

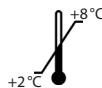
1,25-(OH)₂-Vitamin D ELISA

*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 2019-01-01

REF K 2112



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN	5
6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG	5
<i>Probenlagerung</i>	5
<i>Probenvorbereitung</i>	6
<i>Vorbereitung der Probenextraktion</i>	6
7. TESTDURCHFÜHRUNG	7
<i>Testprinzip</i>	7
<i>Probenextraktion</i>	8
<i>Vorinkubation</i>	8
<i>Pipettierschema</i>	9
8. ERGEBNISSE	10
9. EINSCHRÄNKUNGEN	11
10. QUALITÄTSKONTROLLE	11
<i>Referenzbereiche (Plasma oder Serum)</i>	11
11. TESTCHARAKTERISTIKA	12
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	12
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	12
<i>Analytische Sensitivität</i>	13
<i>Spezifität</i>	13
12. REGENERIERUNG DER SILICA-KARTUSCHEN	13
13. VORSICHTSMASSNAHMEN	14
14. TECHNISCHE MERKMALE	14
15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	15
16. LITERATUR	15
<i>Allgemeine Literatur</i>	15
<i>Literatur mit dem Immundiagnostik 1,25-(OH)₂-Vitamin D ELISA</i>	16

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 zweiten 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 Kalziumstoffwechsels 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 Kalziumstoffwechsel 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 Hyperkalziämie führen. Auch bei der

idiopathischen Hyperkalziurie 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 kalziumarmer Ernährung, sowie bei Parathormonüberschuss (primärer Hyperparathyreoidismus) und bei manchen Tumorarten (infolge Sekretion von parathormon-ähnlichem 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 Hyperkalziurie
- Hyperkalziämie

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 2112	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 0001.C.100	WASHBUF	Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 2112	ETHANOL	Ethanol, gebrauchsfertig	1 x 1,5 ml
K 2112	TRIS-HCL	Tris-HCL Puffer, gebrauchsfertig	1 x 30 ml
K 2112	AB	Detektionsantikörper (anti-1,25-(OH) ₂ -Vitamin D), gebrauchsfertig	1 x 25 ml
K 2112	STD 1–6	Standards, gebrauchsfertig (Konzentrationen der Spezifikation entnehmen)	6 x 2,5 ml
K 2112	CTRL A	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2,5 ml
K 2112	CTRL B	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 x 2,5 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 2112	CONJ	Konjugat, polyklonaler peroxidase markierter Antikörper, gebrauchsfertig	1 x 24 ml
K 0002.15	SUB	Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	2x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 2112	FOL	Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte	2 x 1 Stück

Für Nachbestellungen von Einzelkomponenten verwenden Sie als Bestellnummer die Artikelnummer gefolgt von der Bezeichnung.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- 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 mm Reagenzgefäße aus Glas (kein Plastik)
- Extraktionsständereinheit (Artikelnr.: K2221sv), bestehend aus drei Kunststoffständern und einem Stickstoffverteiler
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge
- Vortex-Mixer
- Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620/690 nm)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. LAGERUNG UND VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Kits darauf, dass die Reagenzien wie auf dem Etikett angegeben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit kann so bis zu 2x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- **Vorbereitung des Waschpuffers:** Das **Waschpufferkonzentrat (WASHBUF)** muss vor Gebrauch **1:10** in Reinstwasser verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund des hohen Salzgehalts im Konzentrat kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **WASHBUF** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Der **Waschpuffer** (1:10 verdünntes WASHBUF) ist **1 Monat bei 2–8 °C** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- Bei der **Herstellung der Lösemittelgemische** muss auf Volumenkontraktion geachtet werden:
 1. Lösemittel einzeln in separaten Messzylindern abmessen und erst dann in eine Lagerungsflasche mischen.
 2. Sowohl Lagerungsflasche als auch Messzylinder aus Glas benutzen, Plastik ist nicht geeignet.
- **Mikrotiterstreifen:** Nach Öffnen des verschweißten Aluminiumbeutels müssen nicht verwendete Streifen mit Klebefolie überzogen und mit Trockenmittel im wieder verschlossenen Aluminiumbeutel bei 2–8 °C gelagert werden. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Mikrotiterplatten zu verwenden, auch nicht wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Schon geöffnete Mikrotiterplatten unterliegen anderen Bedingungen als verschlossene.
- Alle anderen Testreagenzien sind gebrauchsfertig und, bei **2–8 °C** gelagert, bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENLAGERUNG UND -VORBEREITUNG

