

1,25-(OH)₂-Vitamin D ImmuTube[®] ELISA Kit

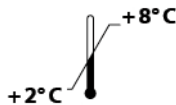
*Zur in vitro Bestimmung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D
in Plasma und Serum*

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

Gültig ab / Valid from 21.07.2011



K 2113



Immundiagnostik AG · Stubenwald-Allee 8a · D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00
info@immundiagnostik.com

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30
www.immundiagnostik.com

Inhalt

Content	14
1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	4
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	5
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	5
6. PROBENVORBEREITUNG	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	6
<i>Testprinzip</i>	6
<i>Extraktion des 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃</i>	7
<i>Vorinkubation</i>	8
<i>Pipettierschema</i>	8
8. ERGEBNISSE	9
9. QUALITÄTSKONTROLLE	10
<i>Erwartete Ergebnisse</i>	10
10. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
11. TECHNISCHE MERKMALE	11
12. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	11
13. LITERATUR	12

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. Vor dem ELISA wird 1,25-(OH)₂-Vitamin D aus den Proben über spezielle Säulchen, „ImmuTube®“, isoliert und aufkonzentriert. 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 calcium-armer Ernährung, sowie bei Parathormonüberschuß (primärer Hyperparathyreoidismus) und bei manchen Tumorarten (infolge Sekretion von parathormonähnlichem Peptid, PTHrP).

Ähnlich wie 25-(OH)-Vitamin D, zirkuliert 1,25-(OH)₂-Vitamin D größtenteils in gebundener Form und wird von Vitamin D-Bindungsprotein bzw. Albumin transportiert. Es ist kaum löslich in Wasser.

Literaturangaben über die Bindung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D und 25-(OH)-Vitamin D an Vitamin-D-Bindungsprotein (VDBP) bzw. Albumin sind im folgenden gezeigt:

	1,25-(OH)₂-Vitamin D	25-(OH)-Vitamin D
VDBP	60 %	85 %
Albumin	38 %	14.6 %
frei	2 %	0.4 %

Die Serumkonzentrationen von 25-(OH)-Vitamin D und 1,25-(OH)₂-Vitamin D sind sehr unterschiedlich. In der Literatur gelten Referenzbereiche von 30-100 ng/ml für 25-(OH)-Vitamin D bzw. 17-65 pg/ml für 1,25-(OH)₂-Vitamin D.

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
- Idiopathische Hyperkalziurie
- Hyperkalziämie

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Abkürzung	Kit Komponenten	Menge
K2113MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12x8 Wells
K2113WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	100 ml
K2113E	ETHANOL	Ethanol, gebrauchsfertig	1.5 ml
K2113A1	AB	Detektionsantikörper, anti-1,25-(OH) ₂ Vitamin D, Stocklösung	100 µl
K2113ST	STD	Standard, gebrauchsfertig	6 x 1.5 ml
K2113KO	CTRL	Kontrollen, gebrauchsfertig	2 x 1.5 ml
K2113K	CONJ	Konjugat, polyklonaler peroxidase-markierter Antikörper, gebrauchsfertig	25 ml
K2113TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K2113AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	15 ml
K2113CWB	COLBUF	Waschpuffer für ImmuTubes®	2 x 65 ml
K2113ER	ELUREAG	Elutionsreagenz für ImmuTubes®, gebrauchsfertig	30 ml
K2113ABBUF	ABBUF	Antikörperverdünnungspuffer, gebrauchsfertig	2 x 15 ml
K2113FOL	FOL	Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	2 x 1

ZUSÄTZLICH BENÖTIGT UND NUR MIT K2113 KOMBINIERBAR

K2113.SI	COLUMNS	ImmuTube®-Säulen zur Trennung des 1,25-(OH) ₂ Vitamin-D aus der Probe	96 Stück
----------	---------	--	----------

