog No.: Se2112)
- 48 Silica Cartridges (solid phase extraction cartridges, Catalog No.: Sb2221)
- Diisopropylether (p.A.) 99.0 %
- Isopropanol (p.A.) 99.9 %
- n-Hexan (p.A.) 98.3 %
- Methanol (p.A.) 99.9 %
- 75 x 12 glass tubes (no plastic)
- Extraction rack (Catalog No.: K2221sv)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.** The kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml concentrate + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at room temperature or at 37°C using a water bath before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** could be stored in a closed flask at **2-8°C** for no longer than one month.
- All other test reagents are ready to use. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

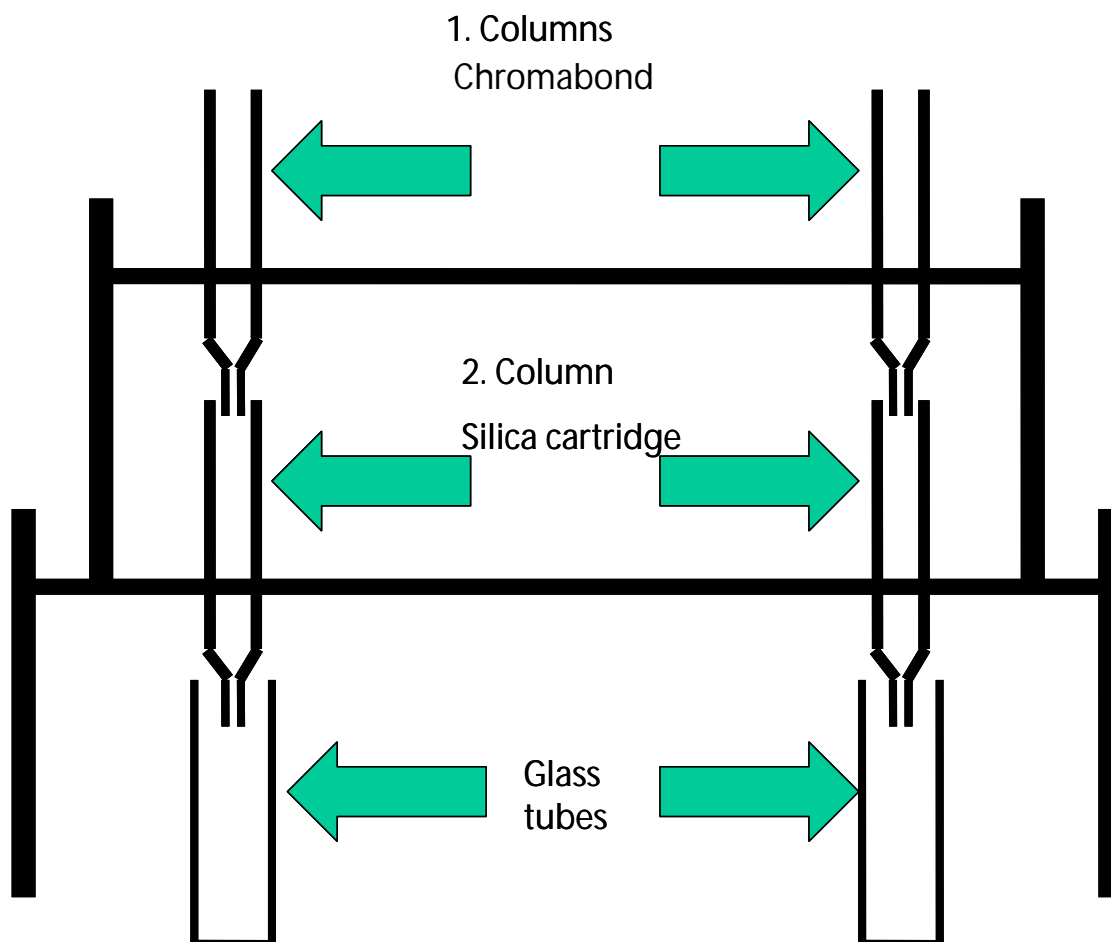
6. SAMPLE PREPARATION

Serum/plasma samples

Fresh collected blood should be centrifuged within one hour. Store samples at -20 °C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.

