

Arbeitsanleitung

1,25-(OH)₂ Vitamin D

Radio Rezeptor Assay

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

Gültig ab 20.04.2010

Artikelnummer: K 2221

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

Verwendungszweck:

Der hier beschriebene Assay ist für die Bestimmung von **1,25-(OH)₂ Vitamin D** aus Serum und Plasma. Nur zur in vitro Diagnostik.

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-hydroxyvitamin D. In der Niere wird in einem 2. Hydroxylierungsschritt die Hormonform des Vitamin D, das 1,25-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin D richtet sich also normalerweise nach den Erfordernissen des Stoffwechsels. Abweichungen des 1,25-dihydroxyvitamin D 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-dihydroxyvitamin D absinken, zur Diagnostik des Vitamin D-Mangels sollte man deshalb den Vorläufermetabolit, das 25-hydroxyvitamin D messen. Ursachen für einen unphysiologischen Mangel an 1,25-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin D-Konzentration (Rickers et al. 1985).

Da 1,25-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin D (Calcitriol) oder des Prohormons 1 α -hydroxyvitamin D. Erniedrigte oder relativ zu niedrige 1,25-dihydroxyvitamin D Spiegel findet man bei renalen Tubulusfunktionsstörungen (z.B. Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom). Eine unphysiologische Überproduktion von 1,25-dihydroxyvitamin D tritt bei granulomatösen Systemerkrankungen (z.B.

Sarkoidose) auf, wo eine extrarenale 1,25-dihydroxyvitamin D Synthese stattfindet. Diese kann zur Hypercalciämie führen. Auch bei der idiopathischen Hypercalciurie findet man relativ zu hohe 1,25-dihydroxyvitamin D Spiegel. Reaktiv findet man erhöhte Konzentrationen von 1,25-dihydroxyvitamin D 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

Testprinzip:

Der biologisch wirksame Vitamin D-Metabolit, das 1,25-(OH)₂ D, muß zu diesem Test auf einer Kieselgursäule (Extrelut) aus dem Probenmaterial extrahiert und anschließend mittels Kieselgelmaterial (Silica Kartuschen) von den anderen Vitamin D-Metaboliten (hauptsächlich dem 25-OH-D und dem 24,25-(OH)₂ D) abgetrennt werden.

Zur quantitativen Erfassung des 1,25-(OH)₂ D konkurrieren im Radiorezeptorassay ³H-markiertes 1,25-(OH)₂ D₃ als Tracer und das 1,25-(OH)₂ D aus der Probe um die begrenzte Anzahl von Bindungsstellen des spezifischen Rezeptors für 1,25-(OH)₂ D. Nach Reaktion des Rezeptors mit 1,25-(OH)₂ D wird der freie von gebundenem Tracer mit Aktivkohle abgetrennt.

Inhalt der Testpackung:

- 1,5 ml **Standard**: NSB, 0, 6.6, 20, 60, 180 pg/ml
- 1,5 ml **Kontrollserum**
- **1,25-(OH)₂ D Rezeptor**, lyophilisiert (in 11 ml eiskaltem aqua dest resuspendieren)
- **³H-1,25-(OH)₂ D₃**, Tracer < 12 kBq
- 15 ml **Assay-Puffer** (AP)
- 14 ml **Aktivkohle-Suspension**
- 30 ml **Tris/HCl Puffer** (TP)
- 2 ml **Ethanol**

Benötigte Ausstattung und Reagenzien:

- 50 Extrelut-Säulen
- 50 Silica-Kartuschen
- Diisopropylether
- Isopropanol
- Hexan
- β -Counter
- Gefriertruhe und Kühlschrank
- Speedvac oder Stickstoffeindampfer

Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien:

- **Standard, Kontrollen und NSB** vor Gebrauch auftauen. Bei -20°C sind die Standards, Kontrollen und NSB bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar (siehe Etikett)
- **1,25-(OH)₂ D Rezeptor** wird **direkt vor dem Gebrauch** in **11 ml** eiskaltem aqua dest resuspendiert. Bei 2-8 °C ist der lyophilisierte Rezeptor bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar (siehe Etikett). Resuspendierter Rezeptor ist nicht haltbar.
- **³H-1,25-(OH)₂ D₃**, Tracer < 12 kBq gebrauchsfertig. Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **Assay-Puffer** (AP), gebrauchsfertig. Haltbar bei -20°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **Aktivkohle-Suspension**, gebrauchsfertig. Haltbar bei 4°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).