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest. , **steril und pyrogenfrei**)
- 75 x 12 mm Reagenzgefäße aus Glas (kein Plastik)
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge
- Vortex-Mixer
- Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Laborübliche Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Überkopfschüttler bzw. Flaschenroller
- 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 dient zur Analyse von 88 Proben, 6 Standards und 2 Kontrollen in Einzelwerten. Wir empfehlen aber immer Doppelbestimmungen zu machen.
- 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 2 Wochen** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Der **AB** (Detektionsantikörper) wird **1:1000** in **ABBUF** (Antikörperverdünnungspuffer) verdünnt. Um den Kit in 2 Ansätzen verwenden zu können, befinden sich 2 **ABBUF**-Fläschchen in der Packung. Entnehmen Sie der **AB**-Flasche **15 µl** und geben Sie diese in eine **15 ml ABBUF**-Flasche, die Sie beschriften. Der so **verdünnte Antikörper** ist, bei 2-8°C gelagert, **4 Wochen** haltbar. Der **AB** (Detektionsantikörper) ist bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum stabil.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2-8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG

Plasma-/Serumproben

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.

Es wird ein Probenvolumen von **300 µl** benötigt. Ein Volumen < 300 µl führt zu falschen Ergebnissen!

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.

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.

Um eine zuverlässige Bestimmung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D zu gewährleisten, wird 1,25-(OH)₂-Vitamin D von dem in 1000-fachem Überschuss vorhandenen 25-(OH)-Vitamin D getrennt und anschließend konzentriert. Dazu wird eine Säulenchromatographie mit immobilisierten monoklonalen anti-1,25-(OH)₂-Vitamin D Mausantikörpern angewendet.

Standards, 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 Peroxidasesubstrat 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 des 1,25-(OH)₂-Vitamin D3

1. Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.
2. ImmuTubes® in einen geeigneten Ständer stellen und sicherstellen, dass die enthaltene Suspension nicht im Deckel verbleibt.
3. Deckel der ImmuTubes® beschriften, öffnen, 300 µl STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) zügig pipettieren, ImmuTubes® verschließen und den Inhalt vorsichtig mischen
4. Intensives “Mixing-Rotation” (end-over-end Rotation) für 90 Min bei Raumtemperatur (18-26°C). Das restliche Trennmaterial auf der Innenseite des Deckels nach unten fließen lassen.
5. ImmuTubes® in Plastikreagenzgefäße (min. Volumen 5 ml) setzen, 1 Min bei 1000g zentrifugieren .
6. ImmuTubes® durch Abbrechen des Auslasses und Abschrauben des Deckels öffnen und 2 Min bei 1000g bis zum Eintrocknen zentrifugieren.
7. 600 µl COLBUF (Waschpuffer für ImmuTubes®) pipettieren und 10 Min einwirken lassen, 2 Min bei 1000g zentrifugieren. 7a. 600 µl COLBUF (Waschpuffer für ImmuTubes®) pipettieren und direkt 2 Min bei 1000g zentrifugieren.
8. 600 µl bidestilliertes Wasser (aqua bidest., steril) pipettieren und 2 Min bei 1000g bis zum Eintrocknen zentrifugieren.
9. Schritt 8 1x wiederholen: 600 µl bidestilliertes Wasser (aqua bidest., steril) pipettieren und 2 Min bei 1000g bis zum Eintrocknen zentrifugieren. Durchlauf entsprechend entsorgen.
10. Frische Glasröhrchen beschriften, ImmuTubes® in die Glasröhrchen setzen.
11. 250 µl ELUREAG (Elutionsreagenz für ImmuTubes®) pipettieren, 1 Min einwirken lassen, 1 Min bei 1000g zentrifugieren und das Eluat mit dem 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D in dem Glasröhrchen auffangen.
11. Das 250 µl Eluat unter Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge trocknen.

Vorinkubation

AB (Detektionsantikörper) bitte immer ca. 2 Stunden vor Gebrauch verdünnen (siehe P. 5., Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien).

1. 10 µl ETHANOL (Ethanol) zu jeder eingetrockneten Probe bzw. jedem Standard und Kontrollen pipettieren und nach der Ethanol Zugabe vorsichtig vortexen.
2. 225 µl verdünnten Detektionsantikörper zu den Proben, Standards und Kontrollen pipettieren und gut vortexen.
3. Glasröhrchen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) inkubieren.

