

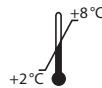
1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂ *ImmuTube*[®] LC-MS/MS Extraktionskit/extraction kit

*Zur Extraktion von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃/D₂
aus Plasma und Serum*

*For the extraction of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂
from plasma and serum*

Gültig ab / Valid from 2015-07-16

REF KM1100



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DES EXTRAKTIONSKIT	3
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	4
5. LAGERUNG DER REAGENZIIEN	4
6. PROBENVORBEREITUNG MITTELS IMMUTUBE®-EXTRAKTION FÜR 50 PROBEN	4
7. TECHNISCHE MERKMALE	5
8. ENTSORGUNG	6
9. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	6
10. LITERATUR	6

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene *ImmuTube*® Extraktionskit dient zur Extraktion von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃/D₂ aus Serum und Plasma und kann zur Probenvorbereitung für LC-MS/MS-Applikationen verwendet werden. 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) sein. Bereits bei leicht eingeschränkter Nierenfunktion kommt es zu einem Abfall der 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Konzentration.

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

Die Behandlung der renalen Osteopathie besteht in der Gabe von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D (Calcitriol) oder des Prohormons 1 α -Hydroxy-Vitamin D. Erniedrigte oder relativ niedrige 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Spiegel findet man bei renalen Tubulusfunktionsstörungen (z.B. Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom). Eine unphysiologische Überproduktion von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D tritt bei granulomatösen Systemerkrankungen (z.B. Sarkoidose) auf, wo eine extrarenale 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Synthese stattfindet. Diese kann zur Hypercalciämie führen. Auch bei der idiopathischen Hypercalciurie findet man relativ hohe 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-

Spiegel. Erhöhte 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Konzentrationen wurden des Weiteren in folgenden Fällen ermittelt: bei Störungen des Vitamin-D-Rezeptors (selten), bei calciumarmer Ernährung, sowie bei Parathormonüberschuss (primärer Hyperparathyreoidismus) und bei manchen Tumorarten (infolge Sekretion von parathormon-ähnlichem Peptid, PTHrP).

Zur Vitamin-D-Supplementierung werden zwei verschiedene Formen kommerziell angeboten: Ergocalciferol (Vitamin D₂) und Cholecalciferol (Vitamin D₃). Offiziell betrachten die Pharmakopöen diese zwei Formen als äquivalent und austauschbar aufgrund von Studien zur Rachitisprävention bei Kindern. Die 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D₃/D₂-Bestimmung dient als Maßstab für den 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Status und liefert objektive, quantitative Information über die biologische Antwort auf die Einnahme von Vitamin-D-Präparaten.

Indikationen

- Nierenfunktionsstörungen
Chronische Niereninsuffizienz
Hämodialyse nach Nierentransplantation
- Renale Osteopathie
- Osteomalazie bei gestörtem Vitamin-D-Metabolismus ausgelöst durch viele verschiedene Erkrankungen
- Nierentubulusfunktionsstörungen (Phosphatdiabetes, Fanconi-Syndrom)
- Überwachung einer Therapie mit aktiven Vitamin-D-Metaboliten
- Ideopathische Hypercalciurie
- Hypercalciämie

3. INHALT DES EXTRAKTIONSKITS

Art.-Nr.	Abkürzung	Kit-Komponenten	Menge
KM1100SI	COLUMNS	<i>ImmuTube</i> ®-Säulen zur Extraktion des 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂ aus der Probe	50 Stück
KM1100ER	ELUREAG	Elutionsreagenz für <i>ImmuTube</i> ®, gebrauchsfertig	20 ml
KM1100WL	WASHSOL	Waschlösung für <i>ImmuTube</i> ®, gebrauchsfertig	80 ml

Außerdem erhältlich bei der Firma Immundiagnostik:

- 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃/D₂ *ImmuTube*®LC-MS/MS Kit (KM1000)
- 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS Tuning Kit (KM1001)
- UPLC Trennsäule (KM1000RP)

- HPLC Trennsäule (KM1001RP)
- sowie alle benötigten Einzelkomponenten für die LC-MS/MS-Analytik zur quantitativen Bestimmung von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃/D₂.