We recommend to apply 1000 µl sample per the cartridge. If the sample volume is less than 1000 µl, load an appropriate amount of Tris-HCl buffer in the column, and then the sample (minimum 500 µl) for a total volume of 1000 µl.

To calculate the actual concentration, each result should be multiplied with the respective dilution factor.

Extraction of the samples

- The extraction unit consists of three parts, which were put on top of each other.
- The upper part is used for the Chromabond columns (extraction rack I) , the lower part for the silica cartridges (extraction rack II).
- During sample application and the entire washing procedure, the whole unit should be put into a container big enough to collect the extraction solvents (extraction rack I and extraction rack II). After the first extraction step (ether) remove the extraction rack I with the Chromabond columns.
- It is recommended to place the glass-tubes (extraction rack III) directly under the cartridges (extraction rack II) for the last elution step. The tubes can then be used directly for the next step of the assay.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes of a competitive Enzyme-Immuno-Assay (EIA) technique with a selected monoclonal antibody recognizing 1,25-dihydroxy vitamin D.

Standards, NSB (non-specific binding), controls and patient samples which are assayed for 1,25-dihydroxy vitamin D are incubated after the extraction step with the detection antibody. The pre-incubated solution is then transferred to the microplate coated with 1,25-dihydroxy vitamin D. During this incubation step, 1,25-dihydroxy vitamin D in the sample and a fixed amount of 1,25-dihydroxy vitamin D bound to the microtiter well compete for the binding of the detection antibodies. Then a peroxidase-conjugated anti-mouse antibody is added into each microplate well and a complex of 1,25-dihydroxy vitamin D - detection antibody – peroxidase conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as a peroxidase substrate. Finally, an acidic stop solution is added to terminate the reaction, whereby the color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is inversely proportional to the concentration of 1,25-dihydroxy vitamin D. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated using the values obtained from the standard. 1,25-dihydroxy vitamin D in the samples is determined from this curve.

Extraction

1. Apply **1000 µl** of standards, NSB, control and sample (plasma or serum) on the Chromabond columns and incubate for 10 minutes. For sample volumes less than 1000 µl wet the cartridges with Tris-HCl buffer, e.g. pipette 500 µl Tris-HCl buffer in the cartridge and 500µl sample
2. Extract vitamin D from the chromabond columns with **4 x 1 ml** diisopropylether (3 min for each elution). The eluate should drip from the chromabond column directly on an untreated and dry silica cartridge. **After the extraction the chromabond columns should be removed (extraction rack I)**
3. Wash the silica cartridges (extraction rack II) with **5 x 2 ml Isopropanol/Hexane (4/96 v/v)**
4. Wash the silica cartridges (extraction rack II) with **3 x 2 ml Isopropanol/Hexane (6/94 v/v)**
5. Elute 1,25-dihydroxy vitamin D from the silica cartridges with **2 x 2 ml Isopropanol/Hexane (25/75 v/v)**. Note: the glass tubes (extraction rack III) should be placed directly under the silica cartridges
6. Evaporate the eluate under a nitrogen stream at 37 °C or in a vacuum centrifuge

Pre-incubation

1. Add **20 µl** of ethanol into each glass tube. Immediately after adding ethanol gently vortex each tube to avoid any possible evaporation.
2. Add **450 µl** antibody solution into each glass tube. The antibody solution is viscous. Please pipette slowly and carefully. Mix thoroughly.
3. Cover glass tubes with a plastic film and incubate exactly for **1 hour** at room temperature.