Pipettierschema

1. Die Positionen für STD/ SAMPLE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) im Protokollblatt markieren.
2. Benötigte Mikrotiterstreifen aus dem Mikrotitermodul nehmen. Nicht-verwendete Mikrotiterstreifen müssen mit Abdeckfolie abgeklebt , bei 2-8 °C gelagert und innerhalb von 12 Wochen verwendet werden.
3. 200 µl STD/SAMPLE/CTRL in die Mikrotiterstreifen pipettieren. Das Vorinkubat ist eine viskose Flüssigkeit. Wir empfehlen daher die Pipettenspitze vorzuspülen und langsam zu pipettieren.
4. Streifen mit beiliegender FOL (Folie) abdecken und 16-22 Stunden bei 4 - 8 °C inkubieren* .
5. 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.
6. 200 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
7. Streifen mit beiliegender FOL (Folie) abdecken und genau 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren.

8. Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Resten von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
9. 200 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
10. 10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren**.
11. 50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
12. 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 Übernachtinkubation zu. Wir empfehlen immer die gleiche Zeitspanne (z. B. 18 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-Funktion

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. 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

Referenzbereich (Plasma oder Serum):

Säuglinge und Kinder bis 12 Jahre:	30 - 180 pg/ml
Teenager und junge Erwachsene 13-21 Jahre:	30 - 100 pg/ml
Gesunde Erwachsene 21-60 Jahre:	17 - 65 pg/ml
Personen über 61 Jahre:	10 - 50 pg/ml
Schwangere (8.-42. Gestationswoche):	bis zu 60% höhere Werte als Erwachsene

Es treten keine jahreszeitlichen Schwankungen auf.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

10. 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.

11. 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.

12. 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 Pipettivolumina 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.

13. LITERATUR

1. Durham B.W. et al. (1995) Ann. Clin. Biochem., 32, 77
2. Hollis B.W. (1996) Calcif. Tissue Int., 58, 4
3. Hollis B.W. (1995) Clinical Chemistry, 41, 1313
4. Iqbal S.J. et al. (1996) Clinical Chemistry, 42, 112
5. Schmidt-Gayk H, Armbruster FP, Bouillon R (Eds.) (1990) Calcium Regulating Hormones, Vitamin D Metabolites, and Cyclic AMP. Assays and Their Clinical Application. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona
6. Armbruster FP et al. (2000) Clin Lab 46(3-4):165-66
7. Erben RG et al. (2002) Mol Endocrinol 16(7):1524-37
8. Peterlik M. and Cross H. S. (2005) Review: Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. European Journal of Clinical Investigation, 35, 290–304

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen



Hersteller

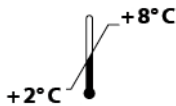
1,25-(OH)₂-Vitamin D ImmuTube® ELISA Kit

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

Valid from 21.07.2011



K 2113



Immundiagnostik AG

Content

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. MATERIAL SUPPLIED	17
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	18
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	18
6. SAMPLE PREPARATION	19
7. ASSAY PROCEDURE	19
<i>Principle of the test</i>	19
<i>Extraction of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃</i>	20
<i>Pre-incubation</i>	21
<i>Test procedure</i>	21
8. RESULTS	22
9. QUALITY CONTROL	23
<i>Expected values</i>	23
10. PRECAUTIONS	23
11. TECHNICAL HINTS	24
12. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	24
13. REFERENCES	24

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. Before the ELISA test, column chromatography by "ImmuTube®" is used for separation and concentration of 1,25-(OH)₂-Vitamin D in the samples. The test kit 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).

Most of the 1,25-(OH)₂-Vitamin D does not circulate in the free form. Like 25-(OH)-Vitamin D, 1,25-(OH)₂-Vitamin D is bound and transported by the Vitamin D Binding Protein and by Albumin. It is nearly insoluble in water.

