



1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

KIP1929

LOT : 140108/2

Read entire protocol before use.

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human 1,25(OH)₂-Vitamin D (1,25(OH)₂-Vit.D) in serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP1929 : 48 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activities

Vitamin D₃ is mainly synthesized in the skin from 7- dehydrocholesterol and is partially from dietary origin. In the liver, Vitamin D₃ is hydroxylated on carbon 25 to produce the obligatory intermediate 25-OH-D₃. 25-OH-D₃ must be metabolized further before it can carry out the functions of Vitamin D on intestine, kidney and bone. This subsequent reaction takes place exclusively in the kidney in the non-pregnant mammal. Thus 25-OH-D₃ is further hydroxylated in the 1 α -position to produce 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25-(OH)₂D₃).

In addition to renal tissue, placenta of pregnant women and macrophage cells in case of sarcoidosis can also produce some amount of 1 α ,25-(OH)₂D₃. 1 α ,25-(OH)₂D₃ is the active form of Vitamin D with regard to the known functions whereas 25-OH-D₃ and Vitamin D₃ itself can be excluded as being physiologically functional. Furthermore since 1 α ,25-(OH)₂D₃ is produced in the kidney and has some of its functions in the bone and intestine, it must be considered as a hormone. This hormone stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus. It also stimulates bone resorption and mineralization thereby preventing the development of rickets and osteomalacia.

1 α ,25-(OH)₂D₃ might also be active in other tissues responsible for Calcium transport (placenta, kidney, mammary gland, ...) and endocrine glands such as parathyroid glands. 1 α ,25-(OH)₂D₃ is rapidly metabolized and its lifetime is approximately 2-4 h in plasma. Its main metabolite is calcitroic acid, a C-23 carboxylic derivative essentially without any biological activity. In addition to this pathway, 1 α ,25-(OH)₂D₃ undergoes 24-hydroxylation to produce 1,24,25-trihydroxy-Vitamin D₃. This compound has less biological activity than its parent and this metabolism is considered as a minor pathway.

The levels of 1 α ,25-(OH)₂D₃ in plasma or serum is 100 to 1000 less than that of 25-OH-D₃. Due to its low concentrations and the presence of many similar metabolites, the measurement of 1 α ,25-(OH)₂D₃ requires extraction and separation either by HPLC or by column chromatography.


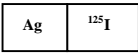
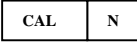





B. Clinical application

The measurement of circulating 1 α ,25-(OH)₂D₃ is indicated in several disorders affecting calcium metabolism such as : sarcoidosis, renal failure, hyper and hypo-parathyroidism, rickets, tumor-associated hypercalcemia, Vitamin-resistant dysfunction and treatment with anti-convulsive medication.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

Only samples and controls, not the calibrators, are extracted with a mix of solvents and applied on cartridges to separate 1,25(OH)₂ Vitamin-D from other Vitamin-D metabolites. After elution of samples and controls, the calibrators, samples and controls are incubated in coated tubes. A fixed amount of ¹²⁵I labelled 1,25(OH)₂ Vitamin D competes with the 1,25(OH)₂ Vitamin D to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites immobilized on the wall of a polystyrene tube. After an overnight incubation at room temperature, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with washing solution and aspirated. A calibration curve is plotted and the 1,25(OH)₂ Vitamin D concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

| Reagents | 48 Test Kit | Colour Code | Reconstitution |
|--|---------------------------|-------------|--|
|  Tubes coated with anti 1,25(OH) ₂ -Vitamin D | 1 x 48 | green | Ready for use |
|  TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled 1,25(OH) ₂ -Vitamin D (HPLC grade) in phosphate buffer with bovine casein and gentamycin. | 1 vial lyophilised 75 kBq | red | Add 26 ml reconstitution solution |
|  Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with bovine casein and gentamycin | 5 vials lyophilised | yellow | Add 2 ml elution solution |
|  Wash solution (TRIS-HCl) | 1 vial 10 ml | brown | Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer). |
|  Controls - N = 1 or 2 in human plasma with gentamycin | 2 vials lyophilised | silver | Add 2 ml distilled water |
|  Reconstitution Solution: phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%) | 1 vial 30 ml | black | Ready for use |
|  Elution Solution: phosphate buffer with bovine casein, methanol and azide (<0.1%) | 1 vial 30 ml | green | Ready for use |
|  Bond Elut Silica cartridges | 20 | | Store at R.T. |

Note : Use elution solution for calibrator 0 and for dilution of samples with values above the highest calibrator (dilute after separation step).

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- 1 Distilled water
- 2 Diisopropylether (p.a.)
- 3 Cyclohexane (p.a.)
- 4 Ethyl acetate (p.a.)
- 5 Ethanol absolute (p.a.)
- 6 Dichloromethane (p.a.)

NB: A DIsource extraction kit containing all these solvents is available under reference: 3019700. This kit contains quantities of solvents necessary to run 5 x 48 tests of 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT.

- 7 Pipettes for delivery of: 200 µl, 500 µl, 1 ml and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- 8 Glass tubes (12 x 75 mm) for extraction and for elution. (closed with a cap for the extraction step)
- 9 Glass tubes (16 x 100 mm) or (12 x 120 mm), or polypropylene tubes (falcon 2097), for the washing of the cartridges.

- 10 Vortex mixer
- 11 Magnetic stirrer
- 12 Centrifuge operating at 800 g.
- 13 Tube shaker (1200 rpm)
- 14 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- 15 Aspiration system (optional)
- 16 Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 2 ml elution solution (**just before the incubation step**).
- Controls:** Reconstitute the controls with 2 ml distilled water.
- I¹²⁵ 1,25(OH)₂-Vitamin.D :** Reconstitute with 26 ml of reconstitution solution.
- Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- Extraction solvent :** 2 ml for each control or sample to be tested, are needed. **Prepare a fresh solution** of diisopropylether, cyclohexane, ethyl acetate, (50, 40, 10 v/v).
- Washing solvent :** 1 ml for each control or sample to be tested, are needed. **Prepare a fresh solution** of diisopropylether, cyclohexane, ethyl acetate, ethanol absolute (50, 40, 10, 1 v/v).

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C; except the cartridges which must be stored at room temperature.
- The calibrators and controls are very unstable, use them immediately after reconstitution, freeze immediately in aliquots and keep them at - 20°C for 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- **Use freshly prepared extraction solvent and washing solvent, do not store them.**
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum and plasma samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, storage in aliquots, at - 20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- After thawing, the samples should be vortexed and centrifuged.
- Serum or plasma (EDTA and heparin) provides similar results.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

- Do not use the kit or components beyond expiry date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Bring all the reagents to room temperature prior to use.
- Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.
- Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.
- Respect the incubation times.
- Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

I. Extraction step : ! Only for controls and samples.

1. Label glass tubes (12x75 mm) for extraction: 2 controls and up to 16 samples.
2. Add 0.5 ml control or sample in the respective tubes.
3. Dispense 2 ml extraction solvent in each tube.
4. Tubes are closed with a cap and placed on a shaker for 1 hour at 1200 rpm.
5. Centrifuge each tube for 5 minutes at room temperature (at 800 g).
6. Supernatants are needed for the next step of separation.

II. Separation step : ! Only for controls and samples

1. Label glass tubes (16 x 100 mm) or (12 x 120 mm), or polypropylene tubes (falcon 2097), for washing cartridges: 2 controls and up to 16 samples.
2. Put one "Bond Elut" cartridge in each tube.

- Apply 1.6 ml of supernatant (2 x 0.8 ml), obtained after extraction step, on cartridge.
- Then, wash cartridges with 1 ml washing solvent (cfr reagent preparation). ! Be careful never apply vacuum on cartridges, just let solvent draw by gravity.
- Add 300 µl dichloromethane on each cartridge, let draw by gravity.
- Add 300 µl of distilled water on each cartridge.
- Centrifuge each tube for 5 minutes at room temperature (at 800 g).
- Label glass tubes (12 x 75 mm) for elution of 1,25(OH)₂-Vitamin D. After centrifugation, transfer cartridges in the corresponding glass tubes.
- Apply 400 µl elution solution on each cartridge to elute 1,25 (OH)₂-Vitamin D and centrifuge 5 minutes at room temperature (at 800 g).
- Vortex** the eluted fraction.

Note : After this step, samples must be incubated in coated tubes as soon as possible to avoid degradation.

III. Incubation step :

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
- Briefly vortex calibrators (use elution solution as zero calibrator), extracted controls and samples and dispense 150 µl of each into the respective tubes.
- Dispense 500 µl of ¹²⁵Iodine labelled 1,25(OH)₂-Vitamin D into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate overnight at room temperature
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
- Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
- After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of the 1,25(OH)₂-Vitamin D concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
- Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample (B/B₀ (%)) values, determine the 1,25(OH)₂-Vitamin D concentrations of the samples from the calibration curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 1,25(OH)₂-Vitamin D (B₀/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

| 1,25(OH) ₂ -Vitamin D | cpm | B/Bo (%) |
|----------------------------------|-------|----------|
| Total count | 43937 | |
| Calibrator | | |
| 0.0 pg/ml | 16687 | 100.0 |
| 6.0 pg/ml | 15268 | 91.5 |
| 20.0 pg/ml | 12345 | 74.0 |
| 63.0 pg/ml | 8033 | 48.1 |
| 230.0 pg/ml | 3554 | 21.3 |
| 430.0 pg/ml | 2148 | 12.9 |

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was **1.4 pg/ml**.

B. Specificity

The percentage of cross-reaction estimated by comparison of the concentration yielding a 50% inhibition are respectively:

| Compound | Cross-Reactivity (%) |
|------------------------------------|----------------------|
| 1,25(OH) ₂ -Vitamin.D3 | 100 |
| 1,25(OH) ₂ -Vitamin.D2 | 92.31 |
| 25OH-Vitamin-D3 | 0.001 |
| 24,25(OH) ₂ -Vitamin.D3 | 0.005 |
| 25,26(OH) ₂ -Vitamin.D3 | 0.20 |

Note: this table shows the cross-reactivity for the anti 1,25(OH)₂-Vitamin D

The assay performance is not affected by hemolysis (5 g/L hemogl obin tested), bilirubinemia (1 g/L bilirubin tested) or triglycerides (2.5 g/L tested). Ascorbic acid (Vitamin C)(1g/L tested) and bilirubin conjugate (1g/L tested) don't interfere with this assay.

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

| Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
|-------|----|------------------|--------|-------|----|------------------|--------|
| A | 20 | 24.6 ± 1.7 | 7.1 | A | 10 | 13.6 ± 1.7 | 12.7 |
| B | 20 | 78.6 ± 3.9 | 5.0 | B | 10 | 32.3 ± 3.6 | 11.3 |

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

7. D. Accuracy

DILUTION TEST

| Sample dilution | Theoretical cent. (pg/ml) | Measured cent. (pg/ml) | Recovery (%) |
|-----------------|---------------------------|------------------------|--------------|
| 1/1 | 70.0 | 70.0 | 100% |
| 1/2 | 35.0 | 35.7 | 102% |
| 1/4 | 17.5 | 14.5 | 83% |
| 1/8 | 8.8 | 7.8 | 89% |
| 1/16 | 4.4 | 4.6 | 105% |

The sample was diluted with Elution solution.

RECOVERY TEST

| Added 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Measured 1,25(OH) ₂ Vit.D concentrations Total (pg/ml) | Blanked (pg/ml) | Recovery (%) |
|--|---|-----------------|--------------|
| 0.0 | 22.5 | | |
| 25.0 | 46.3 | 23.8 | 95.2% |
| 50.0 | 70.0 | 47.5 | 95.0% |
| 100.0 | 122.7 | 100.2 | 100.2% |
| Added 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Measured 1,25(OH) ₂ Vit.D concentrations Total (pg/ml) | Blanked (pg/ml) | Recovery (%) |
| 0.0 | 22.5 | | |
| 25.0 | 52.1 | 29.6 | 118.4% |
| 50.0 | 70.4 | 47.9 | 95.8% |
| 100.0 | 112.9 | 90.4 | 90.4% |

Conversion factor :

From pg/ml to pmol/L : x 2.4
From pmol/L to pg/ml : x 0.42

To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

The observed ranges are based on 2.5% to 97.5% percentiles.

| Population | Range (pg/ml) | Mean | SD | n |
|-----------------|---------------|------|------|----|
| Normal subjects | 19.6 – 54.3 | 35.3 | 10.6 | 51 |

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79

4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

| | TOTAL COUNTS μ l | CALIBRATORS μ l | SAMPLE (S) CONTROLES μ l |
|----------------------------------|--|------------------------|---------------------------------|
| EXTRACTION | | | |
| Calibrators | - | - | - |
| Samples / Controls | - | - | 500 |
| Extraction solvent | - | - | 2000 |
| Shaking | 1 hour at 1200 rpm | | |
| Centrifugation | 5 minutes at 800 g | | |
| SEPARATION | | | |
| Supernatant from extraction step | - | - | 1600 |
| CARTRIDGE | | | |
| Supernatant | 1600 μ l | | |
| Washing Solvent | 1000 μ l | | |
| Dichloromethane | 300 μ l | | |
| Distilled water | 300 μ l | | |
| Centrifugation | 5 minutes at 800 g | | |
| Elution solution | 400 μ l | | |
| Centrifugation | 5 minutes at 800 g | | |
| | Vortex | | |
| INCUBATION | | | |
| Calibrators | - | 150 | - |
| Extracted samples | - | - | 150 |
| Tracer | 500 | 500 | 500 |
| Incubation | Overnight at R.T. | | |
| Separation | - | Aspirate (or decant) | |
| Washing Solution | - | 2 ml | |
| Separation | - | Aspirate (or decant) | |
| Washing Solution | - | 2 ml | |
| Separation | - | Aspirate (or decant) | |
| Counting | Count tubes for 60 seconds in a gamma counter. | | |

| | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogue Nr : KIP1929 | P.I. Number : 1700602/en | Revision nr : 140108/1 |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|

Revision date : 2014-01-08

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 1,25(OH)₂-Vitamine D (1,25(OH)₂-Vit.D) dans le sérum et le plasma humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT Kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1929 : 48 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

La vitamine D₃ est synthétisée principalement dans la peau à partir du 7-déhydrocholestérol et celle d'origine diététique est hydroxylée sur le carbone 25 dans le foie principalement, pour produire l'intermédiaire obligatoire 25-OH-D₃. La 25-OH-D₃ doit être encore métabolisée avant qu'elle puisse effectuer les fonctions de la vitamine D dans l'intestin, les reins et os. Cette réaction a lieu exclusivement dans les reins de mammifères non enceintes. Ainsi la 25-OH-D₃ est encore hydroxylée en position 1 α pour produire la 1 α ,25 dihydroxyvitamine D₃ (1 α , 25-(OH)2D₃). En plus du tissu rénal, le placenta des femmes enceintes et les cellules de macrophage en cas de sarcoïdose peuvent également produire une certaine quantité de 1 α , 25-(OH)2D₃.

La 1 α , 25-(OH)2D₃ est la forme active de la vitamine D en ce qui concerne les fonctions connues, tandis que la 25-OH-D₃ et la vitamine D₃ elles-mêmes ne sont pas considérées comme physiologiquement fonctionnelles. De plus, comme la 1 α , 25-(OH)2D₃ est produite dans les reins et agit dans les os et l'intestin, elle doit être considérée comme une hormone. Cette hormone stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Elle stimule également la résorption et la minéralisation des os, empêchant de ce fait le développement du rachitisme et d'ostéomalacie. La 1 α , 25-(OH)2D₃ pourrait également être en activité dans d'autres tissus responsables du transport de calcium (placenta, rein, glande mammaire, etc...) et glandes d'endocrine telles que les glandes parathyroïdes. La 1 α , 25-(OH)2D₃ est rapidement métabolisée et sa vie est approximativement de 2-4 h dans le plasma. Son métabolite principal est l'acide de calcitroïde, un dérivé carboxylique C-23, sans activité biologique essentielle.

En plus de cette voie, la 1 α , 25-(OH)2D₃ subit une 24-hydroxylation pour produire la 1,24,25-trihydroxy-vitamine D₃. Ce composé a une activité biologique moins importante que son ascendant et est considéré comme voie mineure. Les niveaux en 1 α , 25-(OH)2D₃ plasma ou sérum étant 100 à 1000 moins que concentré que la 25-OH-D₃ et dû à la présence de beaucoup de métabolites semblables, le dosage de la 1 α ,25-(OH)2D₃ exige une extraction et séparation par HPLC ou par chromatographie sur cartouche.