Probenlagerung

Frisch abgenommenes Blut sollte **innerhalb einer Stunde abzentrifugiert** werden. Vitamin D ist eine stabile Substanz. Die Proben können deshalb in der Regel bei Raumtemperatur gelagert werden. Wir empfehlen aber, das **Serum bei 2–8 °C** zu lagern. Sollte innerhalb von 72 Stunden keine Messung erfolgen, empfiehlt es sich,

die Proben bei **-20 °C** einzufrieren. **Ein mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben ist unter allen Umständen zu vermeiden.**

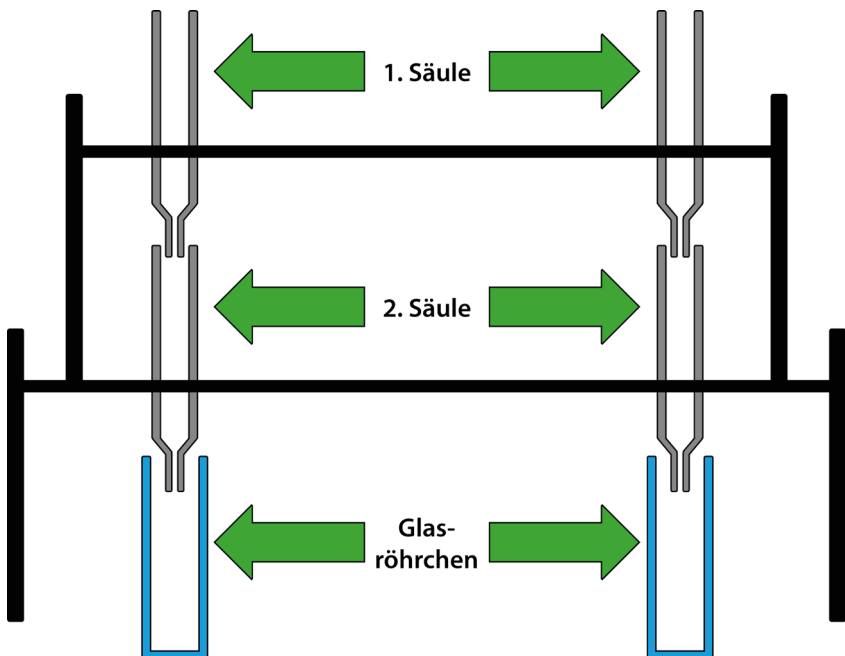
Die **Serumproben** können bei **2–8 °C** (z. B. mit Coolpacks) transportiert werden und sind so bis zu 3 Tage haltbar. Erfolgt danach keine Messung, empfiehlt sich die Proben bei -20 °C einzufrieren.

Probenvorbereitung

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 (die Säulen haben eine Kapazität von 1000 µl). Wird ein **Probenvolumen von 500 µl** gewählt, muss die Säule mit **500 µl Tris-HCL vorgepuffert** werden. Hierzu immer zuerst die 500 µl Tris-HCL in die Säule pipettieren, komplett einziehen lassen und danach die 500 µl Probe pipettieren. Das Ergebnis wird mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert, um die tatsächliche Konzentration zu ermitteln.

Vorbereitung der Probenextraktion



Der Extraktionsständer besteht aus drei 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, 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 peroxidasemarkierter anti-Maus-Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: 1,25-Dihydroxy-Vitamin D – Detektionsantikörper – Peroxidasekonjugat. 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. Anhand einer mitgeführten Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – lässt sich die Konzentration der Probe ermitteln.

Probenextraktion

1.	1000 µl Standards, Kontrollen, Proben in Einzelwerten auf die Chromabond auftragen und 10 min einziehen lassen. Bei Probenvolumina < 1000 µl werden die Säulen mit Tris-HCl vorgepuffert, z. B. 500 µl Tris-HCl Puffer auf die Säule geben + 500 µl Probe (ergibt Faktor 2 für Probenauswertung).
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).

Bei Schritt 3 und 4 bitte darauf achten, dass die Säulen nie länger als 5 min trocken stehen.

