

Arbeitsanleitung

25-OH Vitamin D

Vitamin D CPBA

**Zur in-vitro-Bestimmung von 25-OH Vitamin D in Plasma, Serum
und Urin**

Gültig ab 20.04.2010

Artikelnummer: K 2111

Packungsgröße: 50 Tests

Lagerung: -20 °C



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

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von 25-OH Vitamin D aus humanem Serum und Plasma. Nur zur in vitro Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Vitamin D₃ wird in der Haut unter Einfluss von ultraviolettem Licht (UV-B) gebildet. Vitamin D₂ stammt aus der Nahrung oder künstlichen Supplementen und wird über den Dünndarm aufgenommen. Vitamin D₂ und D₃ werden vom Organismus in gleicher Weise verstoffwechselt und haben gleiche biologische Aktivität.

Vitamin D wird in der Blutbahn an ein Bindungsprotein (DBP) gebunden und in der Leber zu 25-OH-Vitamin D metabolisiert. Diese 25-Hydroxylierung ist im Wesentlichen vom Substratangebot abhängig. 25-OH-Vitamin D hat noch eine geringe biologische Aktivität, liegt aber mit der höchsten Konzentration von allen D-Metaboliten in der Zirkulation vor. Aufgrund seiner hohen Affinität zum Bindungsprotein DBP stellt es die Speicherform des Vitamin D dar. Die Serumkonzentration von 25-OH-Vitamin D ist deshalb der beste Indikator für die Vitamin-D-Versorgung.

25-OH-Vitamin D wird in der Niere weiter zum 1,25-(OH)₂ Vitamin D metabolisiert, welches der biologisch aktivste Vitamin-D-Metabolit ist und die Funktion eines Hormons hat (D-Hormon). Es reguliert die Kalziumaufnahme aus dem Darm, die Knochenmineralisierung, die Osteoblastendifferenzierung und die Knochenmatrixsynthese. Weiterhin wird die neuromuskuläre Funktion durch D-Hormon beeinflusst.

Bereits leichter Vitamin-D-Mangel mit einem 25-OH-Vitamin-D-Gehalt von 12–30 ng/ml bzw. 30–75 nmol/l führt über die verminderte Kalziumaufnahme zu einem sekundären Parathormonanstieg und zu einer gesteigerten Knochenresorption.

In der deutschen Normalbevölkerung mit einem Alter über 50 Jahren ist der Vitamin D Status signifikant mit der Knochendichte assoziiert (Scharla et al. 1996). Vitamin-D-Mangel ist somit einer der wichtigsten Risikofaktoren insbesondere für die senile Osteoporose. Die frühzeitige Erkennung eines Vitamin-D-Mangels ermöglicht eine effektive Prävention von Frakturen durch Vitamin-D-Supplementation. Schwerer Vitamin-D-Mangel mit einem 25-OH-Vitamin D Gehalt < 12 ng/ml bzw. < 30 nmol/l führt zum Krankheitsbild der Rachitis (Kinder) oder der Osteomalazie (Erwachsene), das durch eine gestörte Knochenneubildung und durch eine mangelhafte Matrix-Mineralisierung gekennzeichnet ist (Scharla 1997). Ein Überschuss an Vitamin D (Medikamenten-Überdosierung) ruft ein Hyperkalziämiesyndrom hervor.

Häufigkeit von Vitamin D-Mangel

Leichter Vitamin-D-Mangel aufgrund mangelnder UV-B-Bestrahlung (Sonnenmangel) oder verminderter Fähigkeit zur kutanen Vitamin D-Synthese (ältere Menschen) ist in Europa sehr häufig (Scharla 1998). In Deutschland leiden im Winter bis zu 1/3 der Normalbevölkerung über 50 Jahre an Vitamin-D-Mangel. Eine besondere Risikogruppe stellen Immigranten mit dunklerer Hautfarbe dar. Schwerer Vitamin-D-Mangel kann bei geriatrischen Patienten in ca. 3 % der Behandlungsfälle nachgewiesen werden (Oster et al. 1983). Auch jüngere Menschen können bei Vorliegen gastrointestinaler Erkrankungen (Leberfunktionsstörungen, Malabsorption) oder bei verstärktem Metabolismus (Medikamente wie Antiepileptika) einen Vitamin D-Mangel aufweisen.

In Deutschland liegen auch bei "Normalpersonen" häufig niedrigere Spiegel vor. Diese sind jedoch bereits mit einem sekundären Parathormonspiegel assoziiert. 25-OH-Vitamin-D-Werte von 12–30 ng/ml bzw. 30–75 nmol/l werden deshalb von den meisten Autoren übereinstimmend als erniedrigt angesehen (subklinischer Vitamin D-Mangel).