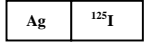
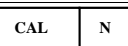
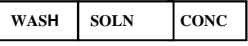
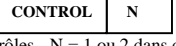
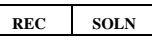

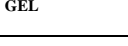
B. Application clinique

Le dosage de la 1 α , 25-(OH)2D₃ circulante est indiquée dans plusieurs désordres affectant le métabolisme calcique comme: sarcoïdose, insuffisance rénale, hyper et hypo-parathyroïdisme, rachitisme, tumeur associée à une hypercalcémie, dysfonctionnement vitamino-résistant et traitement avec médication anti-convulsive.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Uniquement les échantillons et contrôles sont extraits, pas les étalons, avec un mélange de solvants et sont appliqués sur les cartouches pour séparer la 1,25-(OH)₂ vitamine D des autres métabolites de la vitamine D. Après l'éluion des échantillons et contrôles, les étalons, échantillons et contrôles sont incubés dans des tubes coâtés. Une quantité fixe l'1,25(OH)₂ Vitamin-D marquée à l'¹²⁵I est en compétition avec l'1,25(OH)₂ Vitamin-D à mesurer et présent dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Après une nuit d'incubation à température ambiante, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec la Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en 1,25(OH)₂ Vitamin-D des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

| Réactifs | 48Tests | Code couleur | Reconstitution |
|---|----------------------------|--------------|--|
|  Tubes recouverts avec l'anti 1,25(OH) ₂ Vitamin-D | 1 x 48 | Vert | Prêt à l'emploi |
|  TRACEUR: 1,25(OH) ₂ Vitamin-D marquée à l' ¹²⁵ Iodine (grade HPLC) dans un tampon phosphate avec de la caséine bovine et de la gentamicine | 1 flacon lyophilisé 75 kBq | Rouge | Ajouter 26 ml de la solution de reconstitution |
|  Calibrateurs 1,25(OH) ₂ Vitamin-D - N = 1 à 5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans un tampon phosphate avec de la caséine bovine et de la gentamicine | 5 flacons Lyophilisés | Jaune | Ajouter 2 ml de Solution d'Elution |
|  Solution de lavage (TRIS-HCl) | 1 flacon 10 ml | Brun | Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique). |
|  Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et de la gentamicine | 2 flacons Lyophilisés | Gris | Ajouter 2 ml d'eau distillée |
|  Solution de Reconstitution: un tampon phosphate avec de la caséine bovine et de l'azide de sodium (<0,1%) | 1 flacon 30 ml | noir | Prêt à l'emploi |
|  Solution d'Elution: un tampon phosphate avec de la caséine bovine, du méthanol et de l'azide de sodium (<0,1%) | 1 flacon 30 ml | vert | Prêt à l'emploi |
|  Cartouches Bond Elut Silica | 20 | | Garder à T.A. |

Note : Utiliser la solution d'éluion comme calibrateur 0 et pour la dilution des échantillons avec des valeurs au-dessus du calibrateur le plus élevé (diluer après la phase de séparation).

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée
2. Di-isopropyléther. (p.a.)
3. Cyclohexane. (p.a.)
4. Ethylacetate. (p.a.)
5. Ethanol absolu. (p.a.)
6. Dichlorométhane (p.a.)

DiaSource dispose d'une trousse d'extraction contenant tous ces solvants, sous la référence 3019700. La quantité des solvants de la trousse est suffisante pour réaliser 5 x 48 analyses 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT.

7. Pipettes pour distribuer: 200 µl, 500 µl, 1 ml et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)

8. Tubes en verre (12 x 75 mm) pour l'extraction et l'éluion (fermés par un bouchon pour la phase d'extraction)
9. Tubes en verre (16 x 100 mm) ou (12 x 120 mm), ou tubes propylènes (falcon 2097), pour le lavage des cartouches.
10. Agitateur vortex
11. Agitateur magnétique
12. Centrifugeuse adaptée pour 800 g.
13. Agitateur de tubes (1200 rpm)
14. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
15. Système d'aspiration
16. Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs:** Reconstituer les calibrateurs avec 2 ml de Solution d'Elution (**immédiatement avant la phase d'incubation**).
- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 2 ml d'eau distillée.
- I¹²⁵ 1,25(OH)₂-Vitamine.D :** Reconstituer avec 26 ml de la solution de reconstitution.
- Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.
- Solvant d'extraction:** on a besoin de 2 ml pour chaque contrôle ou échantillon à tester. **Préparer une fraîche solution** de di-isopropyléther, cyclohexane, ethylacetate, (50, 40, 10 v/v).
- Solvant de lavage :** on a besoin de 1 ml pour chaque contrôle ou échantillon à tester. **Préparer une fraîche solution** de di-isopropyléther, cyclohexane, ethylacetate, éthanol absolu (50, 40,10, 1 v/v).

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C; sauf les cartouches qui doivent être gardées à température ambiante.
- Les calibrateurs et les contrôles sont très instables, utilisez-les immédiatement après la reconstitution, congelez-les immédiatement dans des aliquots et garder-les à -20°C pendant 3 mois. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Utiliser un solvant d'extraction et de lavage fraîchement préparés, ne pas les stocker.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum ou de plasma doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Après la décongélation, les échantillons doivent être vortexés et centrifugés.
- Le sérum ou le plasma (héparine ou EDTA) donne des résultats similaires.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- Phase d'extraction :** ! **Seulement pour les contrôles et les échantillons.**
 1. Identifier les tubes en verre (12x75 mm) pour l'extraction: 2 contrôles et jusqu'à 16 échantillons.
 2. Ajouter 0.5 ml du contrôle ou de l'échantillon dans les tubes respectifs.

3. Dispenser 2 ml du solvant d'extraction dans chaque tube.
4. Les tubes sont fermés par un bouchon et mis sur un agitateur pendant 1 heure à 1200 rpm.
5. Centrifuger chaque tube pendant 5 minutes à température ambiante (à 800 g).
6. Les surnageants sont nécessaires pour la phase prochaine de la séparation.

II. Phase de séparation : ! Seulement pour les contrôles et les échantillons

1. Identifier les tubes en verre (16 x 100 mm) ou (12 x 120 mm), ou tubes propylènes (falcon 2097) pour le lavage des cartouches : 2 contrôles et jusqu'à 16 échantillons.
2. Disposer une cartouche "Bond Elut" dans chaque tube.
3. Appliquer 1,6 ml du surnageant (2 x 0,8 ml), obtenu après la phase d'extraction, sur la cartouche.
4. Puis laver les cartouches avec 1 ml du solvant de lavage (voir préparation des réactifs). ! Attention : ne jamais appliquer le vide sur les cartouches, juste laisser le solvant passer par gravité.
5. Ajouter 300 µl de dichlorométhane à chaque cartouche, laisser couler par gravité.
6. Ajouter 300 µl d'eau distillée à chaque cartouche.
7. Centrifuger chaque tube pendant 5 minutes à température ambiante (à 800 g).
8. Identifier les tubes en verre (12 x 75 mm) pour l'élution de la 1,25(OH)₂-Vitamine D. Après la centrifugation, transférer les cartouches aux tubes en verre appropriés.
9. Appliquer 400 µl de solution d'élution sur chaque cartouche pour l'élution de la 1,25 (OH)₂-Vitamine D et centrifuger 5 minutes à température ambiante (à 800 g).
10. **Vortexer**

Note : Après cette phase, les échantillons doivent être incubés dans des tubes recouverts le plus vite possible afin d'éviter une dégradation.

III. Phase d'incubation :

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs (utiliser la solution d'élution comme calibrateur 0), les échantillons extraits et les contrôles. Puis distribuer 150 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3. Distribuer 0,5 ml de 1,25(OH)₂ Vitamin-D marquée à l'¹²⁵Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
4. Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
5. Incuber pendant une nuit à température ambiante.
6. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
7. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
8. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
9. Laver les tubes à nouveau avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer.
10. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
11. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

3. Utiliser un "3 cycle semi-logarithmic" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B₀(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en 1,25(OH)₂ Vitamin-D, écarter les valeurs aberrantes.
4. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B₀(%)) détermine les concentrations en 1,25(OH)₂ Vitamin-D à partir de la courbe de calibration.
6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 1,25(OH)₂ Vitamin-D non marquée (B₀/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

| 1,25(OH) ₂ VITAMIN-D | | cpm | B/Bo (%) |
|---------------------------------|-------------|-------|----------|
| Activité totale | | 43937 | |
| Calibrateur | 0,0 pg/ml | 16687 | 100,0 |
| | 6,0 pg/ml | 15268 | 91,5 |
| | 20,0 pg/ml | 12345 | 74,0 |
| | 63,0 pg/ml | 8033 | 48,1 |
| | 230,0 pg/ml | 3554 | 21,3 |
| | 430,0 pg/ml | 2148 | 12,9 |

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 1,4 pg/ml.

B. Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par la comparaison de la concentration (indiquant une inhibition de 50 %) est respectivement :

| Composé | Réactivité Croisée (%) |
|-------------------------------------|------------------------|
| 1,25(OH) ₂ -Vitamine.D3 | 100 |
| 1,25(OH) ₂ -Vitamine.D2 | 92,31 |
| 25OH-Vitamine-D3 | 0,001 |
| 24,25(OH) ₂ -Vitamine.D3 | 0,005 |
| 25,26(OH) ₂ -Vitamine.D3 | 0,20 |

Note : cette table montre la réactivité croisée pour l'anti-1,25(OH)₂ Vitamin-D

La performance de l'essai n'est pas affectée par l'hémolyse (5 g/L d'hémoglobine a été testé), la bilirubinémie (1 g/L de bilirubine a été testé) ou les triglycérides (2,5 g/L a été testé). L'acide ascorbique (vitamine C) (1 g/L a été testé) et la bilirubine conjuguée (1 g/L a été testé) n'interfèrent pas avec cet essai.

C. Précision

INTRA-ESSAI

INTER-ESSAI

| Sérum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Sérum | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
|-------|----|------------------|--------|-------|----|------------------|--------|
| A | 20 | 24,6 ± 1,7 | 7,1 | A | 10 | 13,6 ± 1,7 | 12,7 |
| B | 20 | 78,6 ± 3,9 | 5,0 | B | 10 | 32,3 ± 3,6 | 11,3 |

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

| Dilution de l'échantillon | Concentration théorique (pg/ml) | Concentration mesurée (pg/ml) | Récupération (%) |
|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------|------------------|
| 1/1 | 70,0 | 70,0 | 100% |
| 1/2 | 35,0 | 35,7 | 102% |
| 1/4 | 17,5 | 14,5 | 83% |
| 1/8 | 8,8 | 7,8 | 89% |
| 1/16 | 4,4 | 4,6 | 105% |

L'échantillon a été dilué avec la Solution d'élution.

TEST DE RECUPERATION

| 1,25(OH)2-Vit.D ajoutée (pg/ml) | Concentrations en 1,25(OH)2 Vit.D mesurées | | Récupération (%) |
|---------------------------------------|---|---------------------|---------------------|
| | Total (pg/ml) | Récupéré (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 46,3 | 23,8 | 95,2% |
| 50,0 | 70,0 | 47,5 | 95,0% |
| 100,0 | 122,7 | 100,2 | 100,2% |

| 1,25(OH)2-Vit.D ajoutée (pg/ml) | Concentrations en 1,25(OH)2 Vit.D mesurées | | Récupération (%) |
|---------------------------------------|---|---------------------|---------------------|
| | Total (pg/ml) | Récupéré (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 52,1 | 29,6 | 118,4% |
| 50,0 | 70,4 | 47,9 | 95,8% |
| 100,0 | 112,9 | 90,4 | 90,4% |

Facteur de conversion :

De pg/ml à pmol/L : x 2,4
De pmol/L à pg/ml : x 0,42

A notre connaissance, aucun matériel de référence internationale n'existe pour ce paramètre.

XIV. CÔNTRÔLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôlés, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicat des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

La portée observée est basée sur des pourcentages de 2,5% à 97,5%.

| Population | Portée (pg/ml) | Moyenne | SD | n |
|----------------|-------------------|---------|------|----|
| Sujets normaux | 19,6 – 54,3 | 35,3 | 10,6 | 51 |

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux. Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettent pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner

des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

| | ACTIVITE TOTALE (µl) | CALIBRA TEURS (µl) | ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl) |
|--|---|--------------------------|-------------------------------------|
| EXTRACTION | | | |
| Calibrateurs | - | - | - |
| Echantillons, contrôles | - | - | 500 |
| Solvant d'Extraction | - | - | 2000 |
| Agitation | 1 heure à 1200 rpm | | |
| Centrifugation | 5 minutes à 800 g | | |
| SEPARATION | | | |
| Surnageant de la phase d'extraction | - | - | 1600 |
| CARTOUCHE | | | |
| Surnageant | | 1600 µl | |
| Solvant de lavage | | 1000 µl | |
| Dichlorométhane | | 300 µl | |
| Eau distillée | | 300 µl | |
| Centrifugation | | 5 minutes à 800 g | |
| Solution d'élution | | 400 µl | |
| Centrifugation | | 5 minutes à 800 g | |
| | | Vortex | |
| INCUBATION | | | |
| Calibrateurs | - | 150 | - |
| Echantillons extraits | - | - | 150 |
| Traceur | 500 | 500 | 500 |
| Incubation | une nuit à température ambiante | | |
| Séparation | - | aspiration (ou décanter) | |
| Solution de Lavage | - | 2 ml | |
| Séparation | - | aspiration (ou décanter) | |
| Solution de Lavage | - | 2 ml | |
| Séparation | - | aspiration (ou décanter) | |
| Comptage (radioactivité) | Temps de comptage des tubes : 60 secondes | | |

| | | |
|--|-------------------------------|----------------------------------|
| Numéro de catalogue DIAsource : KIP1929 | Numéro de P.I.: 1700602/fr | Numéro de révision : 140108/1 |
|--|-------------------------------|----------------------------------|

Lees het hele protocol vóór gebruik.

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunoassay voor de kwantitatieve bepaling *in vitro* van menselijke 1,25(OH)₂-Vitamine D (1,25(OH)₂-Vit.D) in serum en plasma.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk:** DIASource 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT Kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1929 : 48 testen
- C. **Geproduceerd door:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie

kunt u contact opnemen met :

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Biologische activiteiten

Vitamine D₃ wordt vooral gesynthetiseerd in de huid van 7- dehydrocholesterol en vindt zijn oorsprong gedeeltelijk in het dieet. In de lever wordt Vitamine D₃ gehydroxyleerd op koolstof 25 om de verplichte tussenstap 25-OH-D₃ te produceren. 25-OH-D₃ moet verder gemetaboliseerd worden voor het de functies van Vitamine D op de darm, de nier en de beenderen kan uitoefenen. Deze volgende reactie vindt enkel plaats in de nier van een niet zwanger zoogdier. Zo wordt 25-OH-D₃ verder gehydroxyleerd in de 1 α -positie om 1 α ,25 dihydroxyvitamine D₃ (1 α ,25-(OH)₂D₃) te produceren.

Naast het nierweefsel kunnen ook de placenta van zwangere vrouwen en macrofage cellen in geval van sarcoïden een hoeveelheid 1 α ,25-(OH)₂D₃ produceren. 1 α ,25-(OH)₂D₃ is de actieve vorm van Vitamine D in verband met de gekende functies waarvan 25-OH-D₃ en Vitamine D₃ zelf kunnen worden uitgesloten als zijnde fysiologisch functioneel. Daarenboven, gezien 1 α ,25-(OH)₂D₃ geproduceerd wordt in de nier en enkele van zijn functies in de beenderen en de darm heeft, moet het beschouwd worden als een hormoon. Dit hormoon stimuleert de intestinale absorptie van zowel calcium als fosfor. Het stimuleert ook de beenderresorptie en -mineralisatie en voorkomt zo de ontwikkeling van rachitis en osteomalacie.

1 α ,25-(OH)₂D₃ kan ook actief zijn in andere weefsels verantwoordelijk voor calciumtransport (placenta, nier, borstklier, ...) en endocriene klieren zoals de bijnier. 1 α ,25-(OH)₂D₃ wordt snel gemetaboliseerd en zijn levensduur is ongeveer 2-4 h in plasma. Zijn voornaamste metaboliet is calcitriol, een C-23 carboxyl derivaat hoofdzakelijk zonder enige biologische activiteit. Naast deze pathway, ondergaat 1 α ,25-(OH)₂D₃ een 24-hydroxylatie om 1,24,25-trihydroxy-Vitamine D₃ te produceren. Deze component heeft minder biologische activiteit dan zijn voorganger en zijn metabolisme wordt beschouwd als een mindere pathway.

De gehalten van 1 α ,25-(OH)₂D₃ in plasma of serum zijn 100 tot 1000 minder dan die van 25-OH-D₃. Door zijn lage concentraties en de aanwezigheid van vele gelijkaardige metaboliëten, vraagt de meting van 1 α ,25-(OH)₂D₃ extractie en scheiding ofwel door HPLC ofwel door patroonchromatografie.


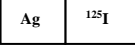

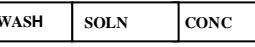
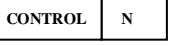
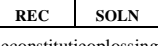
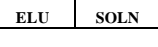
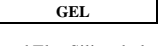
B. Klinische toepassing

De meting van circulerend 1 α ,25-(OH)₂D₃ wordt aangewezen bij verschillende kwalen die het calciummetabolisme aantasten zoals : sarcoïdose, nierinsufficiëntie, hyper en hypo-parathyroïdisme, rachitis, tumor- geassocieerde hypercalcemie, Vitamine-resistente disfunctie en behandeling met anti-convulsieve medicatie.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Enkel de monsters en de controles, niet de kalibrators, worden geëxtraheerd met een mengeling van solventen en toegepast op patronen om 1,25(OH)₂ Vitamine-D van andere Vitamine-D metabolieten te scheiden. Na elutie van de monsters en de controles worden de kalibrators, de monsters en de controles geïncubeerd in gecoatete buisjes. Een vaste hoeveelheid ¹²⁵I gelabeld 1,25(OH)₂ Vitamin-D concurreert met 1,25(OH)₂ Vitamin-D dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een overnacht incubatie bij kamertemperatuur, wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 2 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van 1,25(OH)₂ Vitamin-D van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

V. GELEVERDE REAGENTIA

| Reagens | Kit voor 48 testen | Kleur-code | Reconstitutie |
|---|--------------------------------|------------|--|
|  Buisjes gecoat met anti 1,25(OH) ₂ Vitamin-D | 1 x 48 | Groen | Klaar voor gebruik |
|  Tracer: 1,25(OH) ₂ Vitamin-D gelabeld met ¹²⁵ I jood (HPLC-kwaliteit) in fosfaat buffer met bovien caseïne en gentamycine | 1 flacon gevries-droogd 75 kBq | Rood | Voeg 26 ml reconstitutieoplossing toe |
|  Kalibrators 1,25(OH) ₂ Vitamin-D: N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in fosfaat buffer met bovien caseïne en gentamycine | 5 flacons, gevries-droogd | Geel | 2 ml Elutieoplossing toevoegen |
|  Wasoplossing 70x : TRIS-HCl | 1 flacon 10 ml | Bruin | 70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder) |
|  Controles : N = 1 of 2 in humaan plasma met gentamycine | 2 flacons, gevries-droogd | Zilver | 2 ml gedistilleerd water toevoegen |
|  Reconstitutieoplossing: fosfaat buffer met bovien caseïne en azide (< 0,1%) | 1 flacon 30 ml | Zwart | Klaar voor gebruik |
|  Elutieoplossing: fosfaat buffer met bovien caseïne, methanol en azide (< 0,1%) | 1 flacon 30 ml | Groen | Klaar voor gebruik |
|  Bond Elut Silica-kolom | 20 | | Bewaar bij kamertemperatuur |

Opmerking: Gebruik de elutieoplossing als kalibrator 0 en voor de verduunning van monsters met waarden boven de hoogste kalibrator (verdunnen na de scheidingsfase).