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.	Nach Schritt 4 die Ständereinheit II mit den Silica-Säulen auf die Ständereinheit III mit den Glasröhrchen stellen. Hinweis: Es ist darauf zu achten, dass die Reagenzgläser (kein Plastik) (Ständereinheit III) exakt unter den Säulen stehen.
6.	Die Elution des 1,25-Dihydroxy-Vitamin D erfolgt mit 2 x 2 ml Isopropanol/Hexan (25/75 v/v) .
7.	Die eluierten Proben werden unter leichtem Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet.
8.	Bevor die Vorinkubation gestartet wird, die Glasröhrchen auf Raumtemperatur abkühlen lassen.

Vorinkubation

1.	20 µl Ethanol zu jeder eingetrockneten Probe bzw. jedem Standard sowie den Kontrollen pipettieren und nach der Ethanolzugabe vorsichtig ca. 1 s vortexen.
----	--

2.	450 µl Antikörperlösung zu den Proben, Standards und Kontrollen pipettieren und mindestens 10 s gründlich vortexen.
3.	Decken Sie die Röhrchen mit Folie ab. Genau 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.

Pipettierschema

Vor Gebrauch **alle Reagenzien und Proben** auf **Raumtemperatur** (18–26 °C) bringen, gut mischen.

Markieren Sie die Positionen für Standards/Kontrollen/Proben im Protokollblatt.

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen müssen abgeklebt und zusammen mit dem Trockenmittelbeutel in der verschlossenen Aluminiumverpackung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	200 µl Standards/Kontrollen/Proben in Doppelbestimmung in die jeweiligen Vertiefungen pipettieren. Das Vorinkubat ist eine viskose Flüssigkeit. Wir empfehlen daher, die Pipettenspitze einmal mit dem Vorinkubat aufzuziehen und dann langsam zu pipettieren. Die Übertragung der Proben auf die Mikrotiterplatte sollte nicht länger als 20 min dauern.
2.	Streifen abdecken und 18–22 h bei 6–10 °C inkubieren*.
3.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
4.	200 µl Konjugat in jede Vertiefung pipettieren.
5.	Streifen abdecken und genau 1 h bei Raumtemperatur (18–26 °C) unter Schütteln** inkubieren.
6.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.

7.	200 µl Substrat (SUB) in jede Vertiefung pipettieren. Achtung: Achten Sie auf die Zeit, die für die Zugabe benötigt wird. Sie sollte nicht mehr als 2 min betragen. Des Weiteren ist im nächsten Schritt darauf zu achten, dass die Zugabe der Stopplösung dieselbe Zeitspanne in Anspruch nimmt, um eine identische Inkubationszeit aller Proben mit Substrat zu gewährleisten.
8.	15–25 min*** bei Raumtemperatur (18–26 °C) im Dunkeln inkubieren.
9.	50 µl Stopplösung (STOP) in jede Vertiefung pipettieren, gut mischen. Achten Sie darauf, dieselbe Pipettierreihenfolge und -zeit einzuhalten wie in Schritt 7.
10.	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 gemessen. 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 Übernacht-Inkubation zu. Wir empfehlen immer die gleiche Zeitspanne (z. B. 20 h) für die Inkubation.

** Wir empfehlen die Streifen bei 550 rpm (Umdrehungen pro Minute) mit einem Orbit von 2 mm zu schütteln.

*** 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. 0,001).

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

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, z. B.

250 µl Tris-HCl + 750 µl Probe ergibt Faktor 1,3

500 µl Tris-HCl + 500 µl Probe ergibt Faktor 2

Proben mit Konzentrationen unterhalb der analytischen Sensitivität können nicht klar quantifiziert werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik AG empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

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

Referenzbereiche (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 Referenzbereich 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

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Patientenproben wurden verdünnt und im Test gemessen. Die Ergebnisse sind in der unten stehenden Tabelle aufgeführt (n = 2).