The following binding percentages of 1,25-(OH)₂-Vitamin D and of 25-(OH)-Vitamin D by Vitamin D Binding Protein (VDBP) and by Albumin are mentioned in literature:

	1,25-(OH)₂-Vitamin D	25-(OH)-Vitamin D
VDBP	60 %	85 %
Albumin	38 %	14.6 %
free	2 %	0.4 %

The serum concentrations of 25-(OH)-Vitamin D and of 1,25-(OH)₂-Vitamin D are quite different. In the literature a reference value range between 30-100 ng/ml for 25-(OH)-Vitamin D and 17-65 pg/ml for 1,25-(OH)₂-Vitamin D are considered.

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
K2113MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12x8 Wells
K2113WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	100 ml
K2113E	ETHANOL	Ethanol, ready-to-use	1.5 ml
K2113A1	AB	Detection antibody, anti 1,25-(OH) ₂ vitamin D, stock solution	100 µl
K2113ST	STD	Standard, ready-to-use (for range see specification)	6 x 1.5 ml
K2113KO	CTRL	Controls, ready-to-use (for range see specification)	2 x 1.5 ml
K2113K	CONJ	Conjugate, polyclonal peroxidase-labeled antibody, ready-to-use	25 ml
K2113TMB	SUB	TMB substrate (Tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K2113AC	STOP	ELISA stop solution, ready-to-use	15 ml
K2113CWB	COLBUF	Wash buffer for ImmuTube® columns	2 x 65 ml
K2113ER	ELUREAG	Elution reagent for ImmuTube® columns	30 ml
K2113ABBUF	ABBUF	Antibody dilution buffer, ready-to-use	2 x 15 ml
K2113FOL	FOL	Foil to cover the microtiter plate	2 x 1

ADDITIONALLY REQUIRED AND ONLY IN COMBINATION WITH K2113

K2113.SI	COLUMNS	ImmuTube® columns for separation of 1,25-(OH) ₂ vitamin D in the samples	96 columns
----------	---------	---	------------

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest., **sterile and pyrogen-free**)
- 75 x 12 mm glass tubes (no plastic)
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge
- 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)
- "Mixing-rotator" (end-over-end rotation) or bottle roller

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each assay.** The kit can be used for analysis of 88 samples, 6 standards and 2 controls, when single values are obtained. However, we recommend to run the test in duplicate.
- The ELISA **WASHBUF** (wash buffer concentrate) 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 must be redissolved at room temperature or at 37°C 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** can be stored in a closed flask at **2-8°C for two weeks**.
- 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**.
- Dilute the **AB** (detection antibody) **1:1000** in **ABBUF** (antibody dilution buffer). In order to use the kit in two separate runs, 2 **ABBUF**-vials are provided with the kit package. Transfer **15 µl** from the **AB**-vial into one **15 ml ABBUF**-vial and label it correspondingly. The so **diluted antibody** is stable for **4 weeks** when stored at 2-8°C. The **AB** (detection antibody) is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label.

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.

Sample volume of **300 µl** is needed. Sample volume < 300 µl leads to wrong results.

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well.

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.

For a reliable determination of 1,25-(OH)₂-Vitamin D, it is necessary to separate the 1,25-(OH)₂-Vitamin D from the 1000 fold excess of 25-(OH)-Vitamin D and to concentrate it. This is performed by the use of a column with immobilized monoclonal anti 1,25 (OH)₂-Vitamin D mouse antibodies.