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedistilleerd water
2. Diisopropylether (p.a.)
3. Cyclohexaan (p.a.)
4. Ethyl acetaat (p.a.)
5. Zuivere ethanol (p.a.)
6. Dichloromethaan (p.a.)

NB: Een DIAsource extractie kit, die al deze solventen bevat, is beschikbaar via referentie: 3019700. Deze kit bevat hoeveelheden van

solventen noodzakelijk om 5 x 48 testen van 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT uit te voeren.

7. Pipetten voor een volume van 200 µl, 500 µl, 1 ml en 2 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen)
8. Glazen buisjes (12 x 75 mm) voor de extractie en voor de elutieoplossing. (gesloten met een dop voor de extractiefase)
9. Glazen buisjes (16 x 100 mm) of (12 x 120 mm), of buisjes uit polypropyleen (falcon 2097), voor het wassen van de patronen
10. Vortexmenger
11. Magnetische roerder
12. Centrifuge werkend bij 800 g
13. Schudder voor de buisjes (1200 rpm)
14. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase
15. Afzuigsysteem (facultatief).
16. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van 125I. Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de controles met 2 ml Elutieoplossing (**juist voor de incubatiefase**).
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 2 ml gedistilleerd water.
- C. **I¹²⁵ 1,25(OH)₂-Vitamin.D** : Reconstitueer met 26 ml van de reconstitutieoplossing.
- D. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedistilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.
- E. **Extractiesolvent** : 2 ml voor elke te testen controle of monster is nodig. **Bereid een verse oplossing** van diisopropylether, cyclohexaan, ethyl acetaat, (50, 40, 10 v/v).
- F. **Wassolvent** : 1 ml voor elke te testen controle of monster is nodig. **Bereid een verse oplossing** van diisopropylether, cyclohexaan, ethyl acetaat, zuivere ethanol (50, 40, 10, 1 v/v).

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C; behalve de patronen, zij moeten bewaard worden bij kamertemperatuur.
- De kalibrators en controles zijn erg onstabiel, gebruik hen onmiddellijk na reconstitutie, bevries onmiddellijk in aliquots en bewaar hen bij -20°C gedurende 3 maanden. Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Een vers bereide werk-wasoplossing moet op dezelfde dag nog gebruikt worden.
- Na het eerste gebruik is de tracer houdbaar tot de vervaldatum, indien bewaard bij 2 tot 8°C in de oorspronkelijke, goed afgesloten flacon.
- Gebruik vers bereide extractiesolvent en wassolvent, bewaar ze niet.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serum en plasmamonsters moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Indien de bepaling niet binnen 24 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Vermijd herhaalde invriezing en ontdooiing.
- Na het ontdooien moeten de monsters gevortexed worden en gecentrifugeerd.
- Serum en plasma (heparine en EDTA) leveren vergelijkbare resultaten op.

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

Pipetten met een grote precisie of geautomatiseerde pipetteapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden.

Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

I. Extractiefase : ! Enkel voor controles en stalen.

1. Label de glazen buisjes (12x75 mm) voor extractie: 2 controles en tot 16 monsters.
2. Voeg 0.5 ml controle of monsters toe aan de respectievelijke buisjes.
3. Verdeel 2 ml extractiesolvent in elk buisje.
4. De buisjes worden met een dop gesloten en op een schouder gezet gedurende 1 uur tegen 1200 rpm.
5. Centrifugeer elk buisje gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur (bij 800 g).
6. Supernatanten zijn nodig voor de volgende stap van de scheiding.

II. Scheidingsfase : ! Enkel voor controles en monsters

1. Label de glazen buisjes (16 x 100 mm) of (12 x 120 mm), of buisjes uit polypropyleen (falcon 2097) voor het wassen van de patronen: 2 controles en tot 16 monsters.
2. Doe één "Bond Elut" kolom in elk buisje.
3. Breng 1,6 ml van de supernatant (2 x 0,8 ml) bekomen na de extractiefase aan op het patroon.
4. Was de kolommen dan met 1 ml wassolvent (cf bereiding van het reagens). ! Let erop nooit vacuüm toe te passen op de patronen, laat de solvent gewoon inwerken door de zwaartekracht.
5. Voeg 300 µl dichloromethaan toe aan elk kolom, laat inwerken door de zwaartekracht.
6. Voeg 300 µl gedestilleerd water toe aan elk kolom.
7. Centrifugeer elk buisje gedurende 5 minuten bij kamertemperatuur (bij 800 g).
8. Label glazen buisjes (12 x 75 mm) voor de elutie van 1,25(OH)₂-Vitamine D. Breng de kolommen na het centrifugeren over in de overeenkomstige glazen buisjes.
9. Breng 400 µl elutieoplossing aan op elk kolom voor de elutie van 1,25 (OH)₂-Vitamine D en centrifugeer 5 minuten op kamertemperatuur (bij 800 g).
10. Vortex the eluted fraction.

Nota : Na deze fase moeten de monsters zo snel mogelijk geïncubeerd worden in gecoat buisjes om degradatie te vermijden.

III. Incubatiefase :

1. Etiketteer de gecoat buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaal tellingen.
2. Vortex de kalibrators (Gebruik de elutieoplossing als kalibrator 0), geëxtraheerde controles en monsters gedurende korte tijd en distribueer 150 µl van elk in het desbetreffende buisje.
3. Distribueer 0,5 ml 1,25(OH)₂ Vitamin-D de totaal tellingen.
4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtbellen vrijkomen.
5. Incubeer overnacht bij kamertemperatuur
6. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen) op. Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoat buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buisjes met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
8. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer).
9. Was de buisjes nogmaals met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) en zuig op (of -decanteer).
10. Na de laatste wasfase moeten de buisjes gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
11. Tel de buisjes in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

1. Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
2. Bereken het percentage binding van de gebonden radioactiviteit, bepaald op het punt van de nulkalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{cpm (Kalibrator of monster)}}{\text{cpm (Nulkalibrator)}} \times 100$$

3. Zet de (B/B₀(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de 1,25(OH)₂ Vitamin-D concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
4. Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt

worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.

5. Bepaal de 1,25(OH)₂ Vitamin-D concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B₀(%)) te interpoleren.
6. Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld 1,25(OH)₂ Vitamin-D (B₀/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

| 1,25(OH) ₂ VITAMIN-D | cpm | B/Bo (%) |
|---------------------------------|-------------|----------|
| Totaaltelling | 43937 | |
| Kalibrator | 0,0 pg/ml | 16687 |
| | 6,0 pg/ml | 15268 |
| | 20,0 pg/ml | 12345 |
| | 63,0 pg/ml | 8033 |
| | 230,0 pg/ml | 3554 |
| | 430,0 pg/ml | 2148 |
| | | 100,0 |
| | | 91,5 |
| | | 74,0 |
| | | 48,1 |
| | | 21,3 |
| | | 12,9 |

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met de serie andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 1,4 pg/ml.

B. Specificiteit

De percentages van kruisreactiviteit geschat naar de vergelijking van de concentraties (een remming van 50% toegevend) zijn respectievelijk:

| Bestanddeel | Kruisreactiviteit (%) |
|-------------------------------------|-----------------------|
| 1,25(OH) ₂ -Vitamine.D3 | 100 |
| 1,25(OH) ₂ -Vitamine.D2 | 92,31 |
| 25OH-Vitamine-D3 | 0,001 |
| 24,25(OH) ₂ -Vitamine.D3 | 0,005 |
| 25,26(OH) ₂ -Vitamine.D3 | 0,20 |

Nota: deze tabel toont de kruisreactiviteit voor het anti 1,25(OH)₂ Vitamin-D

Het testresultaat wordt niet beïnvloed door hemolyse (getest op 5 g/L hemoglobine), bilirubinemie (getest op 1 g/L bilirubine) of triglyceriden (getest op 2,5 g/L).

Ascorbinezuur (Vitamin C) (getest op 1 g/L) en bilirubine conjugaat (getest op 1g/L) zorgen niet voor storingen met deze test.

C. Precisie

PRECISIE BINNEN EEN TEST

PRECISIE TUSSEN TESTEN

| Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | VC (%) | Serum | N | <X> ± SD (pg/ml) | VC (%) |
|-------|----|------------------|--------|-------|----|------------------|--------|
| A | 20 | 24,6 ± 1,7 | 7,1 | A | 10 | 13,6 ± 1,7 | 12,7 |
| B | 20 | 78,6 ± 3,9 | 5,0 | B | 10 | 32,3 ± 3,6 | 11,3 |

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

VERDUNNINGSTEST

| Verdunning monster | Theoretische concentratie (pg/ml) | Gemeten concentratie (pg/ml) | Recovery (%) |
|--------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------|
| 1/1 | 70,0 | 70,0 | 100% |
| 1/2 | 35,0 | 35,7 | 102% |
| 1/4 | 17,5 | 14,5 | 83% |
| 1/8 | 8,8 | 7,8 | 89% |
| 1/16 | 4,4 | 4,6 | 105% |

Monsters werden verdund met de Elutieoplossing

RECOVERY-TEST

| Toegevoegd 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Gemeten 1,25(OH) ₂ Vit.D concentraties | | Recovery (%) |
|---|---|--------------------------|-----------------|
| | Totaal (pg/ml) | Zonder blanco (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 46,3 | 23,8 | 95,2% |
| 50,0 | 70,0 | 47,5 | 95,0% |
| 100,0 | 122,7 | 100,2 | 100,2% |

| Toegevoegd 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Gemeten 1,25(OH) ₂ Vit.D concentraties | | Recovery (%) |
|---|---|--------------------------|-----------------|
| | Totaal (pg/ml) | Zonder blanco (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 52,1 | 29,6 | 118,4% |
| 50,0 | 70,4 | 47,9 | 95,8% |
| 100,0 | 112,9 | 90,4 | 90,4% |

Conversiefactor :

Van pg/ml naar pmol/L : x 2,4
Van pmol/L naar pg/ml : x 0,42

Naar ons beste weten bestaat er geen internationaal referentiemateriaal voor deze parameter.

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. REFERENTIE-INTERVALS

Deze waarden worden slechts als leidraad gegeven; elk laboratorium moet zijn eigen normaal bereik van waarden uitmaken.

Het geobserveerde bereik is gebaseerd op 2,5% tot 97,5% percentielen..

| Populatie | Bereik (pg/ml) | Gemiddeld | SD | n |
|--------------------|-------------------|-----------|------|----|
| Normale individuen | 19.6 – 54.3 | 35.3 | 10.6 | 51 |

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ-stralen (35.5 keV) uitzendt.

Dit radioactieve product mag enkel overhandigd worden aan en gebruikt worden door bevoegd personeel; ontvangst, opslag, gebruik en overdracht van radioactieve producten zijn onderworpen aan de wetgeving van het land van de eindgebruiker. In geen geval mag het product toegediend worden aan mensen of dieren.

Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk. Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in

deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkrimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen.

XVII. BIBLIOGRAFIE

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

| | TOTAAL-TELLINGEN (µl) | KALIBRATORS (µl) | MONSTER(S) CONTROLES (µl) |
|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| EXTRACTIE | | | |
| Kalibrators | - | - | - |
| Monsters, Controles | - | - | 500 |
| Extractiesolvent | - | - | 2000 |
| Schudden | 1 uur aan 1200 rpm | | |
| Centrifugatie | 5 minuten aan 800 g | | |
| SCHEIDING | | | |
| Supernatant van extractiefase | - | - | 1600 |
| PATROON | | | |
| Supernatant | | 1600 µl | |
| Wassolvent | | 1000 µl | |
| Dichloromethaan | | 300 µl | |
| Gedestilleerd water | | 300 µl | |
| Centrifugatie | | 5 minuten aan 800 g | |
| Elutieoplossing | | 400 µl | |
| Centrifugatie | | 5 minuten aan 800 g | |
| | | Vortex | |
| INCUBATIE | | | |
| Kalibratoren | - | 150 | - |
| Geëxtraheerde stalen | - | - | 150 |
| Tracer | 500 | 500 | 500 |
| Incubatie | overnacht bij kamertemperatuur | | |
| Scheiding | - | opzuigen (of decanteren) | |
| Werk-wasoplossing | - | 2,0 ml | |
| Scheiding | - | opzuigen (of -decanteren) | |
| Werk-wasoplossing | - | 2,0 ml | |
| Scheiding | - | opzuigen (of -decanteren) | |
| Telling | Tel buisjes gedurende 60 seconden | | |

| | | |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| DIAsource catalogusnummer: KIP1929 | Bijsluiternummer : 1700602/nl | Revisienummer : 140108/2 |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem 1,25(OH)₂-Vitamin D (1,25(OH)₂-Vit.D) in Serum und Plasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP1929 : 48 tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

Das Vitamin D₃ wird hauptsächlich in der Haut aus 7-Dehydrocholesterin gebildet und stammt teilweise aus der aufgenommenen Nahrung. Durch Hydroxylierung auf Kohlenstoff 25 in der Leber entsteht das obligaten Zwischenprodukt 25-OH-D₃. Bevor 25-OH-D₃ die Funktionen des Vitamins D in Darm, Niere und in den Knochen erfüllen kann, muss es weiter verstoffwechselt werden. Diese Reaktion findet beim nichtträchtigen Säugetier ausschließlich in der Niere statt. Auf diese Weise wird 25-OH-D₃ an der 1 α -Position weiter hydroxyliert, sodass 1 α ,25 Dihydroxyvitamin D₃ (1 α ,25-(OH)₂D₃) entsteht.

Außer dem renalen Gewebe sind auch die Plazenta schwangerer Frauen sowie Makrophagen bei Sarkoidose in der Lage, eine bestimmte Menge 1 α ,25-(OH)₂D₃ herzustellen. 1 α ,25-(OH)₂D₃ stellt in Bezug auf die bekannten Funktionen die aktive Form des Vitamins D dar, während ausgeschlossen werden kann, dass das 25-OH-D₃ sowie Vitamin D₃ selbst physiologisch aktiv sind. Da das 1 α ,25-(OH)₂D₃ in der Niere produziert wird und einige seiner Funktionen in Knochen und Darm erfüllt, ist es ferner als Hormon zu betrachten. Dieses Hormon stimuliert die Aufnahme von sowohl Kalzium als auch Phosphor in den Darm. Es regt weiterhin die Knochenresorption und -mineralisierung an, wodurch der Entwicklung von Rachitis und Osteomalazie vorgebeugt wird.

1 α ,25-(OH)₂D₃ könnte auch in anderen, für den Kalziumtransport zuständigen Geweben (Plazenta, Niere, Brustdrüsen usw.) und in endokrinen Drüsen wie Nebenschilddrüsen aktiv sein. Es wird sehr schnell abgebaut; die Haltbarkeit im Plasma beträgt ca. 2 - 4 Stunden. Der Hauptmetabolit des 1 α ,25-(OH)₂D₃ ist die Calcitroidsäure, ein C-23-Karboxyl-Derivat, welches eigentlich ohne irgendeine biologische Aktivität ist. Zusätzlich zu diesem Weg unterliegt das 1 α ,25-(OH)₂D₃ auch einer 24-Hydroxylierung, die zum 1,24,25-Trihydroxy-Vitamin D₃ führt. Dieses Produkt hat eine geringere biologische Aktivität als seine Eltern und ist als ein unbedeutender Abkömmling zu betrachten.

Da die Konzentrationen des 1 α ,25-(OH)₂D₃ in Plasma oder Serum 100- bis 1.000-fach geringer als die des 25-OH-D₃ sind und wegen der Anwesenheit zahlreicher ähnlicher Metaboliten, erfordert die Bestimmung des 1 α ,25-(OH)₂D₃ eine Extraktion sowie eine Separation entweder durch HPLC oder Säulenchromatografie.