Probe	Verdünnung	erwartet [pg/ml]	gemessen [pg/ml]
A	–	21,2	21,2
	250 µl Puffer + 750 µl Probe	15,9	15,9
	500 µl Puffer + 500 µl Probe	10,6	11,2
	750 µl Puffer + 250 µl Probe	5,3	8,5
B	–	29,6	29,6
	250 µl Puffer + 750 µl Probe	22,2	27,3
	500 µl Puffer + 500 µl Probe	14,8	16,9
	750 µl Puffer + 250 µl Probe	7,4	7,2

Analytische 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]	Standard- abweichung (SD)	Nachweisgrenze [pg/ml]
1	1,201	0,025	4,8

Spezifität

Die Spezifität wurde nachgewiesen durch Bestimmung der Kreuzreaktivität verwandter Substanzen. Die Kreuzreaktivität wird angegeben in Prozent:

- 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ 100 %
- 1,25-(OH)₂-Vitamin D₂ 41 %
- Vitamin D₂ & D₃ < 0,0 %
- 24,25-(OH)₂-Vitamin D₃ < 0,1 %
- 25-OH-Vitamin D₂ < 0,1 %
- 25-OH-Vitamin D₃ < 0,01 %
- Alfalcidol < 0,003 %

12. REGENERIERUNG DER SILICA-KARTUSCHEN

Die Silica-Kartuschen (untere Säulen) müssen direkt nach der Probenextraktion nach folgendem Schema regeneriert werden:

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

Bitte beachten Sie auch folgende Hinweise:

- Vor dem nächsten Gebrauch müssen die Säulen trocken sein.
- Bis zu 5 Regenerierungszyklen sind möglich.
- Gleich oft regenerierte Säulen im selben Lauf verwenden.
- Trockene Säulen in Plastikbeutel mit Trockenmittel versehen bei Raumtemperatur lagern.

13. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. 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 benutzt 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. Dämpfe nicht einatmen und Inhalation vermeiden.

14. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden. Bereits geöffnete Mikrotiterplatten unterliegen anderen Bedingungen als verschlossene.
- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des auf der Kitverpackung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während der Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Stopfen und Verschlüsse verschiedener Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.

- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

15. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- 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, zurückzusenden.

16. LITERATUR

Allgemeine Literatur












1. Hollis, B.W., 1996. Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcified tissue international*, **58**(1), pp.4–5.
2. Iqbal, S.J. et al., 1996. Possible interference with calcipotriol on new IDS RIA for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Clinical chemistry*, **42**(1), pp.112–3.
3. Withold, W. et al., 1995. Evaluation of a radioimmunoassay for determination of calcitriol in human sera employing a 125I-labelled tracer. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, **33**(12), pp.959–63.
4. Hollis, B.W., 1995. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone interferes in determination of 1,25-dihydroxyvitamin D by RIA after immunoextraction. *Clinical chemistry*, **41**(9), pp.1313–4.
5. Durham, B. et al., 1995. Comparison of the IDS Gamma-B 1,25 dihydroxy vitamin D assay system with the Nichols Institute radioreceptor assay system. In *Proceedings of the ACB National Meeting. Glasgow, UK: The Association of Clinical Biochemists*.

6. Wildermuth, S. et al., 1993. Scintillation proximity assay for calcitriol in serum without high pressure liquid chromatography. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **220**(1), pp.61–70.
7. Armbruster, F. et al., 1990. Extraktion und chromatographische Trennung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D aus Serum oder Plasma ohne Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). *Das Ärztliche Laboratorium*, **36**, pp.75–80.
8. Schilling, M., Armbruster, F.P. & Schmidt-Gayk, H., 1987. Rapid, selective separation of 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D₃ from serum with Extrelut-1 columns. *Clinical chemistry*, **33**(1), p.187.

Literatur mit dem Immundiagnostik 1,25-(OH)₂-Vitamin D ELISA

9. Zittermann, A. et al., 2011. Vitamin D deficiency is an independent predictor of anemia in end-stage heart failure. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, **100**(9), pp.781–8.
10. Zittermann, A. et al., 2009. Circulating calcitriol concentrations and total mortality. *Clinical chemistry*, **55**(6), pp.1163–70.
11. Zittermann, A. et al., 2009. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *The American journal of clinical nutrition*, **89**(5), pp.1321–7.