3. TESTPRINZIP

Dieser Testkit arbeitet nach dem Prinzip eines kompetitiven Protein-Bindungs-Assay. Das 25-(OH)-Vitamin D der Probe konkurriert mit dem zugesetzten Tracer (^3H 25-OH-Vit. D) um die Bindung an das Vitamin D-bindende Protein (VDBP, Gc-Globulin). Da in vivo das gesamte zirkulierende 25-(OH)-Vit D an VDBP gebunden vorliegt, müssen die Proben mit Acetonitril präzipitiert werden, um den Analyt freizusetzen. Der Acetonitrilüberstand kann dann ohne weitere Vorbehandlung im Test eingesetzt werden.

Im ersten Schritt werden der Tracer, Probe bzw. Standard pipettiert. Im zweiten Schritt wird dann das Vitamin D Bindungsprotein hinzugegeben. Das 25-(OH)-Vit D der Probe (Standard) kompetitiert mit dem Tracer um die spezifische Bindung an das VDBP. Mit steigender Analyt-Konzentration in der Probe (Standard) wird weniger VDBP über den Tracer gebunden. Ungebundener Tracer wird über Aktivkohle gebunden und abzentrifugiert. Die verbliebene Radioaktivität des Überstandes wird im Beta-Counter gezählt.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Artikel Nr.	Kit Komponenten	Menge
K 2111AP	Assaypuffer, gebrauchsfertig	2 x 10 ml
K 2111A	Aktivkohlesuspension, gebrauchsfertig	1 x 7 ml
K 2111BP	Vitamin D Bindungsprotein, gebrauchsfertig	6 ml
K 2111T	Tracer (^3H -25OH-D), gebrauchsfertig	1 x 600 μl
K 2111ST	Standards und NSB, gebrauchsfertig Genaue Konzentration bitte dem Etikett entnehmen	7 x 250 μl
K 2111KO	Kontrollen Genaue Konzentration bitte dem Datenblatt entnehmen	2 x 250 μl

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch für variable Volumina von 10 - 1000 μl
- Acetonitril
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Beta-Counter

6. HINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Standards und Kontrollen sind auf Humanserum aufgebaut. Sie sind auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

7. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- 6 Fläschchen Standards mit den Konzentrationen 0, 8, 20, 50, 125 und 312 nmol/l; gebrauchsfertig. Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **NSB-Lösung** 1 Fläschchen, gebrauchsfertig. Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **Kontrollen**, 2 Fläschchen Kontrollen; human Serum, gebrauchsfertig. Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **Tracer**, 1 Fläschchen enthält < 1,5 µCi (< 55 kBq) mit Tritium (³H) markiertem 25(OH) Vitamin D₃ in ethanolischer Lösung, gebrauchsfertig. Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **Assaypuffer**, 2 Fläschchen Phosphatpuffer mit 0,1% NaN₃ (Vorsicht: giftig). Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **Vitamin-D Bindungsprotein**, 1 Fläschchen mit Bindungsprotein aus Ziegenserum in Phosphatpuffer mit 0,1% NaN₃ als Stabilisator. Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **Aktivkohlesuspension**, 1 Fläschchen aktivkohlehaltiger Phosphatpuffer mit 0,1% NaN₃ als Stabilisator. Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).

Wichtige Hinweise für eine sorgfältige Präanalytik und zur Probenlagerung

Serum/Plasma

1. Vitamin D ist eine stabile Substanz; die Proben können deshalb in der Regel bei Raumtemperatur gelagert werden. **Wir empfehlen aber**, die Proben nach der Abnahme bei 2-8°C zu lagern, falls eine Messung innerhalb der nächsten 24 Stunden nicht möglich ist. Sollte innerhalb dieser 24 Stunden keine Messung erfolgen, empfiehlt es sich, die Proben bei -20°C einzufrieren. Ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben jedoch ist unter allen Umständen zu vermeiden.
2. **Hämolyse** stört das Ergebnis nicht; **Vollblut** darf aber nicht als Probenmaterial eingesetzt werden.
3. **Lipämisches** Probenmaterial führt- falls unbehandelt- zu falschen Ergebnissen. Wir empfehlen daher:
 - a.) Lipämische Proben scharf abzentrifugieren (10 min. bei ca. 13.000 x g)
Dabei schwimmt die Fettphase nach oben; die wässrige Phase kann dann durch die Fettschicht hindurch mit der Pipette abgenommen werden.
 - b.) Für stark lipämisches Material empfehlen wir die Verwendung unseres Delipidierungs-Kits (**Bestell-Nr. K 1003A**), der speziell für lipämisches Probenmaterial im klinischen Labor entwickelt wurde.
4. Bei der Durchführung des Assays sind die in der Anleitung genannten Inkubationszeiten und Temperaturen sorgfältig zu beachten.