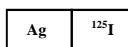
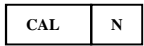
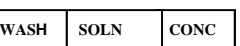
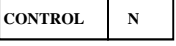
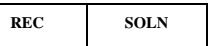
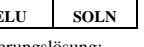

B. Klinische Anwendung

Die Messung des zirkulierenden 1 α ,25-(OH)₂D₃ ist bei verschiedenen den Kalziumstoffwechsel betreffenden Erkrankungen angezeigt wie: Sarkoidose, Nierenversagen, Über- bzw. Unterfunktion der Schilddrüsen, Rachitis, tumorvermittelte Hyperkalzämie, vitaminresistente Mangelfunktion und Behandlung mit antikonvulsiven Medikamenten.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden Proben und Kontrollen, nicht jedoch die Kalibratoren mit einem Lösungsmittelgemisch extrahiert und anschließend auf Kartuschen aufgetragen, um das 1,25(OH)₂-Vitamin D von anderen Vitamin-D-Metaboliten zu trennen. Nach der Eluierung der Proben und Kontrollen werden Kalibratoren, Proben und Kontrollen in den beschichteten Röhrchen inkubiert. Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I markiertem 1,25(OH)₂ Vitamin-D konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen 1,25(OH)₂ Vitamin-D um eine Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Nach Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschließend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die 1,25(OH)₂ Vitamin-D -Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

| Reagenz | 48 Test Kit | Farbcode | Rekonstitution |
|--|---------------------------------|----------|--|
|  Mit anti 1,25(OH) ₂ Vitamin-D- beschichtete Röhrchen | 1 x 48 | grün | Gebrauchsfertig |
|  Tracer : ¹²⁵ Iod markiertes 1,25(OH) ₂ Vitamin-D (HPLC grade) in Phosphatpuffer mit Rinder-casein und Gentamycin | 1 Gefäß lyophilisiert 75 kBq | rot | 26 ml Rekonstitutionslösung zugeben |
|  Kalibratoren 1,25(OH) ₂ Vitamin-D : N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Phosphatpuffer mit Rinder-casein und Gentamycin | 5 Gefäße lyophilisiert | gelb | 2 ml Eluierungslösung zugeben |
|  Waschlösung (TRIS-HCl) | 1 Gefäß 10 ml | braun | 70x mit dest. Wasser (Magnetrihrer verwenden) verdünnen . |
|  Kontrollen : N = 1 oder 2 in Humanplasma und Gentamycin | 2 Gefäße lyophilisiert | silber | 2 ml dest. Wasser zugeben |
|  Rekonstitutionslösung: Phosphatpuffer mit Rinder-casein und Azid (<0,1%) | 1 Gefäß 30 ml | schwarz | Gebrauchsfertig |
|  Eluierungslösung: Phosphatpuffer mit Rinder-casein, Methanol und Azid (<0,1%) | 1 Gefäß 30 ml | grün | Gebrauchsfertig |
|  Bond Elut Silikakartuschen | 20 | | Bei Raumtemperatur aufbewahren |

Bemerkung: Verwenden Sie Eluierungslösung als Null-Kalibrator und Zur Verdünnung der Proben mit Werten über dem höchsten Kalibrator (nach Separationsschritt verdünnen).

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

1. Dest. Wasser
2. Diisopropyläther (p.a.)
3. Cyclohexan (p.a.)
4. Ethylazetat (p.a.)
5. Äthanol, absolut (p.a.)
6. Dichloromethan (p.a.)

NB: Ein DIAsource Extraktions Kit, der alle diese Lösungen enthält, ist erhältlich unter Bestellnummer: 3019700. Dieser Kit enthält die benötigten Volumina der Lösungsmittel, um 5x48 Tests des 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT durchzuführen.

7. Pipetten: 200 µl, 500 µl, 1 ml und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
8. Glasröhrchen (12 x 75 mm) für Extraktion und Eluierung (für Extraktionsschritt mit Verschluss).

9. Glasröhrchen (16 x 100 mm) oder (12 x 120 mm) oder Polypropylenröhrchen (z.B. Falcon 2097) für das Waschen der Kartuschen.
10. Vortexmixer
11. Magnetrihrer
12. Zentrifuge für Betrieb mit 800 g
13. Schüttler für Röhrchen(1200 rpm)
14. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
15. Absaugsystem (optional)
16. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 2 ml Eluierungslösung (**gerade vor dem Inkubationsschritt**).
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 ml dest. Wasser.
- ¹²⁵I 1,25(OH)₂-Vitamin D:** Rekonstituieren Sie mit 26 ml Rekonstitutionslösung.
- Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrihrer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.
- Extraktionslösungsmittel:** Es werden je Kontrolle bzw. Probe 2 ml benötigt.
Vorbereitung einer frischen Lösung aus Diisopropyläther, Cyclohexan, Äthylacetat (50, 40, 10 V/V)
- Waschlösungsmittel:** Es werden je Kontrolle bzw. Probe 1 ml benötigt.
Vorbereitung einer frischen Lösung aus Diisopropyläther, Cyclohexan, Äthylacetat, Äthanol absolut (50, 40, 10, 1 V/V).

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar; außer Kartuschen, diese beiden Komponenten sind bei Raumtemperatur zu lagern.
- Die Kalibratoren und Kontrollen sind sehr instabil, sie sind sofort nach der Rekonstitution zu verwenden oder sofort zu aliquotieren und einzufrieren, dann sind sie bei -20°C 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gutverschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8°C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Es wird empfohlen, Extraktions- und Waschlösungsmittel jeweils frisch herzustellen und nicht zu lagern.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serum- oder Plasmaproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Nach dem Auftauen müssen die Proben auf dem Vortex gemischt und zentrifugiert werden.
- Serum- oder Plasmaproben (hepariniertes und EDTA) liefern ähnliche Ergebnisse

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

I. Extraktionsschritt: ! Nur für Kontrollen und Proben

1. Beschriften Sie die Glasröhrchen (12 x 75 mm) für Extraktion: 2 Kontrollen und bis zu 16 Proben.
2. Pipettieren Sie 0,5 ml Kontrollen oder Proben in die entsprechenden Röhrchen.

- Geben Sie 2 ml Extraktionslösungsmittel in alle Röhren.
- Röhren mit Verschluss schließen und 1 Stunde auf einem Schüttler (1200 rpm) inkubieren.
- Zentrifugieren Sie alle Röhren 5 min. bei Raumtemperatur (800 g).
- Verwenden Sie die Überstände für den nächsten Arbeitsschritt.

II. Separationsschritt: ! Nur für Kontrollen und Proben

- Label Glasröhren (16 x 100 mm) oder (12 x 120 mm), oder Polypropylenröhren (Falcon 2097), für das Waschen der Kartuschen : 2 Kontrollen und bis zu 16 Proben.
- Stecken Sie eine ‚Bond Elut‘ Kartusche in jedes Röhren.
- Tragen Sie 1,6 ml des Überstandes (2 x 0,8 ml) aus dem Extraktionsschritt auf die Kartuschen.
- Waschen Sie die Kartuschen mit 1 ml Waschlösungsmittel (Herstellung s.o.). ! Niemals Vakuum an die Kartuschen anlegen, sondern Lösungsmittel allein durch Schwerkraft passieren lassen.
- Pipettieren Sie 300 µl Dichlormethan auf die Kartuschen; durch Schwerkraft passieren lassen.
- Pipettieren Sie 300 µl dest. Wasser auf die Kartuschen.
- Zentrifugieren Sie alle Röhren 5 min. bei Raumtemperatur (800 g).
- Beschriften Sie die Glasröhren (12 x 75 mm) für das Eluieren von 1,25(OH)₂-Vitamin D beschriften. Übertragen Sie die Kartuschen nach dem Zentrifugieren in die entsprechenden Glasröhren.
- Tragen Sie 400 µl Eluierungslösung auf jede Kartusche, um 1,25(OH)₂-Vitamin D zu eluieren und zentrifugieren Sie 5 min. bei Raumtemperatur (800 g).
- Vortexmischen** Sie die eluierte Fraktion.

Bemerkung: Nach diesem Schritt müssen die Proben unverzüglich in die beschichtete Röhren überführt werden um einen Abbau zu vermeiden.

III. Inkubationsschritt:

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhren für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhren.
- Vortexen Sie Kalibratoren (Verwenden Sie Eluierungslösung als Null-Kalibrator), extrahierte Proben und Kontrollen kurz und geben Sie 150 µl von jedem in ihre Röhren.
- Geben Sie 0,5 ml des 125Iod markierten 1,25(OH)₂ Vitamin-D in jedes Röhren, einschließlich der unbeschichteten Röhren für die Gesamtaktivität.
- Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhren um Blasen zu entfernen.
- Inkubieren Sie Über Nacht bei Raumtemperatur.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhren mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrens ab (außer Gesamtaktivität).
- Waschen Sie die Röhren mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab.
- Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhren 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhren in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:

$$B/Bo (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

- Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/Bo(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 1,25(OH)₂ Vitamin-D -Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
- Bestimmen Sie die 1,25(OH)₂ Vitamin-D -Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte (B/Bo(%)) der Referenzkurve.
- Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 1,25(OH)₂ Vitamin-D (B0/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationskurve verwendet werden.

| 1,25(OH) ₂ VITAMIN-D | | Cpm | B/Bo (%) |
|---------------------------------|-------------|-------|----------|
| Gesamtaktivität | | 43937 | |
| Kalibrator | 0,0 pg/ml | 16687 | 100,0 |
| | 6,0 pg/ml | 15268 | 91,5 |
| | 20,0 pg/ml | 12345 | 74,0 |
| | 63,0 pg/ml | 8033 | 48,1 |
| | 230,0 pg/ml | 3554 | 21,3 |
| | 430,0 pg/ml | 2148 | 12,9 |

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 1,4 pg/ml.

B. Spezifität

Der Prozentsatz der Kreuzreaktion, der im Vergleich der Konzentration geschätzt wurde, welche eine 50%ige Inhibition ergibt, beträgt respektive:

| Substanz | Kreuz-Reaktivität (%) |
|------------------------------------|-----------------------|
| 1,25(OH) ₂ -Vitamin D3 | 100 |
| 1,25(OH) ₂ -Vitamin D2 | 92,31 |
| 25OH-Vitamin D3 | 0,001 |
| 24,25(OH) ₂ -Vitamin D3 | 0,005 |
| 25,26(OH) ₂ -Vitamin D3 | 0,20 |

Bemerkung: Diese Tabelle zeigt die Kreuz-Reaktivität für die anti-1,25(OH)₂ Vitamin-D.

Die Leistung des Tests wird nicht durch Hämolyse (5g/l Hämoglobin getestet), Bilirubinämie (1g/l Bilirubin getestet) oder Triglyceride (2,5 g/l getestet) beeinflusst.

Ascorbinsäure (Vitamin C) (1g/l getestet) und Bilirubinkonjugat (1g/l getestet) interferieren nicht mit diesem Testsystem.

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

INTER-ASSAY PRÄZISION

| Serum | N | INTRA-ASSAY PRÄZISION | | INTER-ASSAY PRÄZISION | | | |
|-------|----|-----------------------|--------|-----------------------|--------|------------|------|
| | | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | | |
| A | 20 | 24,6 ± 1,7 | 7,1 | A | 10 | 13,6 ± 1,7 | 12,7 |
| B | 20 | 78,6 ± 3,9 | 5,0 | B | 10 | 32,3 ± 3,6 | 11,3 |

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

| Probenverdünnung | Theoretische Konzentration (pg/ml) | Gemessene Konzentration (pg/ml) | Wiederfindungsrate (%) |
|------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------|
| 1/1 | 70,0 | 70,0 | 100% |
| 1/2 | 35,0 | 35,7 | 102% |
| 1/4 | 17,5 | 14,5 | 83% |
| 1/8 | 8,8 | 7,8 | 89% |
| 1/16 | 4,4 | 4,6 | 105% |

Die Proben wurden mit Eluierungslösung verdünnt.

WIEDERFINDUNGSTEST

| Hinzugefügtes 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Gemessene 1,25(OH) ₂ Vit.D Konzentrationen | | Wiederfindungsrate (%) |
|--|---|------------------|------------------------|
| | Gesamt (pg/ml) | Gelöscht (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 46,3 | 23,8 | 95,2% |
| 50,0 | 70,0 | 47,5 | 95,0% |
| 100,0 | 122,7 | 100,2 | 100,2% |

| Hinzugefügtes 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Gemessene 1,25(OH) ₂ Vit.D Konzentrationen | | Wiederfindungsrate (%) |
|--|--|---------------------|---------------------------|
| | Gesamt (pg/ml) | Gelöscht (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 52,1 | 29,6 | 118,4% |
| 50,0 | 70,4 | 47,9 | 95,8% |
| 100,0 | 112,9 | 90,4 | 90,4% |

Umrechnungsfaktor:

Von pg/ml in pmol/L: x 2,4
 Von pmol/L in pg/ml: x 0,42

Laut unserem Wissen, gibt es keine internationale Referenzen zu diesen Parametern.

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Der beobachtete Bereich war, auf Grundlage der Perzentilen 2,5% bis 97,5%.

| Population | Bereich (pg/ml) | Mittelwert | SD | n |
|----------------|--------------------|------------|------|----|
| Normale Themen | 19.6 – 54.3 | 35.3 | 10.6 | 51 |

XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen gesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschstufen den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

| | GESAMT- AKTIVITÄT (µl) | KALIBRA- TOREN (µl) | PROBE(N)- KONTROLLEN (µl) |
|---|--|---------------------------|---------------------------------|
| EXTRAKTION | | | |
| Kalibratoren | - | - | - |
| Proben, Kontrollen | - | - | 500 |
| Extraktionslösungs- mittel | - | - | 2000 |
| Schütteln Zentrifugierung | 1 Std. bei 1200 rpm 5 Minuten (800 g) | | |
| SEPARATION | | | |
| Überstand aus dem Extraktionsschritt | - | - | 1600 |
| KARTUSCHE | | | |
| Überstand | | 1600 µl | |
| Waschlösungsmittel | | 1000 µl | |
| Dichloromethan | | 300 µl | |
| Dest. Wasser | | 300 µl | |
| Zentrifugierung | | 5 Minuten (800 g) | |
| Eluierungslösung | | 400 µl | |
| Zentrifugierung | | 5 Minuten (800 g) | |
| | | Vortex | |
| INKUBATION | | | |
| Kalibratoren | - | 150 | - |
| Extrahierte Proben | - | - | 150 |
| Tracer | 500 | 500 | 500 |
| Inkubation | Über Nacht bei Raumtemperatur | | |
| Separation | - | absaugen (oder dekant) | |
| Waschlösung | - | 2 ml | |
| Separation | - | absaugen (oder dekant) | |
| Waschlösung | - | 2 ml | |
| Separation | - | absaugen (oder dekant) | |
| Auswertung | Messen der Röhrcen 60 Sekunden | | |

| | | |
|--------------------------------------|---|---|
| DIAsource Katalognummer : KIP1929 | Beipackzetteln- nummer : 1700602/de | Nummer der Originalausgabe : 140108/1 |
|--------------------------------------|---|---|



Leggere tutto il protocollo prima dell'uso

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. USO PREVISTO

Radioimmunosaggio per la determinazione quantitativa *in vitro* della 1,25(OH)₂-Vitamina D (1,25(OH)₂-Vit.D) nel siero e nel plasma.

II. INFORMAZIONI GENERALI

- A. Nome commerciale:** DIAsource 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1929 : 48 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologiche

La vitamina D₃ è sintetizzata principalmente a livello cutaneo a partire da 7-deidrocolesterolo e parzialmente ricavata dall'alimentazione. Nel fegato la vitamina D₃ viene idrossilata sul carbonio 25 per produrre il necessario intermedio 25-OH-D₃, il quale deve subire ulteriori modifiche prima di poter svolgere le funzioni della vitamina D a livello intestinale, renale e osseo. Nei mammiferi non gravidi, questa seconda reazione avviene solo nel rene. Pertanto, la 25-OH-D₃ subisce un'ulteriore idrossilazione in posizione 1 α a dare la 1 α ,25 diidrossi-vitamina D₃ (1 α ,25-(OH)₂D₃).

Oltre al tessuto renale, la 1 α ,25-(OH)₂D₃ può essere prodotta anche da parte della placenta di donne in gravidanza e, in presenza di sarcoidosi, dai macrofagi. La 1 α ,25-(OH)₂D₃ rappresenta la forma attiva della vitamina D in relazione alle funzioni note, mentre la 25-OH-D₃ e la vitamina D₃ stessa possono essere escluse in quanto fisiologicamente funzionali. Inoltre, poiché la 1 α ,25-(OH)₂D₃ è prodotta dal rene ed esercita parte della propria azione a livello di ossa e intestino, va considerata un ormone. Tale ormone stimola l'assorbimento intestinale del calcio e del fosforo, oltre a favorire il riassorbimento e la mineralizzazione ossei, prevenendo dunque lo sviluppo di rachitismo e osteomalacia.

La 1 α ,25-(OH)₂D₃ potrebbe essere attiva anche in altri tessuti responsabili del trasporto di calcio (placenta, rene, ghiandola mammaria, ...) e nelle ghiandole endocrine, quali le paratiroidi. La 1 α ,25-(OH)₂D₃ è metabolizzata rapidamente e la sua permanenza nel plasma ammonta a circa 2-4 h. Il suo metabolita principale è l'acido calcitroico, un derivato carbossilico C-23, essenzialmente privo di attività biologica. Oltre a questa via, la 1 α ,25-(OH)₂D₃ subisce un'idrossilazione in posizione 24 a dare la 1,24,25-triidrossi-vitamina D₃, caratterizzata da un'attività biologica minore rispetto al suo progenitore, pertanto questa viene considerata come una via metabolica minore.

I livelli di 1 α ,25-(OH)₂D₃ nel plasma o nel siero sono da 100 a 1000 volte inferiori a quelli della 25-OH-D₃. Considerando la sua bassa concentrazione e la presenza di molti metaboliti simili, la misurazione di 1 α ,25-(OH)₂D₃ richiede l'estrazione e la separazione tramite HPLC o cromatografia su colonna.