Verwendete Symbole:

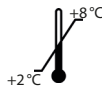
	Temperaturbegrenzung		Bestellnummer
	In-Vitro-Diagnostikum		Zu verwenden mit
	Hersteller		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Chargenbezeichnung		Verwendbar bis
	Achtung		Gebrauchsanweisung beachten
	Spezifikationsdatenblatt beachten		

1,25-(OH)₂-Vitamin D ELISA

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

Valid from 2019-01-01

REF K 2112



IVD **CE**



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	19
2. INTRODUCTION	19
3. MATERIAL SUPPLIED	20
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	21
5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS	21
6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	22
<i>Sample storage</i>	22
<i>Sample preparation</i>	22
<i>Preparation of sample extraction</i>	23
7. ASSAY PROCEDURE	23
<i>Principle of the test</i>	23
<i>Sample extraction</i>	24
<i>Pre-incubation</i>	25
<i>Test procedure</i>	25
8. RESULTS	26
9. LIMITATIONS	27
10. QUALITY CONTROL	27
<i>Reference range (plasma or serum)</i>	27
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	28
<i>Precision and reproducibility</i>	28
<i>Dilution recovery</i>	28
<i>Analytical Sensitivity</i>	29
<i>Specificity</i>	29
12. REGENERATION OF THE SILICA CARTRIDGES	29
13. PRECAUTIONS	30
14. TECHNICAL HINTS	30
15. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	31
16. REFERENCES	31
<i>General literature</i>	31
<i>Literature using Immundiagnostik 1,25-(OH)₂-vitamin D ELISA</i>	32

1. INTENDED USE

This ELISA is intended for the quantitative determination of 1,25-dihydroxyvitamin D in serum and plasma. 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-hydroxyvitamin D, is formed in the liver. The hormone 1,25-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin D normally re-adjusts itself to the demands of metabolism. Deviations from the normal range of 1,25-dihydroxyvitamin D must therefore always be interpreted in the context of the remaining parameters of the calcium metabolism. The serum concentration of 1,25-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin D concentration.

Since 1,25-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin D (calcitriol) or the prohormone 1 α -hydroxyvitamin D. In renal tubules, malfunctions decreased or relatively low levels of 1,25-dihydroxyvitamin D (e.g. *diabetes insipidus*, Fanconi syndrome) are found. A non-physiological over-production of 1,25-dihydroxyvitamin D arises in granulomatosis (e.g. sarcoidosis), where extra-renal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D occurs. This can lead to hypercalcaemia. Also in idiopathic hypercalciuria, a relatively high level of 1,25-dihydroxyvitamin D is found. Increased concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin 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

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 2112	PLATE	Microtiter plate, pre-coated	12 x 8 wells
K 0001.C.100	WASHBUF	Wash buffer concentrate, 10x	1 x 100 ml
K 2112	ETHANOL	Ethanol, ready-to-use	1 x 1.5 ml
K 2112	TRIS-HCL	Tris-HCl buffer, ready-to-use	1 x 30 ml
K 2112	AB	Detection antibody, anti 1,25-(OH) ₂ -vitamin D, ready-to-use	1 x 25 ml
K 2112	STD 1-6	Standards, ready-to-use (see specification or label for range)	6 x 2.5 ml
K 2112	CTRL A	Controls, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2.5 ml
K 2112	CTRL B	Controls, ready-to-use (see specification for range)	1 x 2.5 ml
K 2112	CONJ	Conjugate, polyclonal peroxidase-labelled antibody, ready-to-use	1 x 24 ml
K 0002.15	SUB	Substrate (tetramethylbenzidine), ready-to-use	2 x 15 ml
K 0003.15	STOP	Stop solution, ready-to-use	1 x 15 ml
K 2112	FOL	Foil to cover the microtiter plate	2 x 1

For reorders of single components, use the catalogue number followed by the label as product number.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultrapure water*
- 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 mm glass tubes (no plastic)
- Extraction rack (catalog no.: K2221 sv), containing three plastic stands and one nitrogen distributor
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl single-use tips
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Microtiter plate reader at 450 nm (reference wave length 620 or 690 nm)

* Immundiagnostik AG recommends the use of ultrapure water (water type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. STORAGE AND PREPARATION OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 2 times within the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the wash buffer:** The **wash buffer concentrate (WASHBUF)** has to be diluted with ultrapure water **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml ultrapure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the concentrate. Before dilution, the crystals have to be redissolved at room temperature or in a water bath at 37 °C. The **WASHBUF** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Wash buffer** (1:10 diluted WASHBUF) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for 1 month**.
- Care must be taken when **preparing the solvent mixtures** because of the volume contraction:
 1. First, measure the solvents in separate measuring cylinders, then mix in a storage bottle.