- **Tris/HCl Puffer** (TP), gebrauchsfertig. Haltbar bei 4°C bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).
- **Ethanol**, gebrauchsfertig. Haltbar bei RT bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett).

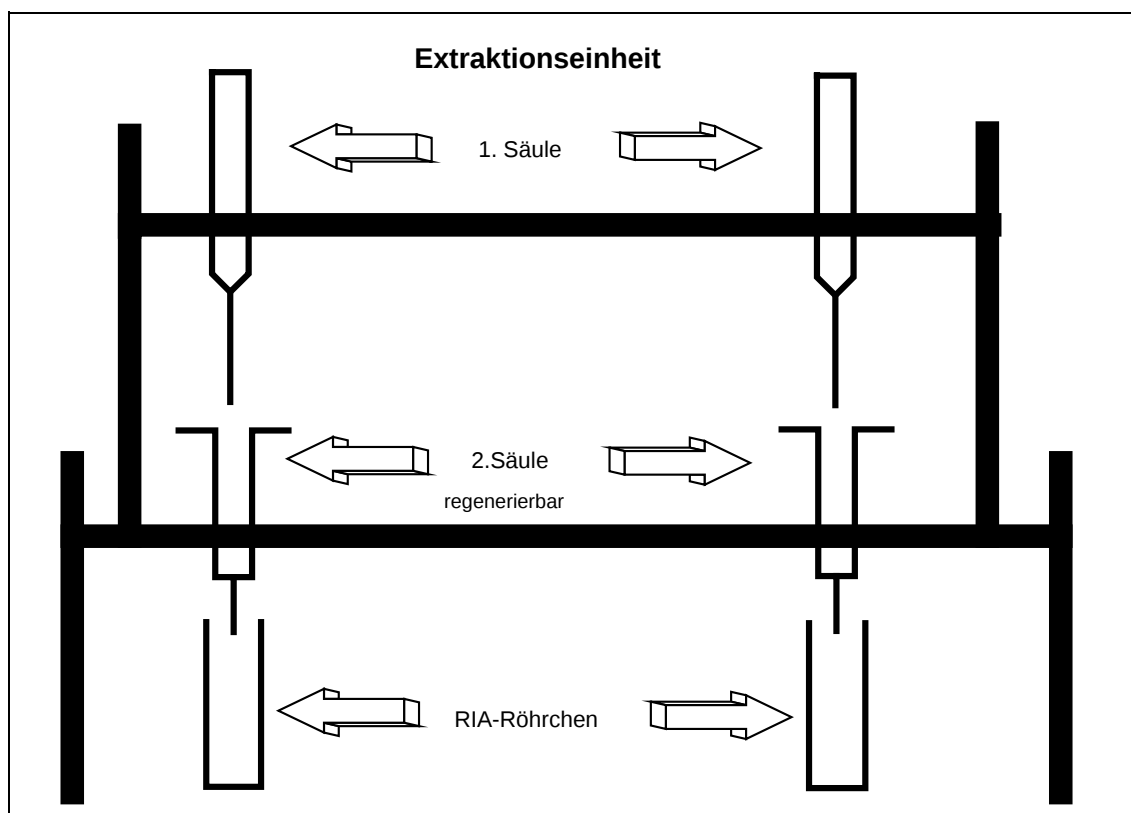
Vorbereitung des Probenmaterials:

Plasma/Serum:

Das Probenmaterial sollte bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden. Nach dem Auftauen für 10 min. bei 1800 x g zentrifugiert.

Testdurchführung und Probenvorbereitung.