B. Applicazione clinica

La misurazione dei livelli circolanti di 1 α ,25-(OH)₂D₃ è indicata in diversi disturbi che interessano il metabolismo del calcio quali: sarcoidosi, insufficienza renale, iper- e ipo-paratiroidismo, rachitismo, ipercalcemia associata a tumori, rachitismo vitamina D-resistente e trattamento con farmaci anticonvulsivanti.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Solo i campioni e i controlli, ma non i calibratori, vengono estratti utilizzando una miscela di solventi e vengono applicati su cartucce per separare la 1,25(OH)₂ Vitamina D dagli altri metaboliti della vitamina D. Dopo l'eluizione dei campioni e dei controlli, i calibratori, i campioni e i controlli vengono incubati in provette rivestite. Una quantità fissa di 1,25(OH)₂ Vitamina D marcata con ¹²⁵I compete con la 1,25(OH)₂ Vitamina D da misurare presente nel campione o nel calibratore per il legame a un numero fisso di siti sugli anticorpi immobilizzati sulla parete della provetta di polistirene. Dopo un'incubazione per tutta la notte a temperatura ambiente, la reazione di competizione viene interrotta tramite aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con soluzione di lavaggio e asciugate. Si costruisce una curva di calibrazione e tramite la sua interpolazione si calcola concentrazione di 1,25(OH)₂ Vitamina D presente nei campioni.

V. REATTIVI FORNITI

| Reattivi | Kit da 48 test | Codice colore | Volume di ricostituzione |
|---|--------------------------------|---------------|--|
|  Provette rivestite con anticorpo anti-1,25(OH) ₂ Vitamina D | 1 x 48 | verde | Pronte per l'uso |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">Ag</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">¹²⁵I</div> RADIOMARCATO: 1,25(OH) ₂ Vitamina D marcato con ¹²⁵ I (per HPLC), in tampone fosfato con caseina bovina e gentamicina | 1 flacone, liofilizzato 75 kBq | rosso | Aggiungere 26 ml di Soluzione di ricostituzione |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CAL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">N</div> Calibratori - N = da 1 a 5 (i valori esatti sono riportati sull'etichetta dei flaconcini), in tampone fosfato con caseina bovina e gentamicina | 5 flaconcini, liofilizzati | giallo | Aggiungere 2 ml di Soluzione di eluizione |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">SOLN</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">CONC</div> Soluzione di lavaggio concentrata (TRIS-HCl) | 1 flaconcino, 10 ml | marrone | Diluire 70 x con acqua distillata (usare un agitatore magnetico) |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">N</div> Controlli - N = 1 o 2, in plasma umano con gentamicina | 2 flaconcini, liofilizzati | argento | Aggiungere 2 ml di acqua distillata |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">REC</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">SOLN</div> Soluzione di ricostituzione: tampone fosfato con caseina bovina e azoturo (<0,1%) | 1 flacone 30 ml | nero | Pronta per l'uso |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">ELU</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">SOLN</div> Soluzione di eluizione: tampone fosfato con caseina bovina, metanolo e azoturo (<0,1%) | 1 flacone 30 ml | verde | Pronta per l'uso |
| <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">GEL</div> Cartucce di silice Bond Elut | 20 | | Conservare a temp. amb. |

Note : Utilizzare la Soluzione di eluizione come calibratore 0 e per la diluizione dei campioni con valori superiori al calibratore più elevato (diluizione dopo la fase di separazione).

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- Acqua distillata
 - Diisopropil etero (p.a.)
 - Cicloesano (p.a.)
 - Etilacetato (p.a.)
 - Etanolo assoluto (p.a.)
 - Diclorometano (p.a.)
- NB: con il numero di riferimento 3019700 è disponibile un kit di estrazione DIAsource contenente tutti questi solventi. Il kit contiene quantità di solventi sufficienti per eseguire 5 x 48 test per 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT.**
- Pipette per erogare 200 µl, 500 µl, 1 ml e 2 ml (si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale di plastica monouso).
 - Provette di vetro (12 x 75 mm) per l'estrazione e l'eluizione (chiusure con tappo per la fase di estrazione).
 - Provette di vetro (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm) o di polipropilene (Falcon 2097) per il lavaggio delle cartucce.

- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Centrifuga funzionante a 800 g.
- Agitatore rotatorio (1200 rpm)
- Siringa automatica da 5 ml (tipo Cornwall) per i lavaggi.
- Sistema di aspirazione dei campioni (opzionale).
- Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%).

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratori:** ricostituire i calibratori con 2 ml di Soluzione di eluizione (**subito prima della fase di incubazione**).
- Controlli:** ricostituire i controlli con 2 ml di acqua distillata.
- I¹²⁵ 1,25(OH)₂-Vitamina D:** ricostituire con 26 ml di Soluzione di ricostituzione.
- Soluzione di lavaggio diluita:** preparare la quantità necessaria di Soluzione di lavaggio diluita aggiungendo 69 volumi di acqua distillata a 1 volume di Soluzione di lavaggio concentrata (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavaggio va scartata al termine della giornata.
- Solvente di estrazione:** sono necessari 2 ml per ogni controllo o campione da controllare. **Preparare una soluzione fresca** di diisopropil etero, cicloesano, etilacetato, (50, 40, 10 v/v).
- Solvente di lavaggio:** è necessario 1 ml per ogni controllo o campione da analizzare. **Preparare una soluzione fresca** di diisopropil etero, cicloesano, etilacetato, etanolo assoluto (50, 40, 10, 1 v/v).

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- Prima dell'apertura o della ricostituzione, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle rispettive etichette se mantenuti a 2-8°C, ad eccezione delle cartucce che vanno conservate a temperatura ambiente.
- I calibratori e i controlli sono molto instabili: vanno utilizzati subito dopo la ricostituzione e congelati immediatamente in aliquote e mantenuti a -20°C per 3 mesi. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo.
- La Soluzione di lavaggio diluita va preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo l'apertura del flacone, il radiomarcato è stabile fino alla data di scadenza, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben chiuso.
- Il Solvente di estrazione e il Solvente di lavaggio vanno sempre preparati freschi e non vanno conservati.**
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero e plasma a 2-8°C.
- Se il test non viene eseguito entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di aliquotare i campioni e conservarli a -20°C.
- Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelo.
- Dopo lo scongelamento, i campioni vanno vortexati e centrifugati.
- Il siero e il plasma (eparina o EDTA) forniscono risultati simili.

X. PROCEDURA

A. Note generali

Non usare il kit o i suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare materiali di lotti di kit diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare bene tutti i reattivi e i campioni mediante delicata inversione o rotazione. Per evitare contaminazioni incrociate, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate o di pipette automatiche migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Preparare una curva di calibrazione per ogni sessione di analisi, non riutilizzare i dati ottenuti da sessioni di analisi precedenti.

B. Procedura

I. Fase di estrazione: NB: solo per controlli e campioni

- Etichettare le provette di vetro (12x75 mm) per l'estrazione: 2 controlli e 16 campioni al massimo.
- Aggiungere 0,5 ml di controllo o campione nelle rispettive provette.
- Erogare 2 ml di Solvente di estrazione in ogni provetta.
- Chiudere le provette con un tappo e inserirle in un agitatore per 1 ora a 1200 rpm.
- Centrifugare ogni provetta per 5 minuti a temperatura ambiente (a 800 g).
- Per la successiva fase di separazione sono necessari i supernatanti.

II. Fase di separazione: NB: solo per controlli e campioni

1. Etichettare le provette di vetro (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm) o di polipropilene (Falcon 2097) per il lavaggio delle cartucce: 2 controlli e 16 campioni al massimo.
2. Inserire una cartuccia "Bond Elut" in ogni provetta.
3. Applicare sulla cartuccia 1,6 ml di supernatante (2 x 0,8 ml) ottenuto dopo la fase di estrazione.
4. Quindi, lavare le cartucce con 1 ml di Solvente di lavaggio (vedere la preparazione dei reattivi). NB: fare attenzione a non applicare mai il vuoto alle cartucce, lasciare semplicemente che il solvente scenda per gravità.
5. Aggiungere 300 µl di diclorometano su ogni cartuccia, lasciare scendere per gravità.
6. Aggiungere 300 µl di acqua distillata su ogni cartuccia.
7. Centrifugare ogni provetta per 5 minuti a temperatura ambiente (a 800 g).
8. Etichettare le provette di vetro (12 x 75 mm) per l'eluizione della 1,25(OH)₂-Vitamina D. Dopo la centrifugazione, trasferire le cartucce nelle corrispondenti provette di vetro.
9. Applicare 400 µl di Soluzione di eluizione su ciascuna cartuccia per eluire 1,25 (OH)₂-Vitamina D e centrifugare 5 minuti a temperatura ambiente (a 800 g).
10. **Vortexare** la frazione eluita.

Nota : Dopo questa fase, i campioni devono essere incubati in provette rivestite non appena possibile per evitarne la degradazione.

III. Fase di incubazione:

1. Etichettare le provette rivestite necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione e controllo. Etichettare 2 provette non rivestite per la determinazione dell'attività totale.
2. Vortexare brevemente i calibratori (utilizzare la Soluzione di eluizione come calibratore 0), i controlli e i campioni estratti ed erogare 150 µl di ognuno di essi nelle rispettive provette.
3. Erogare 500 µl di 1,25(OH)₂ Vitamina D marcata con ¹²⁵I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria.
5. Incubare per tutta la notte a temperatura ambiente
6. Aspirare (o far decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di Soluzione di lavaggio diluita e aspirare (o far decantare), evitando la formazione di schiuma.
8. Aspirare (o far decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
9. Lavare ancora tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di Soluzione di lavaggio e aspirare (o far decantare).
10. Dopo l'ultimo lavaggio, lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
11. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette dei calibratori 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette del calibratore zero (B0).

$$B/B0(\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di 1,25(OH)₂ Vitamina D, tracciare la curva di calibrazione, scartando i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatico. In tal caso, utilizzare una curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di calibrazione dei rapporti di competizione dei campioni e dei controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 1,25(OH)₂ Vitamina D.
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di 1,25(OH)₂ Vitamina D nei campioni e controlli al posto della curva di calibrazione eseguita al momento.

| 1,25(OH) ₂ VITAMINA D | cpm | B/B0 (%) | |
|----------------------------------|--|---|---|
| Attività totale | 43937 | | |
| Calibratore | 0,0 pg/ml 6,0 pg/ml 20,0 pg/ml 63,0 pg/ml 230,0 pg/ml 430,0 pg/ml | 16687 15268 12345 8033 3554 2148 | 100,0 91,5 74,0 48,1 21,3 12,9 |

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Sono stati analizzati venti replicati di calibratore zero, insieme a una serie di altri calibratori.

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni standard, è risultata essere 1,4 pg/ml.

B. Specificità

Le percentuali di reattività incrociata stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione del 50% sono riportate nella tabella.

| Composto | Reattività incrociata (%) |
|-------------------------------------|---------------------------|
| 1,25(OH) ₂ -Vitamina D3 | 100,00 |
| 1,25(OH) ₂ -Vitamina D2 | 92,31 |
| 25OH-Vitamina D3 | 0,001 |
| 24,25(OH) ₂ -Vitamina D3 | 0,005 |
| 25,26(OH) ₂ -Vitamina D3 | 0,20 |

Nota : questa tabella mostra la reattività incrociata relativa all'anticorpo anti-1,25(OH)₂ Vitamina D

Le prestazioni dell'analisi non sono influenzate dall'emolisi (emoglobina analizzata: 5 g/L), dalla bilirubinemia (bilirubina analizzata: 1 g/L) o dai trigliceridi (analizzati: 2,5 g/L).

L'acido ascorbico (Vitamina C, analizzati: 1g/L) e il coniugato della bilirubina (analizzati: 1g/L) non interferiscono con questa analisi.

C. Precisione

INTRA-SAGGIO

INTER-SAGGIO

| Siero | N | <X> ± DS (pg/ml) | CV (%) | Siero | N | <X> ± DS (pg/ml) | CV (%) |
|-------|----|------------------|--------|-------|----|------------------|--------|
| A | 20 | 24,6 ± 1,7 | 7,1 | A | 10 | 13,6 ± 1,7 | 12,7 |
| B | 20 | 78,6 ± 3,9 | 5,0 | B | 10 | 32,3 ± 3,6 | 11,3 |

DS: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

| Diluizione del campione | Concentraz. teorica (pg/ml) | Concentraz. misurata (pg/ml) | Recupero (%) |
|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------|
| 1/1 | 70,0 | 70,0 | 100% |
| 1/2 | 35,0 | 35,7 | 102% |
| 1/4 | 17,5 | 14,5 | 83% |
| 1/8 | 8,8 | 7,8 | 89% |
| 1/16 | 4,4 | 4,6 | 105% |

Il campione è stato diluito con la Soluzione di eluizione.

TEST DI RECUPERO

| 1,25(OH)2-Vit.D aggiunta (pg/ml) | Concentraz. di 1,25(OH)2 Vit.D totale misurata | | Recupero (%) |
|--|---|--------------------------------|-----------------|
| | Totale (pg/ml) | Con sottraz. bianco (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 46,3 | 23,8 | 95,2% |
| 50,0 | 70,0 | 47,5 | 95,0% |
| 100,0 | 122,7 | 100,2 | 100,2% |

| 1,25(OH)2-Vit.D aggiunta (pg/ml) | Concentraz. di 1,25(OH)2 Vit.D totale misurata | | Recupero (%) |
|--|---|--------------------------------|-----------------|
| | Totale (pg/ml) | Con sottraz. bianco (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 52,1 | 29,6 | 118,4% |
| 50,0 | 70,4 | 47,9 | 95,8% |
| 100,0 | 112,9 | 90,4 | 90,4% |

Fattore di conversione:

Da pg/ml a pmol/l: x 2,4

Da pmol/l a pg/ml: x 0,42

Al momento non risulta disponibile un calibratore di riferimento internazionale per questo parametro.

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti per il Controllo 1 e/o il Controllo 2 non rientrano nei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi non vanno utilizzati, salvo vi sia una giustificazione soddisfacente per tale discrepanza.
- Ciascun laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati dei campioni in duplicato devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio dovrà stabilire i propri intervalli normali.

L'intervallo analizzato è basato sui percentili da 2,5% a 97,5%.

| Popolazione | Intervallo (pg/ml) | Media | DS | n |
|---------------|-----------------------|-------|------|----|
| Soggetti sani | 19,6 – 54,3 | 35,3 | 10,6 | 51 |

XVI. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico *in vitro*.

Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) che emette radiazioni X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti. Questo prodotto radioattivo può essere inviato a e utilizzato solo da personale autorizzato. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti alle normative vigenti nel paese dell'utilizzatore finale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato a esseri umani o animali.

Tutte le manipolazioni di materiale radioattivo vanno eseguite in un'area riservata, lontano da vie di passaggio comuni. Nel laboratorio deve essere presente un registro di carico e scarico del materiale radioattivo aggiornato regolarmente. Le apparecchiature di laboratorio e la vetreria, potenzialmente contaminati da sostanze radioattive, devono essere dedicati all'uso esclusivo dei diversi isotopi, per evitare contaminazioni incrociate tra isotopi.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo bonificare immediatamente seguendo le procedure di sicurezza locali in materia di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le normative e le linee guida locali. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

I derivati da sangue umano presenti nel kit sono stati analizzati con metodi approvati da organismi di controllo europei o dalla FDA e si sono rivelati negativi per gli anticorpi HBs Ag, anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2. Nessun metodo noto può offrire la certezza assoluta che un derivato da sangue umano non possa trasmettere epatite, AIDS o altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. È comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto dell'epidermide con reattivi contenenti come conservante l'azoturo di sodio. L'azoturo di sodio può reagire con il piombo, il rame o l'ottone presenti nelle tubature di scarico, formando azoturi metallici esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli

scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o applicare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. SCHEMA DEL PROTOCOLLO

| | Attività totale ml | Calibratori ml | Campioni Controlli ml |
|--|---|----------------------------|-----------------------------|
| ESTRAZIONE | | | |
| Calibratore | - | - | - |
| Campioni, controlli | - | - | 500 |
| Solvente di estrazione | - | - | 2000 |
| Agitazione Centrifugazione | 1 ora a 1200 rpm 5 minuti a 800 g | | |
| SEPARAZIONE | | | |
| Supernatante dalla fase di estrazione | - | - | 1600 |
| CARTUCCIA | | | |
| Supernatante | | 1600 μ l | |
| Solvente di lavaggio | | 1000 μ l | |
| Diclorometano | | 300 μ l | |
| Acqua distillata | | 300 μ l | |
| Centrifugazione | | 5 minuti a 800 g | |
| Soluzione di eluizione | | 400 μ l | |
| Centrifugazione | | 5 minuti a 800 g | |
| | | Vortexare | |
| INCUBAZIONE | | | |
| Calibratore | - | 150 | - |
| Campioni estratti | - | - | 150 |
| Tracciante radioattivo | 500 | 500 | 500 |
| Incubazione | Per tutta la notte a temperatura ambiente | | |
| Separazione | - | Aspirare (o far decantare) | |
| Soluzione di lavaggio | - | 2 ml | |
| Separazione | - | Aspirare (o far decantare) | |
| Soluzione di lavaggio | - | 2 ml | |
| Separazione | - | Aspirare (o far decantare) | |
| Conteggio | Contare le provette per 1 minuto | | |

| | | |
|--|----------------------------|----------------------------|
| Numero di catalogo di DIASource : KIP1929 | Numero P.I.: 1700602/it | Revisione n. : 140108/1 |
|--|----------------------------|----------------------------|



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de la 1,25(OH)₂-Vitamina D (1,25(OH)₂-Vit.D) humana en suero y plasma.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1929 : 48 tests
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. Actividades biológicas

La vitamina D₃ es principalmente sintetizada en la piel de 7- dehidrocolesterol y es parcialmente de origen dietético. En el hígado, la vitamina D₃ es hidroxilada sobre el carbono 25 para producir el intermediario necesario 25-OH-D₃. La 25-OH-D₃ se debe metabolizar más antes de que pueda efectuar las funciones de la Vitamina D en el intestino, el riñón y el hueso. Esta reacción se efectúa solamente en el riñón de un mamífero no embarazado. Así la 25-OH-D₃ es hidroxilada más en la posición 1 α para producir la 1 α ,25 dihidroxivitamina D₃ (1 α ,25-(OH)₂D₃).