2. Use glass storage bottles and glass measuring cylinders; plastic vessels are not suitable.
- **Microtiter strips:** After opening the sealed aluminium packaging, unused strips have to be covered with adhesive foil and stored in the closed aluminium packaging together with desiccant at 2–8 °C. We recommend not to assemble wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch. Opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.
 - All other test reagents are ready-to-use. Test reagents are stable until the expiry date (see label) when stored at **2–8 °C**.

6. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

Sample storage

Freshly collected blood should be centrifuged **within one hour**. Vitamin D is an inert substance. The serum samples can be stored at room temperature. However, **serum** storage at **2–8 °C** is recommended if the analysis is performed within 72 h after collection. Otherwise, the serum samples should be stored at **-20 °C** until analysis.

Avoid repeated freeze-thaw cycles.

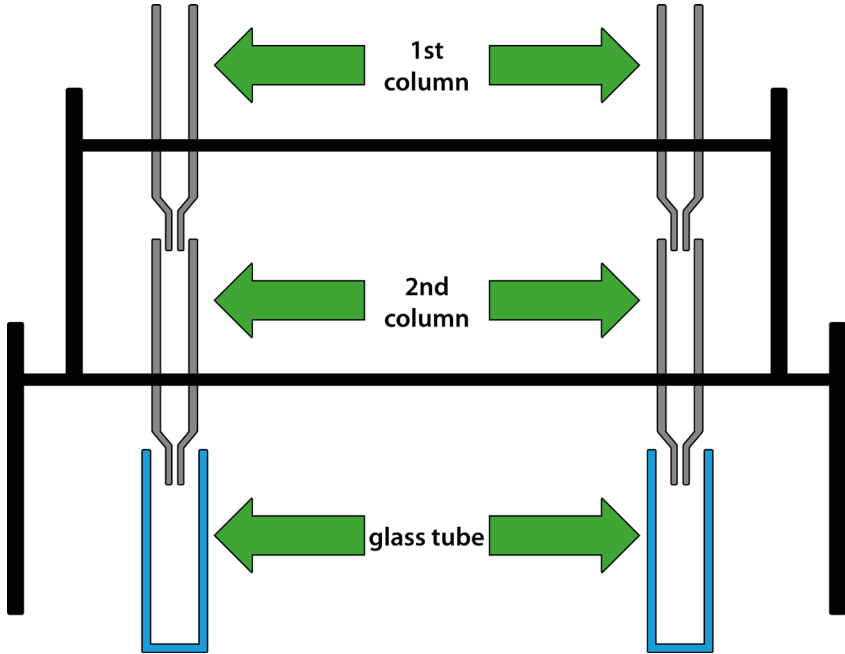
Serum samples can be shipped at **2–8 °C** (e.g. with coolpacks) and remain stable for up to 3 days. If the serum samples are not analysed within this time period, it is recommended to freeze and store them at -20 °C.

Sample preparation

Lipemic or haemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend to carry out the tests in duplicate.

We recommend to apply **1000 µl sample** per cartridge. If the sample volume is less than 1000 µl, load an appropriate amount of Tris-HCl buffer into the column, then add the sample (minimum 500 µl) for a total volume of 1000 µl. To do so, first apply 500 µl of Tris-HCl to the column, allow it to be completely absorbed, and then pipet 500 µl of sample. The obtained results have to be multiplied by the dilution factor used to get the actual concentrations.

Preparation of sample extraction



The extraction unit consists of three parts, which are 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

This assay utilises a competitive enzyme immunoassay (EIA) technique with a selected monoclonal antibody recognizing 1,25-dihydroxyvitamin D.

Standards, controls and 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-dihydroxyvitamin D. During this incubation step, 1,25-dihydroxyvitamin D in the sample and a fixed amount of 1,25-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin 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-dihydroxyvitamin D in the samples is determined from this curve.

Sample extraction

1.	Apply 1000 µl of standards, 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 500 µl sample (results in factor 2 for the sample evaluation).
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).

During steps 3 and 4, ensure that the columns never run dry for longer than 5 min.