Aufbau der Extraktionsanlage:



- Der Extraktionsständer besteht aus 2 Plexiglas-Untereinheiten, die übereinander gestellt werden.
- In den oberen Teil werden die Extrelut-Säulen (Ständereinheit I) eingesetzt und in den unteren Teil (Ständereinheit II) die Silica Kartuschen (regenerierbar) eingesetzt.
- Für die Schritte 1-4. (Auftragen des Probenmaterials auf die Säulen und waschen) wird die Extraktionseinheit (I und II) in eine Auffangschale gestellt.
- Vor dem Elutionsschritt (Punkt 5) werden die Extrelut-Säulen entfernt. Ständereinheit I dient nun zur Aufnahme der Reagenzgläser zum Auffangen des Eluats und wird unter die Ständereinheit II positioniert.

Extraktion mit Extrelut und Silica-Säulen:

1. Die Extrelut-Säulen (Ständereinheit I) mit je **500 µl** Tris-Puffer äquilibrieren.
2. **500 µl** der Standards, Kontrolle bzw. Proben in Duplikaten auftragen und 10 min. einziehen lassen.
3. Mit 4 x 1 ml Diisopropylether in je 3 min. Abstand das Vitamin D von den Extrelut Säulen in die Silica-Kartuschen extrahieren. **(Nach der Extraktion müssen die Extrelutsäulen entfernt werden.)**
4. **5 x 2 ml Isopropanol/Hexan (4/96 v/v)** und **3 x 2 ml Isopropanol/Hexan (6/94)** waschen. (Silica-Säulen Ständereinheit II)
5. Die Elution des 1,25-(OH)₂ D erfolgt mit **2 x 2 ml Isopropanol/Hexan (25/75 v/v)**. **Hinweis: Es ist darauf zu achten, daß die Reagenzgläser (Ständereinheit I) exakt unter den Säulen stehen.**
6. Die eluierten Proben werden unter leichtem Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet.

Der eingetrocknete Proben, Kontrollen und Standards können bei -20°C 24h gelagert werden.

7. **20 µl** Ethanol zu jeder eingetrockneten Proben bzw. jedem Standard und Kontrollen pipettieren und vortexen
8. **250 µl** eiskalten Assaypuffer in jedes Röhrchen hinzufügen und vortexen.
9. **200 µl** des resuspendierten Rezeptormaterial (**frisch ansetzen**) in jedes Röhrchen pipettieren, vorsichtig vortexen.
10. **60 min** bei Raumtemperatur inkubieren (20-23 °C).
11. **20 µl** Tracer zufügen und vorsichtig vortexen.
12. **60 min** bei RT (20-23 °C) inkubieren.
13. **200 µl** eiskaltes DCC (Dextran coated Charcoal) zufügen, vorsichtig vortexen.
14. Zentrifugation für **10 min bei 2000 x g**.
15. Überstand in Szintillationsgefäße dekantieren, **3 ml** Szintillator zugeben, schütteln (Bei Verwendung moderner Sicherheitsszintillatoren wie Aquasafe 300 oder HiSafe III ist dem zu messenden Überstand die 1,5 - 2 fache Szintillator-Menge zuzusetzen).
16. Im β-Counter **1 min** messen.

Regenerierung der Silicakartuschen:

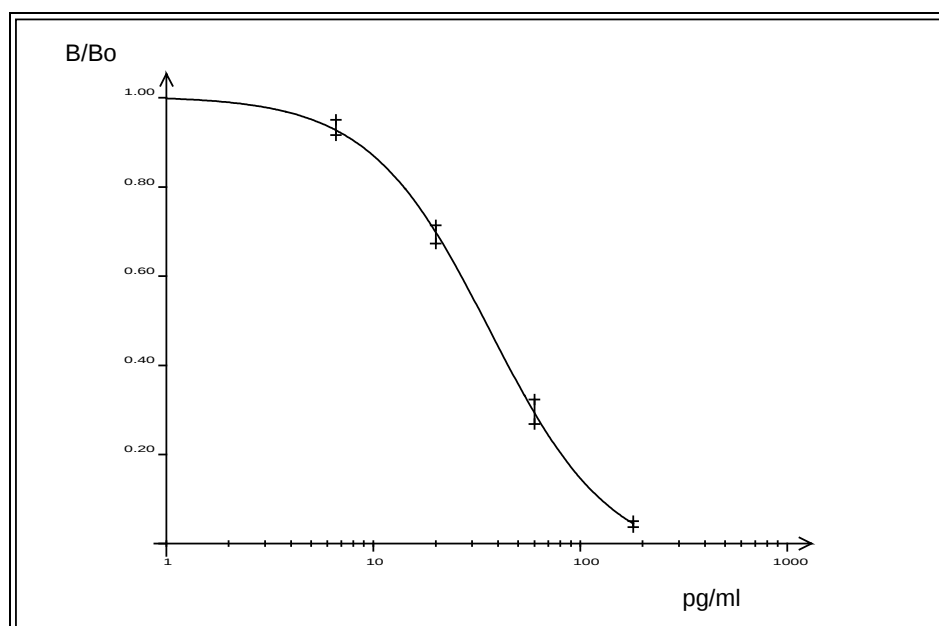
Die unteren Säulen werden nach folgendem Schema regeneriert. die Säulen können direkt nach der Extraktion regeneriert werden und müssen vor dem nächsten Gebrauch trocken sein.

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

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:



Nachweisgrenze:

Die Nachweisgrenze dieses 1,25-Dihydroxy-Vitamin D RRA wurde festgesetzt als $B_0 + 2SD$. Sie ist < 2 pg/ml.

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. Radio Immuno-Assays zeigen in direkten Vergleichsstudien gegen Radio-Rezeptor-Assays bei bestimmten Patientenkollektiven bis zu 50% höhere Werte^{4),5)}.

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

Qualitätskontrolle:**Kontrollen:**

1,25-(OH)₂ D Kontrollserum: Der Konzentrationsbereich ist dem beigefügtem Datenblatt entnehmen

Linearität:

Der lineare Bereich erstreckt sich von 6-180 pg/ml.

Die Linearität dieses Testes ist gegeben bei einem Probenvolumen von 100 µl bis 500 µl.

Kreuzreaktion:

25 Hydroxy-Vitamin D < 0.007 %

24,25 Dihydroxy-Vitamin D < 0.001 %

Im Gegensatz zu herkömmlichen Radio-Immuno-Assays vermeidet der ³H-markierte Radio-Rezeptor-Assay Interferenzen zu anderen Vitamin D Metaboliten, wie z.B.:

1,25-(OH)₂-Vitamin D₃-26,23 Lacton⁶⁾

Calcipotriol⁷⁾

1 α ,24R,25-(OH)₃-Vitamin D₃⁸⁾

Reproduzierbarkeit:

Durch Wiederholungsmessungen (n=11) einer 1,25-Dihydroxy-Vitamin D-haltigen Proben wurden folgende Resultate erzielt:

Variationskoeffizient:

Mittelwert	VK _{inter}	VK _{intra}
10 pg/ml	< 20%	< 15%
60 pg/ml	< 15%	< 10%

Literatur:

1. W. Grotz et al.: J Am Soc Nephrol, 2001, 12:1530-1537
2. S. Wildermuth et al.: Clinica chimica Acta, 220, 1993, S. 61
3. M. Schilling et al.: Clinical Chemistry, 33, 1987
4. F.P. Armbruster et al.: Ärztl. Lab., 36, 1990, S. 75
5. B.W. Durham et al.: Ann. Clin. Biochem., 32, 1995, S. 77
6. B.W. Hollis: Calcif. Tissue Int., 58, 1996, S.4
7. B.W. Hollis: Clinical Chemistry, 41, 1995, S.1313
8. S.J. Iqbal et al.: Clinical Chemistry, 42, 1996, S.112
9. W. Withold et al.: Eur. J. Clin. Chem., Clin. Biochem., 33, 1995

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 Humansenen 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.