Además del tejido renal, la placenta de mujeres embarazadas y las células macrofagas en caso de sarcoidosis también pueden producir una cantidad de 1 α ,25-(OH)₂D₃. La 1 α ,25-(OH)₂D₃ es la forma activa de la Vitamina D en relación con las funciones conocidas, mientras que la 25-OH-D₃ y la Vitamina D₃ misma pueden ser excluidas como factores fisiológicamente funcionales. Visto que la 1 α ,25-(OH)₂D₃ es producida en el riñón y tiene unas funciones en el hueso y en el intestino, debe ser considerada como una hormona. Esta hormona estimula la absorción intestinal del calcio y del fósforo. Estimula también la resorción y la mineralización óseas y evita así el desarrollo del raquitismo y de la osteomalacia.

La 1 α ,25-(OH)₂D₃ también puede ser activa en otros tejidos responsables del transporte del calcio (placenta, riñón, glándula mamaria, ...) y en glándulas endocrinas como las glándulas paratiroides. La 1 α ,25-(OH)₂D₃ es metabolizada rápidamente y la duración de su vida en plasma es aproximadamente 2-4 h. Su metabolito principal es el ácido calcitrico, un derivado carboxílico con 23 C sin actividad biológica particular. Además de esta vía, la 1 α ,25-(OH)₂D₃ experimenta una 24-hidroxilación para producir la 1,24,25-trihidroxivitamina D₃. Este componente tiene menos actividad biológica que su antecesor y su metabolismo es considerado como una vía inferior.

Los niveles de la 1 α ,25-(OH)₂D₃ en plasma o en suero son 100 a 1000 menos que los de la 25-OH-D₃. Debido a sus concentraciones bajas y a la presencia de muchos metabolitos similares, la medición de la 1 α ,25-(OH)₂D₃ necesita extracción y separación por HPLC o por cromatografía en columna.


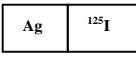
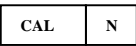
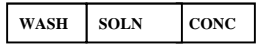
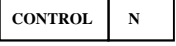

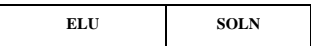
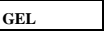
B. Aplicaciones clínicas

La medición de la 1 α ,25-(OH)₂D₃ es indicada con unas enfermedades que afectan el metabolismo de calcio como : sarcoidosis, deficiencia renal, hiper y hipo-paratiroidismo, raquitismo, hipercalcemia asociada con un tumor, disfunción resistente a la vitamina y tratamiento con medicación anti-convulsiva.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Solamente las muestras y los controles, no los calibradores, son extraídos con una mezcla de solventes y aplicados a los cartuchos para separar la 1,25(OH)₂ Vitamina-D de otros metabolitos de Vitamina-D. Después de la elución de las muestras y de los controles, los calibradores, las muestras y los controles son incubados en tubos recubiertos. Una cantidad fija de 1,25(OH)₂ Vitamin-D marcada con I¹²⁵ compete con el 1,25(OH)₂ Vitamin-D a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Después de una noche de incubación a temperatura ambiente, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de 1,25(OH)₂ Vitamin-D de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

| Reactivos | Kit 48 test | Código de Color | Reconstitución |
|--|----------------------------|-----------------|--|
|  Tubos recubiertos con anti 1,25(OH) ₂ Vitamin-D | 1 x 48 | Verde | Listo para uso |
|  TRAZADOR: 1,25(OH) ₂ Vitamin-D marcado con I ¹²⁵ (grado HPLC) en tampón fosfato con caseína bovina y gentamicina | 1 vial liofilizados 75 kBq | Rojo | Añadir 26 ml de solución de reconstitución |
|  CAL N Calibradores 1,25(OH) ₂ Vitamin-D - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en tampón fosfato con caseína bovina y gentamicina | 5 viales liofilizados | amarillo | Añadir 2 ml de Solución de elución |
|  WASH SOLN CONC Solución de lavado (TRIS-HCl) | 1 vial 10 ml | marrón | Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético) |
|  CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y gentamicina | 2 viales liofilizados | plateado | Añadir 2 ml de agua destilada |
|  REC SOLN Solución de reconstitución: tampón fosfato con caseína bovina y azida (<0,1%) | 1 vial 30 ml | Negro | Listo para uso |
|  ELU SOLN Solución de elución: tampón fosfato con caseína bovina, metanol y azida (<0,1%) | 1 vial 30 ml | Verde | Listo para uso |
|  GEL Cartuchos Bond Elut Silica | 20 | | Guardar a T.A. |

Nota: Utilizar la solución de elución como el calibrador 0 y para diluir las muestras con valores superiores al calibrador más elevado (diluir después de la fase de separación).

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Diisopropiléter. (p.a.)
3. Ciclohexano. (p.a.)
4. Acetate de etilo. (p.a.)
5. Alcohol etílico puro. (p.a.)
6. Diclorometano. (p.a.)

NB: Un kit de extracción de DIASource que contiene todos estos solventes está disponible con la referencia: 3019700. Este kit contiene las cantidades de solvente necesarias para realizar 5 x 48 pruebas de 1,25(OH)₂VIT.D-RIA-CT.

7. Pipetas de 200µl, 500µl, 1 ml y 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
8. Tubos de cristal (12 x 75 mm) para la extracción y la elución (cerrados con un tapón para la fase de extracción)

9. Tubos de cristal (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm), o tubos de polipropileno (falcon 2097), para el lavamiento de los cartuchos.
10. Vortex
11. Agitador magnético
12. Centrifugador funcionando a 800 g.
13. Agitador de tubos (1200 rpm)
14. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
15. Sistema de aspiración (opcional)
16. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- Calibradores:** Reconstituir calibradores con 2 ml del Solución de elución (**justo antes de la fase de incubación**).
- Controles:** Reconstituir los controles con 2 ml de agua destilada.
- I¹²⁵ 1,25(OH)₂-Vitamina.D** : Reconstituir con 26 ml de la solución de reconstitución.
- Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.
- Solvente de extracción** : 2 ml es necesario para cada muestra o control que debe ser probado. **Prepare una solución fresca** de diisopropiléter, ciclohexano, acetate de etilo, (50, 40, 10 v/v).
- Solvente de lavamiento** : 1 ml es necesario para cada muestra o control que debe ser probado. **Prepare una solución fresca** de diisopropiléter, ciclohexano, acetate de etilo, alcohol etílico puro (50, 40, 10 ,1 v/v).

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C; excepto los cartuchos que deben ser guardados a temperatura ambiente.
- Los calibradores y controles son muy inestables, utilizar inmediatamente después de la reconstitución, congelar inmediatamente en alícuotas y guardar a -20°C durante 3 meses. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Utilizar los solventes de extracción y de lavamiento frescos, no pueden ser guardados.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero ó plasma deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Después de la descongelación, las muestras deben ser vortexadas y centrifugadas.
- Suero ó plasma (en heparina ó EDTA) presentan resultados similares

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

I. Fase de extracción : ! Solamente para controles y muestras.

1. Marcar los tubos de cristal (12x75 mm) para la extracción: 2 controles y hasta 16 muestras.
2. Añadir 0.5 ml del control o de la muestra a los tubos respectivos.
3. Dispensar 2 ml del solvente de extracción en cada tubo.
4. Los tubos son cerrados con un tapón y puestos en un agitador durante 1 h. a 1200 rpm.
5. Centrifugar cada tubo durante 5 minutos a temperatura ambiente (a 800 g).
6. Supernatantes son necesarios para la fase siguiente de la separación.

II. Fase de separación : ! Solamente para controles y muestras

1. Marcar los tubos de cristal (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm), o tubos de polipropileno (falcon 2097) para el lavamiento de los cartuchos : 2 controles y hasta 16 muestras.
2. Añadir un cartucho "Bond Elut" a cada tubo.
3. Aplicar 1,6 ml del supernatante (2 x 0,8 ml) obtenido después de la fase de extracción al cartucho.
4. Lavar los cartuchos con 1 ml de solvente de lavamiento (cf preparación). ! Nunca aplicar un vacío a los cartuchos, dejar penetrar el solvente a causa de la gravedad.
5. Añadir 300 µl de dichlorometano a cada cartucho, dejar penetrar a causa de la gravedad.
6. Añadir 300 µl de agua destilada a cada cartucho.
7. Centrifugar cada tubo durante 5 minutos a temperatura ambiente (a 800 g).
8. Marcar los tubos de cristal (12 x 75 mm) para la elución de la 1,25(OH)₂-Vitamina D. Después de la centrifugación, trasladar los cartuchos a los tubos de cristal apropiados.
9. Aplicar 400 µl de la solución de elución a cada cartucho para la elución de la 1,25 (OH)₂-Vitamina D y centrifugar durante 5 minutos a temperatura ambiente (a 800 g).
10. **Vortexar** la fracción.

Nota : Después de esta fase, las muestras deben ser incubadas en tubos recubiertos lo más pronto posible para evitar una degradación.

III. Fase de incubación :

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores (Utilizar la solución de elución como el calibrador 0), muestras extraídas y controles y dispensar 150 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 0,5 ml de 1,25(OH)₂ Vitamin-D marcado con I¹²⁵ en cada tubo, incluyendo los tubos descubiertos a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja cautiva de las paredes de los tubos.
5. Incubar durante Una noche a T.A.
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
8. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales).
9. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar.
10. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$

respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente formula:

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B₀%) de cada calibrador frente a las concentraciones del 1,25(OH)₂ Vitamin-D de cada calibrador, rechazando los extremos claros. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de calculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica " 4 parámetros".
4. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
5. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de 1,25(OH)₂ Vitamin-D no marcado (B₀/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

| 1,25(OH) ₂ VITAMIN-D | | cpm | B/Bo (%) |
|---------------------------------|-------------|-------|----------|
| Cuentas Totales | | 43937 | |
| Calibrador | 0,0 pg/ml | 16687 | 100,0 |
| | 6,0 pg/ml | 15268 | 91,5 |
| | 20,0 pg/ml | 12345 | 74,0 |
| | 63,0 pg/ml | 8033 | 48,1 |
| | 230,0 pg/ml | 3554 | 21,3 |
| | 430,0 pg/ml | 2148 | 12,9 |

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 1,4 pg/ml.

B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada estimada por la comparación de la concentración (indicando una inhibición de 50 %) es respectivamente :

| Componente | Reacción-cruzada (%) |
|-------------------------------------|----------------------|
| 1,25(OH) ₂ -Vitamina.D3 | 100 |
| 1,25(OH) ₂ -Vitamina.D2 | 92,31 |
| 25OH-Vitamina-D3 | 0,001 |
| 24,25(OH) ₂ -Vitamina.D3 | 0,005 |
| 25,26(OH) ₂ -Vitamina.D3 | 0,20 |

Nota: esta tabla presenta la reacción cruzada para el anti 1,25(OH)₂ Vitamin-D

El rendimiento del ensayo no está afectado por la hemólisis (5 g/l de hemoglobina analizada), bilirrubinemia (1 g/l de bilirrubina analizada) o triglicéridos (2,5 g/l analizado).

Ácido ascórbico (Vitamina C)(1 g/l analizado) y bilirrubina conjugada (1 g/l analizada) no interfieren con este ensayo.

C. Precision

PRECISION INTRA-ENSAYO

PRECISION INTER-ENSAYO

| Suero | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Suero | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
|-------|----|------------------|--------|-------|----|------------------|--------|
| A | 20 | 24,6 ± 1,7 | 7,1 | A | 10 | 13,6 ± 1,7 | 12,7 |
| B | 20 | 78,6 ± 3,9 | 5,0 | B | 10 | 32,3 ± 3,6 | 11,3 |

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

| Dilución de la muestra | Concentración Teórica (pg/ml) | Concentración medida (pg/ml) | Recuperación (%) |
|------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------|
| 1/1 | 70,0 | 70,0 | 100% |
| 1/2 | 35,0 | 35,7 | 102% |
| 1/4 | 17,5 | 14,5 | 83% |
| 1/8 | 8,8 | 7,8 | 89% |
| 1/16 | 4,4 | 4,6 | 105% |

Las muestras fueron diluidas con la Solución de elución

TEST DE RECUPERACIÓN

| 1,25(OH) ₂ -Vit.D añadida (pg/ml) | Concentración medida de 1,25(OH) ₂ Vit.D | | Recuperación (%) |
|--|---|--------------|------------------|
| | Total (pg/ml) | Neta (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 46,3 | 23,8 | 95,2% |
| 50,0 | 70,0 | 47,5 | 95,0% |
| 100,0 | 122,7 | 100,2 | 100,2% |
| 1,25(OH) ₂ -Vit.D añadida (pg/ml) | Concentración medida de 1,25(OH) ₂ Vit.D | | Recuperación (%) |
| | Total (pg/ml) | Neta (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 52,1 | 29,6 | 118,4% |
| 50,0 | 70,4 | 47,9 | 95,8% |
| 100,0 | 112,9 | 90,4 | 90,4% |

Factor de conversión:

De pg/ml a pmol/L : x 2,4
De pmol/L a pg/ml : x 0,42

De acuerdo con nuestros conocimientos, no existe ninguna preparación de referencia internacional de este parámetro.

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

El alcance, basado en percentilos de 2,5% a 97,5%..

| Población | Alcance (pg/ml) | Medio | SD | n |
|----------------|-----------------|-------|------|----|
| Temas normales | 19,6 – 54,3 | 35,3 | 10,6 | 51 |

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA ó otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser consideradas como potencialmente infecciosas.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193

6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

| | CUENTAS TOTALES (µl) | CALIBRADORES (µl) | MUESTRA(S) CONTROL(S) (µl) |
|---------------------------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| EXTRACCIÓN | | | |
| Calibradores | - | - | - |
| Muestras, controles | - | - | 500 |
| Solvente de Extracción | - | - | 2000 |
| Agitación | 1 hora a 1200 rpm | | |
| Centrifugación | 5 minutos a 800 g | | |
| SEPARACIÓN | | | |
| Supernatante de la fase de extracción | - | - | 1600 |
| CARTUCHO | | | |
| Supernatante | 1600 µl | | |
| Solvente de lavamiento | 1000 µl | | |
| Diclorometano | 300 µl | | |
| Agua destilada | 300 µl | | |
| Centrifugación | 5 minutos a 800 g | | |
| Solución de elución | 400 µl | | |
| Centrifugación | 5 minutos a 800 g | | |
| Vortexar | | | |
| INCUBACIÓN | | | |
| Calibradores | - | 150 | - |
| Muestras extraídas | - | - | 150 |
| Trazador | 500 | 500 | 500 |
| Incubación | Una noche a T.A. | | |
| Separación | - | aspirar (o decantar) | |
| Solución de lavado de trabajo | - | 2 ml | |
| Separación | - | aspirar (o decantar) | |
| Solución de lavado de trabajo | - | 2 ml | |
| Separación | - | aspirar (o decantar) | |
| Contaje | Contar los tubos durante 60 segundos | | |

| | | |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogo Nr : KIP1929 | P.I. Numero : 1700602/es | Revisión nr : 140108/1 |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|

Fecha de la revisión : 2014-01-08

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para a determinação quantitativa *in vitro* da 1,25(OH)₂-Vitamina D (1,25(OH)₂-Vit.D) humana no soro e no plasma.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome do proprietário :** DIAsource Vitamina D 1,25(OH)₂ -CT Kit
- B. **Número do catálogo :** KIP1929 : 48 testes
- C. **Produzido por :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica , contacte :
Bélgica Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91
Ou o representante local

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

A. Actividades Biológicas

A Vitamina D3 é maioritariamente sintetizada na pele a partir do 7-deidrocolesterol e é obtida parcialmente através da dieta. No fígado, a Vitamina D3 é hidroxilada em carbono 25 para produzir o seu intermediário obrigatório, o 25-OH-D3. O 25-OH-D3 tem de ser posteriormente metabolizado antes de poder desempenhar qualquer uma das funções da Vitamina D no intestino, rim e ossos. Esta reacção subsequente acontece apenas no rim nos mamíferos não-grávidos. Deste modo o 25-OH-D3 é novamente hidroxilado na posição 1 α - para produzir a dihidroxivitamina D3 1 α , 25 (1 α ,25-(OH)₂D3).

Para além do tecido renal, a placenta das mulheres grávidas e as células dos macrófagos, em caso de sarcoidose, podem também produzir alguma quantidade de 1 α , 25-(OH)₂D3. A 1 α , 25-(OH)₂D3 é a forma activa da Vitamina D, tendo em conta as suas funções conhecidas, ao passo que a 25-OH-D3 e a própria Vitamina D3 podem ser excluídas como sendo fisiologicamente funcionais. Para além disto, uma vez que a 1 α ,25-(OH)₂D3 é produzida no rim e desempenha algumas das suas funções no osso e intestino, esta terá de ser considerada como uma hormona. Esta hormona estimula a absorção intestinal de ambos, cálcio e fósforo. Além disso, estimula a reabsorção e mineralização ósseas, prevenindo deste modo o desenvolvimento de raquitismo e de osteomalácia.