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.	After step 4, place the extraction rack unit II with the silica cartridges on the extraction rack unit III with the glass tubes. Note: The glass tubes (extraction rack unit III) should be placed directly under the silica cartridges.

6.	Elute 1,25-dihydroxy vitamin D from the silica cartridges with 2 x 2 ml isopropanol/hexane (25/75 v/v) .
7.	Evaporate the eluate under a nitrogen stream at 37°C or in a vacuum centrifuge.
8.	Before starting the pre-incubations, allow the glass tubes to cool down to room temperature.

Pre-incubation

1.	Add 20 µl of ethanol into each glass tube. Immediately after adding ethanol, gently vortex each tube ~ 1 s to avoid any possible evaporation.
2.	Add 450 µl antibody solution into each glass tube. Mix thoroughly for at least 10 s.
3.	Cover the glass tubes with a plastic film and incubate for exactly 1 hour at room temperature.

Test procedure

Bring all **reagents and samples to room temperature** (18–26°C) and mix well.

Mark the positions of standards/controls/samples on a protocol sheet.

Take as many microtiter strips as needed from the kit. Store unused strips covered and together with the desiccant bag in the closed aluminium packaging at 2–8°C. Strips are stable until expiry date stated on the label.

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Add 200 µl of standards/controls/samples in duplicate into respective well. All these solutions are viscous; pipet slowly and carefully. We recommend to rinse the inside of the pipet tip with the pre-incubate before pipetting it. The transfer of the samples to the microtiter plate should not take longer than 20 minutes.
2.	Cover the plate tightly and incubate for 18–22 hours at 6–10°C* .
3.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
4.	Add 200 µl conjugate (CONJ) into each well.

5.	Cover the plate tightly and incubate for exactly 1 hour at room temperature (18–26 °C) on a horizontal shaker**.
6.	Discard the content of each well and wash 5 times with 250 µl wash buffer . After the final washing step, remove residual wash buffer by firmly tapping the plate on absorbent paper.
7.	Add 200 µl substrate (SUB) into each well. Attention: Mind the time needed for adding the substrate. It should not take longer than 2 min. Adding the stop solution in the next step should span the same time to ensure an identical incubation time with substrate for all samples.
8.	Incubate for 15–25 min *** at room temperature (18–26 °C) in the dark .
9.	Add 50 µl stop solution (STOP) into each well, mix thoroughly. Keep the same pipetting order and time as in step 7.
10.	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 CVs. It is therefore recommended to use always the same incubation time, i. e. 20 hours.

** We recommend shaking the strips at 550 rpm with an orbit of 2 mm.

*** The intensity of the colour change is temperature sensitive. We recommend observing the colour change and stopping the reaction upon good differentiation.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using 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 **standard** must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

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

The plausibility of the duplicate values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the duplicate values should be evaluated manually.

9. LIMITATIONS

Samples with 1,25-dihydroxyvitamin 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 to the pre-buffered chromabond column. Recalculate the results with the appropriate dilution factor, e. g.:

250 µl Tris-HCl + 750 µl sample	results in factor 1.3
500 µl Tris-HCl + 500 µl sample	results in factor 2

Samples with concentrations lower than the analytical sensitivity cannot be quantified clearly.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik AG recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

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

Reference range (plasma or serum)

Babies and children up to 12 years of age:	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 (week 8–42):	values are up to 60% higher than those of adults

The reference range is independent of the season.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay (n = 20)

Sample	1,25-dihydroxy-vitamin D [pg/ml]	CV [%]
1	55,3	6,69

Inter-Assay (n = 20)

Sample	1,25-dihydroxy-vitamin D [pg/ml]	CV [%]
1	39	9

Dilution recovery

Two samples were diluted and analysed. The results are shown below (n = 2)

Sample	Dilution	Expected [pg/ml]	Measured [pg/ml]
A	–	21,2	21,2
	250 µl Puffer + 750 µl Probe	15,9	15,9
	500 µl Puffer + 500 µl Probe	10,6	11,2
	750 µl Puffer + 250 µl Probe	5,3	8,5

Sample	Dilution	Expected [pg/ml]	Measured [pg/ml]
B	–	29,6	29,6
	250 µl Puffer + 750 µl Probe	22,2	27,3
	500 µl Puffer + 500 µl Probe	14,8	16,9
	750 µl Puffer + 250 µl Probe	7,4	7,2

Analytical Sensitivity

The sensitivity was set as B₀ - 2SD. The zero-standard was measured 20 times.