Urin

Vor der Testdurchführung müssen die Proben gut gemischt werden. Zur Lagerung sind die Urine mit 1 N NaOH auf einen pH Wert zwischen 6 und 8 einzustellen. Die Proben sind bei 4 °C, bei längerer als 14tägiger Lagerung tiefgefroren, bis zur Messung aufzubewahren.

Testdurchführung und Probenvorbereitung

I. Extraktion

Die Extraktion ist in 1.5 ml Einmalreaktionsgefäßen in Einzelwerten durchführen. Wir empfehlen das Pipettieren auf Eis durchzuführen.

1. **50 µl** NSB, Standards, Kontrollen, Patientenproben (Plasma, Serum oder Urin) in Teströhrchen geben
2. **200 µl** Acetonitril (Vorsicht: gesundheitsschädlich!) hinzufügen,
3. Röhrcheninhalt mischen, Deckel freizentrifugieren,
4. **20 - 30 min.** bei 4 °C inkubieren,
5. **10 min.** bei **1700 x g** zentrifugieren,
6. Überstände in CPBA zur 25-OH-D-Quantifizierung einsetzen.

II. Bindungsassay

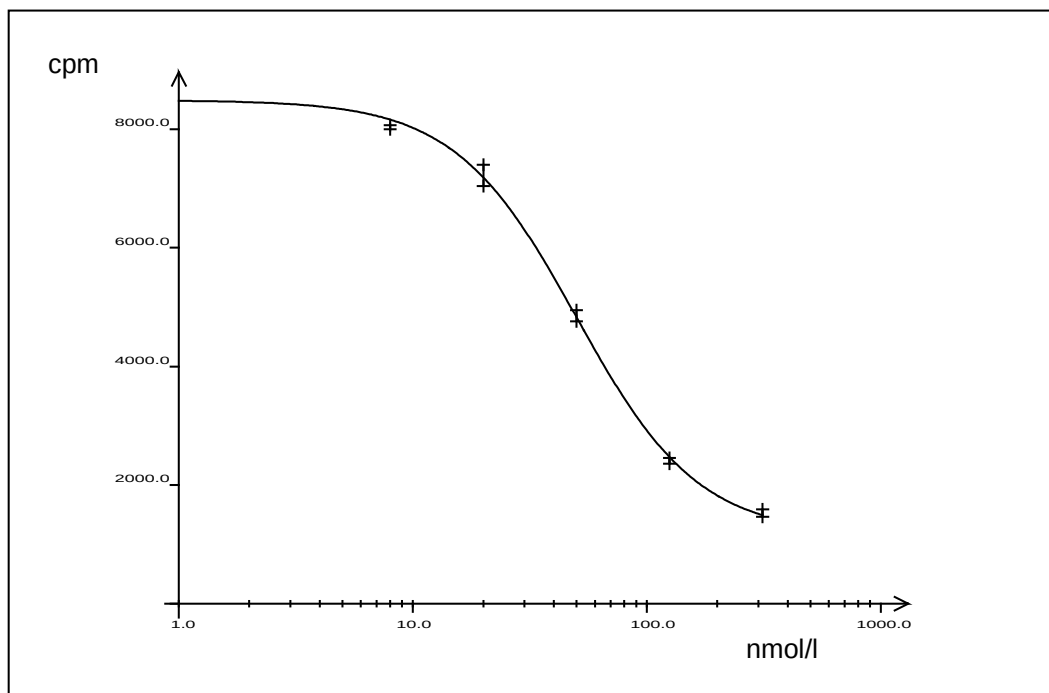
Die Bestimmungen sind in Glasröhrchen in Doppelwerten durchzuführen. Alternativ kann die Testdurchführung auch in den RIA-Spezialgefäßen (600 µl Gesamtvolumen, Fa. Sarstedt) durchgeführt werden. Das hierfür notwendige Equipment kann über Immundiagnostik bezogen werden.