A 1 α , 25-(OH)₂D3 também poderá actuar noutros tecidos responsáveis pelo transporte de cálcio (placenta, rim, glândula mamária, ...) e noutras glândulas endócrinas com as glândulas paratiróideias. A 1 α , 25-(OH)₂D3 é rapidamente metabolizada e o seu tempo de vida é de aproximadamente 2-4 h no plasma. O principal metabolito a que dá origem é o ácido calcitroico, um derivado carboxílico do C-23, sem qualquer tipo de actividade biológica. Para além deste percurso, a 1 α , 25-(OH)₂D3 passa por 24 hidroxilações para produzir a 1,24,25-trihidróxi-Vitamina D3. Este composto tem menos actividade biológica do que aquele que lhe deu origem e o seu metabolismo é considerado como uma via acessória

Os níveis de 1 α , 25-(OH)₂D3 no plasma ou no soro são entre 100 a 1000 vezes menores do que os de 25-OH-D3. Devido às suas baixas concentrações e à presença de muitos metabolitos semelhantes, as análises da 1 α , 25-(OH)₂D3 requerem a sua extracção e separação feita por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) ou por cromatografia de coluna.

B. Aplicação clínica


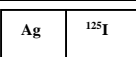
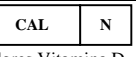
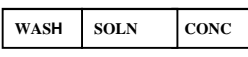
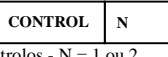
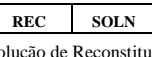
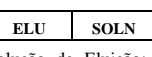

A medição da 1 α , 25-(OH)₂D3 circulante está indicada em diversas doenças que afectam o metabolismo do cálcio, tais como: sarcoidose, falência renal, hiper e hipoparatiroidismo, raquitismo, hipercalcemia associada a tumor, disfunção vitamino-resistente e tratamento com medicação anticonvulsivante.

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Apenas as amostras e os controlos e não os calibradores, são extraídos com uma mistura de solventes e aplicados em cartuchos para se proceder à separação da Vitamina D $1,25(\text{OH})_2$ de outros metabolitos da Vitamina D. Concluído o processo de eluição das amostras e controlos, os calibradores, amostras e controlos são incubados em tubos revestidos.

Uma quantidade fixa de Vitamina D $1,25(\text{OH})_2$, marcada com ^{125}I , compete com a Vitamina D $1,25(\text{OH})_2$ a ser medida, que esteja presente na amostra ou no calibrador, para uma quantidade fixa de locais de anticorpo, que é imobilizado nas paredes dos tubos de poliestireno. Após permanecer de um dia para o outro em incubação à temperatura ambiente, a reação de competição termina com a operação de aspiração. A seguir, os tubos são lavados com 2 ml de solução de lavagem de trabalho e novamente aspirados. Traça-se uma curva de calibração e as concentrações de Vitamina D $1,25(\text{OH})_2$ nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

| Reagentes | Kit 48 Testes | Código de cor | Reconstituição |
|--|---------------------------------|---------------|--|
|  Tubos revestidos com anti Vitamina D $1,25(\text{OH})_2$ | 1 x 48 | verde | Pronto para utilizar |
|  Marcador: Vitamina D $1,25(\text{OH})_2$ marcado com ^{125}I (grau HPLC) em tampão fosfato com caseína bovina e gentamicina | 1 recipiente liofilizado 75 kBq | vermelho | Adicione 26 ml de solução de reconstituição |
|  Calibradores Vitamina D $1,25(\text{OH})_2$ N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) em tampão fosfato com caseína bovina e gentamicina | 5 recipientes liofilizados | amarelo | Adicione 2 ml de Solução de Eluição |
|  Solução de lavagem (TRIS-HCl) | 1 recipiente 10 ml | castanho | Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético). |
|  Controlos - N = 1 ou 2 No plasma humano e gentamicina | 2 recipientes liofilizados | prateado | Adicione 2 ml de água destilada |
|  Solução de Reconstituição: em tampão fosfato com caseína bovina e azida (<0,1%) | 1 recipiente 30 ml | preto | Pronto para utilizar |
|  Solução de Eluição: em tampão fosfato com caseína bovina, metanol e azida (<0,1%) | 1 recipiente 30 ml | verde | Pronto para utilizar |
|  Cartuchos Bond Elut Silica | 20 | | Armazenar à T.A. |

Note : Utilize a solução de eluição como o Calibrador 0 e para diluição de amostras com concentrações superiores, aos do calibrador mais elevado (proceda à diluição após concluir a fase de separação).

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material será necessário, mas não é fornecido com o kit:

1. Água destilada
2. Diisopropiléter. (p.a.)
3. Ciclohexano. (p.a.)
4. Acetato de etilo. (p.a.)
5. Etanol absoluto. (p.a.)
6. Diclorometano (p.a.)

Nota: Um kit de extração DIASource contendo todos estes solventes está disponível sob a referência: 3019700. Este kit contém quantidades de solventes necessários para realizar 5 x 48 testes de 1,25 (OH) 2-VIT.D-RIA-CT.

7. Pipetas automáticas: 200 μl , 500 μl , 1 ml e 2 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)

8. Tubos de vidro (12 x 75 mm) para proceder à extracção e eluição (fechados com uma tampa durante o processo de extracção).
9. Tubos de vidro (16 x 100 mm) ou (12 x 120 mm), ou tubos em polipropileno (falcon 2097), para a lavagem dos cartuchos.
10. Misturador de vórtice
11. Agitador magnético
12. Centrifugadora a 800 g
13. Agitador de tubos (1200 rpm)
14. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
15. Sistema de aspiração (opcional)
16. Qualquer contador de raios gama capaz de medir ^{125}I pode ser utilizado (alcance mínimo de 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- Calibradores:** Reconstitua os controlos com 2 ml de Solução de Eluição (**imediatamente antes de iniciar o processo de incubação**).
- Controlos:** Reconstitua os controlos com 2 ml de água destilada.
- ^{125}I Vitamina D $1,25(\text{OH})_2$:** Reconstituir com 26 ml de solução de reconstituição.
- Solução de lavagem de trabalho:** Prepare um volume adequado de Solução de lavagem de trabalho adicionando 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Rejeite a solução não utilizada no final do dia.
- Solvente de extracção:** É necessário 2 ml por cada controlo ou amostra que forem testados. **Prepare uma solução fresca** com diisopropiléter, ciclohexano e acetato de etilo (50, 40, 10 v/v).
- Solvente de Lavagem:** São necessários 1 ml por cada controlo ou amostra que forem testados. **Prepare uma solução fresca** com diisopropiléter, ciclohexano, acetato de etilo e etanol absoluto (50, 40, 10, 1 v/v).

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos e reconstituídos, todos os componentes do kit são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que sejam mantidos em temperaturas entre 2 e 8°C; isto não é aplicável aos cartuchos, que deverão ser armazenados à temperatura ambiente.
- Os calibradores e os controlos são muito instáveis, utilize-os imediatamente após a sua reconstituição, congele-os logo de seguida em aliquotas e mantenha-os à temperatura de -20°C durante três meses. Evite realizar ciclos de congelamento e descongelamento destes elementos posteriormente a isto.
- A solução de lavagem de trabalho deve ser feita e utilizada no mesmo dia.
- Depois da 1ª utilização o marcador é estável até final do prazo de validade, desde que mantido no recipiente original, bem fechado entre os 2 e os 8°C.
- Utilize solventes de extracção e solventes de lavagem preparados de fresco, não os armazene.
- Alterações no aspecto dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro ou plasma devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Se a análise não for realizada em 24 h, recomenda-se conservar a -20°C.
- Evite ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos.
- Após o descongelamento, as amostras devem ser agitadas no vortex e centrifugadas.
- Soro ou Plasma (heparinizado ou EDTA) dão resultados similares

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes lotes. Antes de utilizar todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (TA). Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável, para adição de cada componente. Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação. Prepare uma curva de calibração para cada análise, não utilize dados de análises prévias.

B. Procedimento

I. Procedimento de extracção: ! Apenas para controlos e amostras.

1. Tubos de vidro graduados (12x75 mm) para proceder à extracção de 2 controlos e de, até, 16 amostras.
2. Adicione 0.5 ml de controlo ou de amostra nos tubos respectivos.
3. Verta 2 ml do solvente de extracção em cada tubo.
4. Encerre os tubos com uma tampa e coloque-os no misturador durante uma hora a 1200 rpm.

5. Proceda à centrifugação de cada tubo durante 5 minutos à temperatura ambiente (a 800 g).
6. Os sobrenadantes serão utilizados durante o próximo passo, o procedimento de separação.

II. Procedimento de separação: ! Apenas para controlos e amostras

1. Tubos de vidro etiquetados (16 x 100 mm) ou (12 x 120 mm), ou tubos polipropileno (falcon 2097), para lavagem dos cartuchos: 2 controlos e, até, 16 amostras.
2. Coloque um cartucho "Bond Elut" em cada tubo.
3. Verta no cartucho 1,6 ml da matéria fluante (2 x 0,8 ml) obtida no final do procedimento de extração.
4. Após isto, lave os cartuchos utilizando 1 ml de solvente de lavagem (cf preparação dos reagentes). ! Cuidado, nunca faça a aplicação de vácuo nos cartuchos, permita que o solvente escorra apenas pela força da gravidade.
5. Adicione 300 µl de diclorometano em cada cartucho e deixe equilibrar, utilizando a força da gravidade.
6. Adicione 300 µl de água destilada em cada cartucho.
7. Proceda à centrifugação de cada tubo durante 5 minutos à temperatura ambiente (a 800 g).
8. Rotule os tubos de vidro graduados (12 x 75 mm) para a eluição de Vitamina D 1,25(OH)₂. Após a centrifugação faça a transferência do conteúdo dos cartuchos para os seus correspondentes tubos de vidro.
9. Verta 400 µl de solução de eluição em cada um dos cartuchos para eluição da Vitamina D 1,25 (OH)₂ e proceda à sua centrifugação durante 5 minutos à temperatura ambiente (a 800 g).
10. Agite a fração eluída no vortex.

Nota: No final deste procedimento as amostras deverão ser incubadas em tubos revestidos, tão rapidamente quanto possível, de modo a evitar a sua degradação.

III. Procedimento de Incubação:

1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
2. Agite ligeiramente no vórtice calibradores (Utilize a solução de eluição como o Calibrador 0), amostras extraídas e controlos e verta 150 µl de cada, para os tubos respectivos.
3. Verta 0,5 ml de Vitamina D 1,25(OH)₂ marcado com I¹²⁵ para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
4. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
5. Proceda à sua incubação de um dia para o outro (Overnight) à temperatura ambiente
6. Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais). Certifique-se que a ponta de plástico do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remoção de todo o líquido.
7. Lave os tubos com 2 ml de Solução de Lavagem de Trabalho (excepto as contagens totais). Evite a formação de espuma durante a adição de Solução de Lavagem de Trabalho
8. Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais).
9. Lave novamente os tubos com 2 ml da Solução de Lavagem de Trabalho (excepto as contagens totais) e aspire (ou decante).
10. Após a última lavagem deixe os tubos na posição vertical durante 2 minutos e aspire até à última gota de líquido.
11. Conte os tubos num contador de radiação gama durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Calcule a média das determinações em duplicado.
2. Calcule a radioactividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

$$B/Bo(\%) = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

3. Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log trace os valores (B/Bo(%)) para cada ponto de calibração como uma função da concentração do Vitamina D 1,25(OH)₂ em cada ponto, rejeitando os "outliers" (casos aberrantes) óbvios.
4. Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibração. Se o processamento dos resultados for automático, recomenda-se a utilização de uma função logística de 4 parâmetros para a construção da curva.
5. Por interpolação dos valores das amostras (B/Bo(%)), determine as concentrações de Vitamina D 1,25(OH)₂ das amostras da curva de referência.
6. Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de Vitamina D 1,25(OH)₂ (B0/T) marcado, deve ser verificada.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes são apenas para exemplificação e nunca devem ser utilizados em detrimento dos dados reais da curva de calibração.

| Vitamina D 1,25(OH) ₂ -RIA-CT | cpm | B/Bo (%) |
|--|-------------|----------|
| Contagens total | 43937 | |
| Calibrador | 0,0 pg/ml | 16687 |
| | 6,0 pg/ml | 15268 |
| | 20,0 pg/ml | 12345 |
| | 63,0 pg/ml | 8033 |
| | 230,0 pg/ml | 3554 |
| | 430,0 pg/ml | 2148 |
| | | 100,0 |
| | | 91,5 |
| | | 74,0 |
| | | 48,1 |
| | | 21,3 |
| | | 12,9 |

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

A. Limite de detecção

Foram analisados 20 calibradores zero, juntamente com um conjunto de outros calibradores.

O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 1,4 pg/ml.

B. Especificidade

As percentagens de reacções cruzadas obtidas por comparação com as concentrações que atingem uma inibição de 50% são, respectivamente, as que seguidamente se apresentam:

| Composto | Reactividade Cruzada (%) |
|------------------------------------|--------------------------|
| Vitamina D3 1,25(OH) ₂ | 100 |
| Vitamina D2 1,25(OH) ₂ | 92,31 |
| Vitamina D3 25OH | 0,001 |
| Vitamina D3 24,25(OH) ₂ | 0,005 |
| Vitamina D3 25,26(OH) ₂ | 0,20 |

Nota: esta tabela mostra a reactividade cruzada da anti Vitamina D 1,25(OH)₂

O desempenho do ensaio não é afetado pela hemólise (5 g / L de hemoglobina testado), bilirrubinemia (1 g / L de bilirrubina testados) ou triglicéridos (2,5 g / L testado).

Ácido ascórbico (vitamina C) (1 g / L testado) e conjugado de bilirrubina (1 g / L testado) não interferem com este ensaio.

C. Precisão

PRECISÃO INTRA-ENSAIO

PRECISÃO INTER-ENSAIO

| Soro | N | <X> ± DP (pg/ml) | CV (%) | Soro | N | <X> ± DP (pg/ml) | CV (%) |
|------|----|------------------|--------|------|----|------------------|--------|
| A | 20 | 24,6 ± 1,7 | 7,1 | A | 10 | 13,6 ± 1,7 | 12,7 |
| B | 20 | 78,6 ± 3,9 | 5,0 | B | 10 | 32,3 ± 3,6 | 11,3 |

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Exactidão

TESTE DE DILUIÇÃO

| Diluição da amostra | Concentração teórica (pg/ml) | Concentração medida (pg/ml) | Recuperado (%) |
|---------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------|
| 1/1 | 70,0 | 70,0 | 100% |
| 1/2 | 35,0 | 35,7 | 102% |
| 1/4 | 17,5 | 14,5 | 83% |
| 1/8 | 8,8 | 7,8 | 89% |
| 1/16 | 4,4 | 4,6 | 105% |

As amostras foram diluídas com Solução de Eluição.

TESTE DE RECUPERAÇÃO

| Adicionado 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Concentrações Medidas 1,25(OH) ₂ Vit.D Total (pg/ml) | Em branco (pg/ml) | Recuperado (%) |
|---|---|-------------------|----------------|
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 46,3 | 23,8 | 95,2% |
| 50,0 | 70,0 | 47,5 | 95,0% |
| 100,0 | 122,7 | 100,2 | 100,2% |

| Adicionado 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Concentrações medidas 1,25(OH) ₂ Vit.D | | Recuperado (%) |
|---|---|----------------------|-------------------|
| | Total (pg/ml) | Em branco (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 52,1 | 29,6 | 118,4% |
| 50,0 | 70,4 | 47,9 | 95,8% |
| 100,0 | 112,9 | 90,4 | 90,4% |

Factor de conversão:

De pg/ml para pmol/L : x 2,4
De pmol/L para pg/ml : x 0,42

Não existe material de referência internacional para este parâmetro, que seja do nosso conhecimento

XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou para o controlo 2 não estiverem dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, estes não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.
- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus próprios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas. Não faça ciclos de congelação/descongelação mais do que 2 vezes.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplicados das amostras devem basear-se nas Boas Práticas de Laboratório.

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Os valores normais indicados a seguir não deverão ser considerados como absolutos.

A margem alcançada observada, baseada em percentis situados entre os 2,5% e os 97,5%.

| População | Intervalo (pg/ml) | MÉDIA | SD | n |
|------------------|----------------------|-------|------|----|
| Assuntos normais | 19,6 – 54,3 | 35,3 | 10,6 | 51 |

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizantes. Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrados a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação radioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório, um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioactivo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade, deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioactivo deve ser rejeitado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. A adesão às regras básicas da segurança com radioactividade, fornece a protecção adequada.

Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe nenhum método, até agora conhecido, que ofereça total segurança quanto à impossibilidade de transmissão de hepatite, HIV ou outras infecções, por via do sangue humano. Por isso, deve manipular os reagentes, o soro ou o plasma de acordo com as regras locais de segurança, quanto a materiais potencialmente infecciosos.

Todos os produtos de origem animal e seus derivados foram recolhidos de animais saudáveis. Os componentes bovinos, vieram de países sem casos notificados de BSE. No entanto, todos estes componentes devem ser manipulados como sendo potencialmente infecciosos.