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reagenzgefäße aus Glas, LC-MS/MS-geeignet
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10-1000 µl
- Multipipette
- Zentrifuge, 10 000 g für 1,5-ml-Eppendorfreaktionsgefäße bzw. 550 g für Reagenzgefäße
- Vortex-Mixer
- Vakuumzentrifuge oder Stickstoffverteiler
- Laborübliche Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Überkopfschüttler

5. LAGERUNG DER REAGENZIEN

Alle Reagenzien sind bei 2–8°C zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG MITTELS IMMUTUBE[®]-EXTRAKTION FÜR 50 PROBEN

Als Probe eignet sich Serum und Plasma. Proben müssen vor dem Einsatz zentrifugiert werden (mind. 5 min bei 10 000 g).

Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (15–30°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen.
2.	<i>ImmuTubes</i> [®] vorsichtig vortexen, in einen geeigneten Ständer stellen und sicherstellen, dass die enthaltene Suspension nicht im Deckel verbleibt.
3.	Deckel der <i>ImmuTubes</i> [®] beschriften, öffnen, 500 µl CAL/SAMPLE/CTRL (Kalibrator/Probe/Kontrolle) hineinpipettieren, <i>ImmuTubes</i> [®] verschließen und den Inhalt vorsichtig mischen.

4.	Intensives "Mixing-Rotation" (<i>end-over-end</i> -Rotation) für 1 Std bei Raumtemperatur. Das restliche Trennmaterial auf der Innenseite des Deckels nach unten fließen lassen.
5.	Verschlossene <i>ImmuTubes</i> ® in Plastikreagenzgefäße setzen, 1 min bei 550 g zentrifugieren.
6.	<i>ImmuTubes</i> ® erst den Deckel abschrauben und dann am Auslass öffnen und 2 min bei 550 g bis zum Eintrocknen zentrifugieren. Durchlauf verwerfen.
7.	500 µl WASHSOL in <i>ImmuTubes</i> ® pipettieren und 2 min bei 550 g bis zum Eintrocknen zentrifugieren. Durchlauf verwerfen. Diesen Schritt 2-mal wiederholen.
8.	Frische Glasröhrchen beschriften, <i>ImmuTubes</i> ® in die Glasröhrchen setzen.
9.	250 µl ELUREAG (Elutionsreagenz für <i>ImmuTubes</i> ®) pipettieren, 2 min bei 550 g zentrifugieren und das Eluat mit dem 1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃ /D ₂ in den Glasröhrchen sammeln.
10.	Das Eluat unter Stickstoffstrom bei 37 °C oder in einer Vakuumzentrifuge trocknen.
11.	Den Rückstand in 165 µl einem dem Laufmittel angepassten Lösungsmittel durch 1 min intensives Vortexen lösen; 50 µl in das UPLC-System injizieren, bzw. 100 µl in das HPLC-System..

7. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Die Durchführung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

8. ENTSORGUNG

Elutionsreagenz für *ImmuTube*® (ELUREAG) muss als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

9. 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.
- *ImmuTube*® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.
- 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.

10. LITERATUR

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

Verwendete Symbole:

Temperaturbegrenzung



Bestellnummer

*In-Vitro*-Diagnostikum

Zu verwenden mit



Hersteller

Inhalt ausreichend für <n>
Prüfungen

Chargenbezeichnung



Verwendbar bis

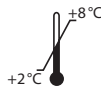
Manual

1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂ *ImmuTube*[®] LC-MS/MS extraction kit

*For the extraction of 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂
from plasma and serum*

Valid from 2015-07-16

REF KM1100



IVD **CE**



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

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

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

Table of Contents

1. INTENDED USE	11
2. INTRODUCTION	11
3. CONTENT OF THE EXTRACTION KIT	12
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	13
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	13
6. SAMPLE PREPARATION WITH IMMUTUBE® EXTRACTION FOR 50 SAMPLES	13
7. TECHNICAL HINTS	14
8. DISPOSAL	14
9. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	14
10. REFERENCES	15

1. INTENDED USE

The described *ImmuTube*® extraction kit is intended for the extraction of 1,25-dihydroxyvitamin D₃/D₂ from serum and plasma and can be used for sample preparation for LC-MS/MS applications. 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 syndrome) 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). Supplemental vitamin D is available in two distinct forms: ergocalciferol (vitamin D₂) and cholecalciferol (vitamin D₃). Pharmacopoeias have officially regarded these two forms as equivalent and interchangeable, based on studies of rickets prevention in infants. The determination of 1,25-dihydroxy vitamin D₃/D₂ as a measure of 1,25-dihydroxy vitamin D status provides an objective, quantitative measure of the biological response to vitamin D administration.