Standards, 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 of 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃

1. Prior to use in the assay allow all samples and reagents to come to room temperature (18-26 °C). Before use, mix well samples and reagents.
2. Place Imm Tubes® in a suitable rack and make sure that no suspension remained on the Imm Tubes® cover
3. Label the covers of Imm Tubes®, open Imm Tubes®, add quickly 300 µl of STD/ SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control), close and mix gently .
4. "Mix-rotate" (end-over-end rotation) intensively for 90 min at room temperature (18-26 °C). Let the remaining separation material on the inner side of the cover flow down
5. Insert Imm Tubes® in plastic reagent vials (min. volume of 5 ml), centrifuge for 1 min at 1000g .
6. Open the Imm Tubes® by breaking the outlets and unscrewing the covers. Centrifuge for 2 min at 1000g to dryness .
7. Add 600 µl of COLBUF (Imm Tube® Washing Buffer) and allow to interact for 10 min . Centrifuge for 2 min at 1000g to dryness.
7a. Add 600 µl of COLBUF (Imm Tube® Washing Buffer) and immediately centrifuge for 2 min at 1000g .
8. Add 600 µl of sterile aqua bidest. and centrifuge for 2 min at 1000g to dryness.
9. Repeat step 8: add 600 µl of sterile aqua bidest. and centrifuge for 2 min at 1000g to dryness. Discard the through-flow.
10. Label fresh glass tubes, transfer Imm Tubes® in the labeled glass tubes.
11. Add 250 µl of ELUREAG (Elution Reagent), wait 1 min , centrifuge for 1 min at 1000g and collect the eluate with the 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D in the glass tubes.
12. Evaporate the 250 µl eluate under a nitrogen stream at 37 °C or in a vacuum centrifuge.

Pre-incubation

Note, always dilute the **AB** (detection antibody) approximately 2 hours before use in the assay (see P. 5., Preparation and storage of reagents).

1. Add 10 µl of ETHANOL (ethanol) into each glass tube. Immediately after adding ethanol gently vortex each tube to avoid any possible evaporation.
2. Add 225 µl diluted detection antibody into each glass tube. The antibody solution is viscous. Mix thoroughly.
3. Cover glass tubes and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C).

Test procedure

1. Mark the positions of STD/SAMPLE/CTRL (Standards/Sample/Control) on a protocol sheet.
2. Take microtiter strips out of the microtiter module. Unused strips must be covered with the enclosed foil, stored at 2-8° C and used within 12 weeks.
3. Add 200 µl of STD/SAMPLE/CTRL 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.
4. Cover the plate with the enclosed foil tightly and incubate for 16-22 hours at 4-8°C* .
5. 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.
6. Add 200 µl CONJ (conjugate) into each well.
7. Cover the plate tightly with the enclosed foil and incubate for exactly 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer.

- | |
|--|
| 8. 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. |
| 9. Add 200 µl of SUB (substrate) into each well. |
| 10. Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark**. |
| 11. Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly. |
| 12. 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. 18 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-algorithm

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. 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

Reference range (plasma or serum):

Suckling babes and children up to 12:	30 - 180 pg/ml
Teenager and young adults (age 13-21):	30 - 100 pg/ml
Healthy adults (age 21-60) :	17 - 65 pg/ml
Persons older than 61:	10 - 50 pg/ml
Pregnant women (8-42 week):	ca. 60% higher values than adults

The normal range is independent of the season.

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

10. 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.

11. 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.

12. 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.

13. REFERENCES

1. Durham B.W. et al. (1995) Ann. Clin. Biochem., 32, 77
2. Hollis B.W. (1996) Calcif. Tissue Int., 58, 4
3. Hollis B.W. (1995) Clinical Chemistry, 41, 1313
4. Iqbal S.J. et al. (1996) Clinical Chemistry, 42, 112
5. Schmidt-Gayk H, Armbruster FP, Bouillon R (Eds.) (1990) Calcium Regulating Hormones, Vitamin D Metabolites, and Cyclic AMP. Assays and Their Clinical Application. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona
6. Armbruster FP et al. (2000) Clin Lab 46(3-4):165-66
7. Erben RG et al. (2002) Mol Endocrinol 16(7):1524-37
8. Peterlik M. and Cross H. S. (2005) Review: Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. European Journal of Clinical Investigation, 35, 290-304

Used Symbols:



Store at



Catalog Number



In Vitro Diagnostic Device



No. of tests



Manufacturer



Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
D-64625 Bensheim

Tel.: +49 (0) 62 51/70 19 00

Fax: +49 (0) 62 51/84 94 30

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com