Sample	1,25-dihydroxyvitamin D Mittelwert [OD]	Standard deviation (SD)	Detection limit [pg/ml]
1	1,201	0,025	4,8

Specificity

The specificity was tested by measuring the cross-reactivity against a range of compounds with structural similarity to 1,25-dihydroxyvitamin D. The specificity is calculated in percent:

- 1,25-dihydroxyvitamin D₃ 100%
- 1,25-dihydroxyvitamin₂ 41%
- Vitamin D₂ & D₃ < 0,0 %
- 24,25-dihydroxyvitamin D₃ < 0,1 %
- 25-hydroxyvitamin D₂ < 0,1 %
- 25-hydroxyvitamin D₃ < 0,01 %
- Alfacalcidol < 0,003 %

12. REGENERATION OF THE SILICA CARTRIDGES

The silica cartridges (lower columns) must be regenerated directly after sample extraction as follows:

- 2 x 2 ml methanol
- 2 x 2 ml n-hexan

- Dry the columns under the hood

Please note the following hints:

- Before next use, the silica cartridges have to be dry.
- Up to 5 regeneration cycles are possible.
- Use equally often regenerated columns in the same run.
- Store dried columns in plastic bags with drying agent at room temperature.

13. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Human materials used in kit components were 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.
- Kit reagents contain sodium azide or ProClin as bactericides. Sodium azide and ProClin are toxic. Substrates for the enzymatic colour reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still should be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

14. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch.
- Control samples should be analysed with each run.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated 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.

- Do not mix plugs and caps from different reagents.
- The assay should always be performed according to 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.
- 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 incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be sent to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

16. REFERENCES

General literature












1. Hollis, B.W., 1996. Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcified tissue international*, **58**(1), pp.4–5.
2. Iqbal, S.J. et al., 1996. Possible interference with calcipotriol on new IDS RIA for 1,25-dihydroxyvitamin D. *Clinical chemistry*, **42**(1), pp.112–3.
3. Withold, W. et al., 1995. Evaluation of a radioimmunoassay for determination of calcitriol in human sera employing a 125I-labelled tracer. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, **33**(12), pp.959–63.
4. Hollis, B.W., 1995. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-26,23-lactone interferes in determination of 1,25-dihydroxyvitamin D by RIA after immunoextraction. *Clinical chemistry*, **41**(9), pp.1313–4.
5. Durham, B. et al., 1995. Comparison of the IDS Gamma-B 1,25 dihydroxy vitamin D assay system with the Nichols Institute radioreceptor assay system. In *Proceedings of the ACB National Meeting*. Glasgow, UK: The Association of Clinical Biochemists.

6. Wildermuth, S. et al., 1993. Scintillation proximity assay for calcitriol in serum without high pressure liquid chromatography. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **220**(1), pp.61–70.
7. Armbruster, F. et al., 1990. Extraktion und chromatographische Trennung von 1,25-(OH)₂-Vitamin D aus Serum oder Plasma ohne Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). *Das Ärztliche Laboratorium*, **36**, pp.75–80.
8. Schilling, M., Armbruster, F.P. & Schmidt-Gayk, H., 1987. Rapid, selective separation of 1 alpha, 25-dihydroxy-vitamin D₃ from serum with Extrelut-1 columns. *Clinical chemistry*, **33**(1), p.187.

Literature using Immundiagnostik 1,25-(OH)₂-vitamin D ELISA

9. Zittermann, A. et al., 2011. Vitamin D deficiency is an independent predictor of anemia in end-stage heart failure. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, **100**(9), pp.781–8.
10. Zittermann, A. et al., 2009. Circulating calcitriol concentrations and total mortality. *Clinical chemistry*, **55**(6), pp.1163–70.
11. Zittermann, A. et al., 2009. Vitamin D supplementation enhances the beneficial effects of weight loss on cardiovascular disease risk markers. *The American journal of clinical nutrition*, **89**(5), pp.1321–7.

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by
	Attention		Consult instructions for use
	Consult specification data sheet		