1. **25 µl** NSB, Standards, Kontrollen, Patientenproben (klare Überstände nach dem Extraktionsschritt) in Glasröhrchen überführen,
2. **10 µl** Tracer (³H-25-OH-D) in jedes Röhrchen pipettieren.
3. **300 µl** Assay-Puffer in jedes Röhrchen pipettieren.
4. **100 µl** Bindungsprotein (nicht in NSB) hinzugeben.
5. Röhrcheninhalt mischen (bei Verwendung von RIA Spezialgefäßen werden diese mit Folie verschlossen, kräftig geschüttelt und dann die Folie kurz freizentrifugiert),
6. **1 Stunde** bei 4 °C inkubieren,
7. **100 µl** Aktivkohlesuspension (Suspension vor Zugabe mischen) zugeben. Röhrcheninhalt mischen,
8. **3 - 5 min.** bei 4 °C inkubieren.
9. **10 min.** bei 1700 x g zentrifugieren,
10. **400 µl** Überstände in Beta-Counter-Zählgefäße (7 ml) überführen, **2 ml** Szintillatorflüssigkeit zugeben, mischen, (Bei Verwendung moderner Sicherheitsszintillatoren wie Aquasafe 300 oder HiSafe III ist dem zu messenden Überstand die 1,5 - 2 fache Szintillator-Menge zuzusetzen)
11. Radioaktivität im Beta-Counter 2 min. zählen.

Auswertung

Zur Auswertung des Testes empfehlen wir die 4-Parameter-Funktion. Alternativ kann auch eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung oder eine gewichtete Spline-Funktion gewählt werden. Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte diese der Operator durchführen.

Mustereichkurve



Erwartete Ergebnisse

Normwert-Bereiche für 25-OH-Vitamin D₃

1 ng/ml = 2.5 nmol/l

1 nmol/l = 0.4 ng/ml

Information vom ASBMR 2006

Defizienz (schwerer Mangel)	< 12 ng/ml	bzw. < 30 nmol/l
Insuffizienz (Mangel)	12 – 30 ng/ml	bzw. 30 – 75 nmol/l
Suffizienz (gut versorgt)	> 30 ng/ml	bzw. > 75 nmol/l

Bund der Osteologen **SACHSEN E. V.**

http://osteologie-sachsen.de/aktuelles_vitamin_d.html

Achtung

Die Produktion von Vitamin D in der Haut ist hoch variabel und abhängig von Jahres- und Tageszeit, Breitengrad, Alter, Sonnenschutz u. a.

Die Referenzbereiche sind von der verwendeten Untersuchungsmethode abhängig (z. B. Vitamin-D-Freisetzung von dem Vitamin D Bindeprotein, DBP) und können daher nur zur Orientierung dienen.

Literaturreferenzen

Visser M, Deeg DJ, Puts MT, Seidell JC, Lips P. (2006) Low serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D in older persons and the risk of nursing home admission. Am J Clin Nutr. Sep;84(3):616-22; quiz 671-2

Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. (2005) Altern Med Rev. Jun;10(2):94-111. Review

Wicherts IS, van Schoor NM, Boeke AJ, Visser M, Deeg DJ, Smit J, Knol DL, Lips P. (2007) Vitamin D status predicts physical performance and its decline in older persons. J Clin Endocrinol Metab. Jun;92(6):2058-65

QUALITÄTSKONTROLLE

Kreuzreaktion

Zu Aktivkohle behandeltem Serum wurde 25-OH Vitamin D₂ (125 nmol/l), 24,25-(OH)₂ Vitamin D₃ (250 nmol/l) und 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ (250 nmol/l) zugesetzt. Das 25-OH Vitamin D₂ reagierte zu 60 %, das 24,25-(OH)₂ Vitamin D₃ zu 100 % kreuz, während das 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ keine Kreuzreaktivität zeigte.

Reproduzierbarkeit

Durch Wiederholungsmessungen (n=11) einer 25-Dihydroxy-Vitamin D₃ haltigen Proben wurden folgende Resultate erzielt:

Intraassayvarianz

	Anzahl	Mittelwert [nmol/l]	VK [%]
Probe 1	32	11,3	12,5
Probe 2	32	318	7,2

Interassayvarianz

	Anzahl	Mittelwert [nmol/l]	VK [%]
Probe 1	9	9,9	17
Probe 2	9	310	11

Klinik

	Anzahl	Mittelwert [nmol/l]
Normalpersonen	35	54
Patienten mit Schenkelhalsbrüchen	43	9,5

ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Falls für die Herstellung der Testkomponenten Humanseren verwendet wurde, sind diese auf HIV und Hepatitis B getestet und für negativ befundet worden. Jedoch sollten die Testkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
- Die Testkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid. Natriumazid ist giftig. Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit der Haut oder der Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Alle im Test enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken oder, wenn vermerkt, zur in vitro Diagnostik eingesetzt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Datums nicht mehr verwendet werden. Einzelkomponenten verschiedener Chargen dürfen nicht gemischt oder ausgetauscht werden.
- Für die Qualitätskontrolle sind die, für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die charakteristischen Testdaten wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden firmenintern festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik GmbH 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 GmbH zurück zu senden.