Test procedure

<p>Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well</p>
<p>Mark the positions of STD/NSB/SAMPLE/CTRL (Standards/non-specific binding/Sample/Control) on a protocol sheet</p>
<p>Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2-8° C. Strips are stable until the expiry date stated on the label</p>
<p>Add 200 µl of STD/NSB/SAMPLE/CTRL in duplicate into respective well. All these solutions are viscous. Please pipette slowly and carefully. We recommend to wet the pipette tip before using it to transfer the pre-incubate.</p>
<p>Cover the plate tightly and incubate for 18-22 hours at 6 - 10 °C*</p>
<p>Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper</p>
<p>Add 200 µl CONJ (conjugate) into each well</p>
<p>Cover the plate tightly and incubate for exactly 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer</p>

Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted WASHBUF (Wash buffer) into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper

Add 200 µl of SUB (substrate) into each well

Incubate for 20 - 30 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark**

Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly

Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference

*As with any competitive immunoassay, consistent incubation times and temperature are essential for accurate plate-to-plate comparisons. Fluctuations in overnight incubation can lead to increased inter-assay CV's. It is therefore recommended to use always the same incubation time, i.e. 20 hours.

**The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend to observe the color change and to stop the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use the "4-Parameter-algorithm".

1. 4-Parameter-algorithm

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

2. Point-to-point-calculation

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

3. Spline-algorithm

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

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

9. LIMITATIONS

Samples with 1,25-dihydroxy vitamin D levels greater than the highest standard value should be re-assayed. Apply instead of 1 ml sample a volume of 500 µl or 750 µl on the pre-buffered Chromabond column. Recalculate the results with the dilution factor.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of commercial control samples for internal quality control if available.

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

Expected values

Normal range (plasma or serum):

Healthy adults (age 20-50) :	17 - 53 pg/ml
Children up to 12:	ca. 40% higher values
Pregnant women (8-42 week):	ca. 60% higher values
Persons older than 70:	ca. 40% lower values

The normal range is independent of the season.

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n=20)		
Probe	1,25 (OH) ₂ Vitamin D [pg/ml]	CV [%]
1	55.3	6.69

Inter-Assay (n=20)		
Probe	1,25 (OH) ₂ Vitamin D [pg/ml]	CV [%]
1	39	9

Sensitivity

The sensitivity was set as $B_0 + 2SD$. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	1,25 (OH) ₂ Vitamin D mean value [OD]	Standard variation (SD)	Detection limit [pg/ml]
1	1.201	0.025	4.8

Cross reactivity

1,25-(OH) ₂ Vit D ₃	100 %
1,25-(OH) ₂ Vit D ₂	41 %
Vit D ₂ & D ₃	< 0.01 %
24,25-(OH) ₂ Vit D ₃	< 0.1 %
25-OH Vit D ₂	< 0.1 %
25-OH Vit D ₃	< 0.01 %
Alfacalcidol	< 0.003 %

Linearity

Different volumes of two patient samples were analyzed. The results are shown below:

n= 2

Sample	Dilution	Expected [pg/ml]	Measured [pg/ml]
A	1000	21.2	21.2
	750	15.9	15.9
	500	10.6	11.2
	250	5.3	8.5
B	1000	29.6	29.6
	750	22.2	27.3
	500	14.8	16.9
	250	7.4	7.2

12. REGENERATION OF THE SILICA CARTRIDGES

The silica cartridges can be used a total of 5 times if regenerated as follows. The regeneration can be performed directly after the extraction. The silica cartridges have to be dry before the next use.

- 2 x 2 ml methanol
- 2 x 2 ml n-hexan
- Dry the columns in the hood

13. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

14. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from wrong use.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product shall be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

16. REFERENCES

1. Wildermuth S. et al., 1993; Clinica chimica Acta, 220, 61
2. Schilling M. et al., 1987; Clinical Chemistry, 33, 187
3. Armbruster F.P. et al., 1990; Ärztl. Lab., 36, 75
4. Durham B.W. et al., 1995; Ann. Clin. Biochem., 32, 77
5. Hollis B.W., 1996; Calcif. Tissue Int., 58, 4
6. Hollis B.W., 1995; Clinical Chemistry, 41, 1313
7. Iqbal S.J. et al., 1996; Clinical Chemistry, 42, 112
8. Withold W. et al., 1995; Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 33, 15

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number