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. CONTENT OF THE EXTRACTION KIT

Cat. No	Label	Kit Components	Quantity
KM1100SI	COLUMNS	<i>ImmuTube</i> ® columns for extraction of 1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃ /D ₂ from the sample	50 Columns
KM1100ER	ELUREAG	Elution reagent for <i>ImmuTube</i> ®, ready to use	20 ml
KM1100WL	WASHSOL	Wash solution for <i>ImmuTube</i> ®	80 ml

In addition, the following products can be purchased from Immundiagnostik AG:

- 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂ *ImmuTube*® LC-MS/MS Kit (KM1000)
- 1,25-(OH)₂-vitamin D₃/D₂ LC-MS/MS Tuning Kit (KM1001)
- UPLC separation column (KM1000RP)
- HPLC separation column (KM1001RP)
- as well as all individual components necessary for LC-MS/MS analysis for quantitative determination of 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃/D₂.

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Glass tubes; LC-MS/MS-suitable
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10–1000 µl
- A repeating dispenser
- Centrifuge capable of 10 000 *g* for 1.5 ml Eppendorf reaction tubes and 550 *g* for glass tubes, respectively
- Vortex mixer
- Vacuum centrifuge or nitrogen distributor
- Standard laboratory disposable plastic reagent vials
- Upside-down shaker

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

All reagents are ready to use. Reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at 2–8 °C.

6. SAMPLE PREPARATION WITH IMMUTUBE[®] EXTRACTION FOR 50 SAMPLES

Serum and plasma samples are suited for the assay. The samples must be centrifuged before use (minimum 5 min at 10 000 *g*).

Control samples should be analyzed with each run.

1.	Prior to use in the assay, allow all samples and reagents to come to room temperature (15–30 °C). Mix well samples and reagents before use.
2.	Vortex carefully <i>ImmuTubes</i> [®] , place in a suitable rack and make sure that no suspension remained on the <i>ImmuTubes</i> [®] cover.
3.	Label the covers of <i>ImmuTubes</i> [®] , open <i>ImmuTubes</i> [®] , add 500 µl of CAL/SAMPLE/CTRL (calibrator/sample/control), close <i>ImmuTubes</i> [®] and mix gently.
4.	“Mix-rotate” (end-over-end rotation) intensively for 1 h at room temperature. Let the remaining separation material on the inner side of the cover flow down.
5.	Insert closed <i>ImmuTubes</i> [®] in plastic reagent vials, centrifuge for 1 min at 550 <i>g</i> .

6.	Open the cover and then the outlet the <i>ImmuTubes</i> ® and centrifuge for 2 min at 550 <i>g</i> to dryness. Discard flow-through.
7.	Add 500 µl of WASHSOL and centrifuge for 2 min at 550 <i>g</i> to dryness. Discard flow-through. Repeat this step twice.
8.	Label fresh glass tubes, place <i>ImmuTubes</i> ® in the labeled glass tubes.
9.	Add 250 µl of ELUREAG (Elution Reagent for <i>ImmuTubes</i> ®), centrifuge for 2 min at 550 <i>g</i> and collect the 1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃ /D ₂ eluates in the glass tubes.
10.	Evaporate the eluate under a nitrogen stream at 37 °C or in a vacuum centrifuge.
11.	Vortex the remainder 1 min in 165 µl of a solvent which is adjusted to the mobile phase; inject 50 µl in the UPLC-System, respectively 100 µl in the HPLC system.

7. 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.
- The sample preparation should always be performed according the enclosed manual.

8. DISPOSAL

The elution reagent for *ImmuTube*® (ELUREAG) must be disposed as non-halogenated solvents.

9. 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.

- *ImmuTube*® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- 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.

10. REFERENCES

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

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		To be used with
	Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Lot number		Use by