Evite o contacto da pele e mucosas com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida pode reagir com o chumbo e com o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Rejeitar com abundante quantidade de água corrente para evitar acumulações destes compostos.

Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não pipete com o auxílio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763

2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

| | CONTAGENS TOTAIS (µl) | CALIBRA- DORES (µl) | CONTROLOS DAS AMOSTRAS (µl) |
|--|--|---------------------------|-----------------------------------|
| EXTRACÇÃO | | | |
| Calibradores | - | - | - |
| Controlos, Amostras | - | - | 500 |
| Solvente de extracção | - | - | 2000 |
| Mistura Centrifugação | 1 hora a 1200 rpm 5 minutos a 800 g | | |
| SEPARAÇÃO | | | |
| Matéria flutuante resultante do procedimento de extracção | - | - | 1600 |
| CARTUCHO | | | |
| Matéria flutuante | | | |
| Solvente de | | 1600 µl | |
| Lavagem | | 1000 µl | |
| Diclorometano | | 300 µl | |
| Água destilada | | 300 µl | |
| Centrifugação | | 5 minutos a 800 g | |
| Solução de Eluição | | 400 µl | |
| Centrifugação | | 5 minutos a 800 g | |
| | | Vórtice | |
| INCUBAÇÃO | | | |
| Kalibratoren | - | 150 | - |
| Amostras extraídas | - | - | 150 |
| Tracer | 500 | 500 | 500 |
| Incubação | De um dia para o outro à T.A. | | |
| Separação | | | aspirar (ou decante) |
| Solução de lavagem de trabalho | - | - | 2,0 ml |
| Separação | | | aspirar (ou decante) |
| Solução de lavagem de trabalho | - | - | 2,0 ml |
| Separação | | | aspirar (ou decante) |
| Contagem | Contar os tubos durante 60 segundos | | |

| | | |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Nº do catálogo DIAsource : KIP1929 | Nº de P.I.: 1700602/pt | Nº de revisão: 140108/1 |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------|

Data da revisão: 2014-01-08

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης 1,25(OH)₂-Βιταμίνης D (1,25(OH)₂-Vit.D) στον ορό και το πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT της DIAsource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP1929: 48 προσδιορισμοί
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Βιολογική δράση

Η βιταμίνη D3 συντίθεται κυρίως στο δέρμα από την 7- δευδροχοληστερόλη και έχει εν μέρει διατροφική προέλευση. Στο ήπαρ, η βιταμίνη D3 υδροξυλιώνεται στον άνθρακα 25 και παράγει την αναγκαστικά ενδιάμεση ένωση 25-OH-D3. Η 25-OH-D3 πρέπει να μεταβολιστεί κι άλλο για να μπορέσει να εκτελέσει τις λειτουργίες της βιταμίνης D στα έντερα, τους νεφρούς και τα οστά. Αυτή η επακόλουθη αντίδραση λαμβάνει χώρα αποκλειστικά στους νεφρούς σε θηλαστικά που δεν βρίσκονται σε κατάσταση κύησης. Έτσι, η 25-OH-D3 υδροξυλιώνεται περαιτέρω στην 1α-θέση και παράγει την 1α,25 διυδροξυβιταμίνη D3 (1α,25-(OH)₂D3).

Εκτός του νεφρικού ιστού, ο πλακούντας εγκύων γυναικών και τα μακροφάγα κύτταρα, σε περίπτωση σαρκοειδών, μπορούν επίσης να παράγουν κάποια ποσότητα 1α,25-(OH)₂D3. Η 1α,25-(OH)₂D3 είναι η δραστική μορφή της Βιταμίνης D σε σχέση με τις γνωστές λειτουργίες, ενώ η 25-OH-D3 και η ίδια η βιταμίνη D3 μπορούν να εξαιρεθούν εφόσον είναι φυσιολογικά λειτουργικές. Επιπλέον, εφόσον η 1α,25-(OH)₂D3 παράγεται στους νεφρούς και έχει κάποιες από τις λειτουργίες της στα οστά και τα έντερα, πρέπει να θεωρείται ως ορμόνη. Αυτή η ορμόνη διεγείρει την εντερική απορρόφηση τόσο του ασβεστίου όσο και του φωσφόρου. Επίσης διεγείρει την οστική αναρρόφηση και προσθήκη μεταλλικών στοιχείων προλαμβάνοντας έτσι την ανάπτυξη ραχίτιδας και οστεομαλακίας.

Η 1α,25-(OH)₂D3 θα μπορούσε επίσης να είναι δραστική σε άλλους ιστούς υπεύθυνους για τη μεταφορά του ασβεστίου (πλακούντας, νεφρός, θηλαστικός αδένας, ...) και ενδοκρινείς αδένες όπως οι παραθυρεοειδείς αδένες. Η 1α,25-(OH)₂D3 μεταβολίζεται ταχέως και η ζωή της στο πλάσμα είναι περίπου 2-4 ώρες. Ο κύριος μεταβολίτης της είναι το καλσιτροϊκό οξύ, ένα καρβοξυλικό παράγωγο του C-23 ουσιαστικά χωρίς καμία βιολογική δράση. Επιπλέον με αυτήν την οδό, η 1α,25-(OH)₂D3 υπόκειται σε 24-υδροξυλίωση και παράγει 1,24,25-τριυδροξυ-Βιταμίνη D3. Η ένωση αυτή έχει μικρότερη βιολογική δράση από την πρόδρομη ένωση και αυτός ο μεταβολισμός θεωρείται ως ελάσσων οδός.

Τα επίπεδα της 1α,25-(OH)₂D3 στο πλάσμα ή τον ορό είναι 100 έως 1000 λιγότερο από εκείνα της 25-OH-D3. Λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεών της και της παρουσίας πολλών παρόμοιων μεταβολιτών, η μέτρηση της 1α,25-(OH)₂D3 απαιτεί εκχύλιση και διαχωρισμό είτε με HPLC είτε με χρωματογραφία στήλης.


B. Κλινική εφαρμογή

Η μέτρηση της κυκλοφορούσας 1α,25-(OH)₂D3 ενδείκνυται σε αρκετές διαταραχές που επηρεάζουν το μεταβολισμό του ασβεστίου όπως: σαρκοειδωση, νεφρική ανεπάρκεια, υπερ και υπο-θυρεοειδισμός, ραχίτιδα, υπερασβεστιαμία, δυσλειτουργία ανθεκτική στις βιταμίνες και θεραπεία με αντισπασμωδικά φάρμακα.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μόνο τα δείγματα και οι οροί ελέγχου, όχι οι βαθμονομητές, εκχολίζονται με ένα μείγμα διαλυτών και εφαρμόζονται σε φύσιγγες για το διαχωρισμό της 1,25(OH)₂ Βιταμίνης-D από άλλους μεταβολίτες της Βιταμίνης D. Μετά από έκλυση των δειγμάτων και των ορών ελέγχου, οι βαθμονομητές, τα δείγματα και οι οροί ελέγχου επωάζονται σε επιστρομένα σωληνάρια. Μια σταθερή ποσότητα 1,25(OH)₂ Βιταμίνης D σημασμένης με ¹²⁵I ανταγωνίζεται με την 1,25(OH)₂ Βιταμίνη D που θα μετρηθεί, η οποία υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Μετά από επώαση καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με διάλυμα πλύσης και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις 1,25(OH)₂ Βιταμίνης D των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

| Αντιδραστήρια | Κιτ 48 προσδιορισμών | Χρωματικός κωδικός | Ανασύσταση | | | |
|--|----------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------|--|--|
|  Σωληνάρια επιστρομένα με αντι 1,25(OH) ₂ -Βιταμίνη D | 1 x 48 | πράσινο | Έτοιμο για χρήση | | | |
| <table border="1" data-bbox="119 716 263 772"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: 1,25(OH) ₂ -Βιταμίνη D σημασμένη με ¹²⁵ Iωδίνη (τύπου HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη και γενταμικίνη. | Ag | ¹²⁵ I | 1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο 75 kBq | κόκκινο | Προσθέστε 26 ml διαλύματος ανασύστασης | |
| Ag | ¹²⁵ I | | | | | |
| <table border="1" data-bbox="119 907 263 963"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Βαθμονομητές - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη και γενταμικίνη | CAL | N | 5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα | κίτρινο | Προσθέστε 2 ml Διάλυμα έκλυσης | |
| CAL | N | | | | | |
| <table border="1" data-bbox="71 1108 327 1164"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl) | WASH | SOLN | CONC | 1 φιαλίδιο 10 ml | καφέ | Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα). |
| WASH | SOLN | CONC | | | | |
| <table border="1" data-bbox="71 1209 279 1265"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με γενταμικίνη | CONTROL | N | 2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα | ασημί | Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού | |
| CONTROL | N | | | | | |
| <table border="1" data-bbox="103 1377 279 1433"> <tr> <td>REC</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Διάλυμα ανασύστασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη και αζίδιο (<0,1%) | REC | SOLN | 1 φιαλίδιο 30 ml | μαύρο | Έτοιμο για χρήση | |
| REC | SOLN | | | | | |
| <table border="1" data-bbox="103 1556 279 1612"> <tr> <td>ELU</td> <td>SOLN</td> </tr> </table> Διάλυμα έκλυσης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη, μεθανόλη και αζίδιο (<0,1%) | ELU | SOLN | 1 φιαλίδιο 30 ml | πράσινο | Έτοιμο για χρήση | |
| ELU | SOLN | | | | | |
| <table border="1" data-bbox="111 1724 271 1780"> <tr> <td>GEL</td> </tr> </table> Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut | GEL | 20 | | Φύλαξη σε θερμ. δωματίου | | |
| GEL | | | | | | |

Σημείωση: Χρησιμοποιήστε διάλυμα έκπλυσης για τον μηδενικό βαθμονομητή και για την αραιώση των δειγμάτων για τιμές υψηλότερες από αυτές του υψηλότερου βαθμονομητή (αραιώστε μετά το στάδιο της διαχωρισμού).

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
 2. Διυσοπροπυλικός αθέρας. (p.a.)
 3. Κυκλοεξάνιο. (p.a.)
 4. Οξικός αιθυλεστέρας. (p.a.)
 5. Αιθανόλη 100% (p.a.)
 6. Διχλωρομεθάνιο (p.a.)
- Σημαντική σημείωση:** Ένα κιτ εκχολίσεως της **DIAsource** που περιέχει όλους αυτούς τους διαλύτες είναι διαθέσιμο με κωδικό: **3019700**. Αυτό το κιτ περιέχει ποσότητες διαλυτών που απαιτούνται για την εκτέλεση 5 x 48 εξετάσεων του **1,25(OH)₂-VIT-D-RIA-CT**.
7. Πιπέτες για διανομή: 200 μl, 500 μl, 1 ml και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
 8. Γυάλινα σωληνάρια (12 x 75 mm) για εκχολίση και έκλυση. (κλειστά με πώμα για το βήμα της εκχολίσεως)
 9. Υάλινα σωληνάρια (16 x 100 mm) ή (12 x 120 mm) ή σωληνάρια από πολυπροπυλένιο (falcon 2097) για την πλύση των φυσιγγών.
 10. Αναμεικτής στροβιλισμού
 11. Μαγνητικός αναδευτήρας
 12. Συσκευή φυγοκέντρισης στα 800 g.
 13. Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (1200 rpm)
 14. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
 15. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
 16. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές: Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 2 ml Διάλυμα έκλυσης (ακριβώς πριν το βήμα επώασης).
 - B. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2 ml απεσταγμένου νερού.
 - Γ. I¹²⁵ 1,25(OH)₂-Βιταμίνη-D : Ανασυστήστε με 26 ml διαλύματος ανασύστασης.
 - Δ. Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.
 - E. Διαλύτης εκχολίσεως: Απαιτείται 2 ml για κάθε ορό ελέγχου ή δείγμα που πρόκειται να υποβληθεί σε προσδιορισμό. **Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα** από διυσοπροπυλαιθέρα, κυκλοεξάνη, αιθυλακετικό, (50, 40, 10 v/v).
 - ΣΤ. Διαλύτης πλύσης: Απαιτούνται 1 ml για κάθε ορό ελέγχου ή δείγμα που πρόκειται να υποβληθεί σε προσδιορισμό.
- Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα** από διυσοπροπυλαιθέρα, κυκλοεξάνη, αιθυλακετικό, απόλυτη αλκοόλη (50, 40, 10, 1 v/v).

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Εξαιρούνται οι φύσιγγες, οι οποίες πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου
- Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιείτε τα αμέσως μετά την ανασύσταση, καταψύχετε αμέσως σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και διατηρείτε τα στους -20° C επί 3 μήνες. Αποφύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Χρησιμοποιήστε φρέσκο διαλύτη εκχολίσεως και διαλύτη πλύσης, μην τους φυλάσσετε.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού και πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20° C.
- Αποφύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Μετά την απόψυξη, τα δείγματα πρέπει να αναμειγνύονται (με στροβιλισμό) και στη συνέχεια να υποβάλλονται σε φυγοκέντριση.
- Ο ορός ή το πλάσμα (EDTA και ηπαρίνη) παρέχουν παρόμοια αποτελέσματα.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό
Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης.
Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ.
Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση.
Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση.
Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες.
Τηρείτε τους χρόνους επώασης.
Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

B. Διαδικασία**I. Βήμα εκχύλισης: ! Μόνο για ορούς ελέγχου και δείγματα.**

1. Σημάνετε τα υάλινα σωληνάρια (12x75 mm) για την εκχύλιση: 2 οροί ελέγχου και έως 16 δείγματα.
2. Προσθέστε 0,5 ml ορού ελέγχου ή δείγματος στα αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 2 ml διαλύτη εκχύλισης σε κάθε σωληνάριο.
4. Τα σωληνάρια είναι κλειστά με πώμα και τοποθετούνται σε συσκευή ανάδευσης επί 1 ώρας στις 1200 rpm.
5. Φυγοκεντρίστε κάθε σωληνάριο επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (στα 800 g).
6. Απαιτούνται υπερκείμενα για το επόμενο βήμα του διαχωρισμού.

II. Βήμα διαχωρισμού: ! Μόνο για ορούς ελέγχου και δείγματα

1. Σημάνετε τα γυάλινα σωληνάρια των 16 x 100 mm ή των 12 x 120 mm ή τα σωληνάρια πολυπροπυλενίου (falcon 2097) για της φύσιγγες πλύσης: 2 οροί ελέγχου και έως 16 δείγματα.
2. Βάλτε μια φύσιγγα "Bond Elut" σε κάθε σωληνάριο.
3. Βάλτε στη φύσιγγα 1,6 ml (2 x 0,8 ml) του υπερκείμενου που λαμβάνεται μετά το βήμα εκχύλισης.
4. Κατόπιν, πλύνετε τις φύσιγγες με 1 ml διαλύτη πλύσης (cf παρασκευή αντιδραστήριου). ! Προσέξτε να μην εισαγάγετε ποτέ κενό στις φύσιγγες, απλώς αφήστε το διαλύτη να κυλήσει μέσω της βαρύτητας.
5. Προσθέστε 300 μl διχλωρομεθανίου σε κάθε φύσιγγα, αφήστε το να κυλήσει με τη βαρύτητα.
6. Προσθέστε 300 μl απεσταγμένου νερού σε κάθε φύσιγγα.
7. Φυγοκεντρίστε κάθε σωληνάριο επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (στα 800 g).
8. Σημάνετε τα υάλινα σωληνάρια (12 x 75 mm) για έκλυση της 1,25(OH)₂-Βιταμίνης D. Μετά τη φυγοκέντρωση, μεταφέρετε τις φύσιγγες σε αντίστοιχα υάλινα σωληνάρια.
9. Βάλτε 400 μl διαλύματος έκλυσης σε κάθε φύσιγγα για να γίνει έκλυση της 1,25(OH)₂-Βιταμίνης D και φυγοκεντρίστε επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (στα 800 g).
10. Υποβάλλετε το εκλυθέν κλάσμα σε ανάμειξη μέσω στροβιλισμού.

Σημείωση: Μετά από το βήμα αυτό, τα δείγματα πρέπει να επωάζονται μέσα σε επιστρωμένα σωληνάρια όσο το δυνατόν πιο σύντομα για να αποφεύγεται η αποδόμηση.

III. Βήμα επώασης:

1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
2. Αναμείξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβιλισμού τύπου vortex) τους εκχυλισμένους ορούς ελέγχου και τα δείγματα και διανείμετε 150 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια (Χρησιμοποιήστε διάλυμα έκλυσης ως μηδενικό βαθμονομητή).
3. Διανείμετε 500 μl 1,25(OH)₂-Βιταμίνης D σημασμένης με ¹²⁵I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επωάστε όλη τη νύκτα σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]).
9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε).
10. Μετά την τελευταία πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
11. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
2. Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμησης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B / B_0(\%) = \frac{\text{Κρούσεις (BBαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Κρούσεις (MMηδενικβαθμονομητής)}} \cdot 100$$

3. Με χρήση ημιλογαριθμικού χαρτιού γραφήματος ή χαρτιού γραφήματος logit-log 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B₀(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 1,25(OH)₂-Βιταμίνης D για κάθε σημείο βαθμονομητή. Απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
4. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
5. Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B₀ (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις 1,25(OH)₂-Βιταμίνης D των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

6. Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης 1,25(OH)₂-Βιταμίνης D (B₀/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΑΕΛΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

| 1,25(OH) ₂ -Βιταμίνη D | cpm | B/Bo (%) |
|--|-------|----------|
| Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total") | 43937 | |
| Βαθμονομητής | | |
| 0,0 pg/ml | 16687 | 100,0 |
| 6,0 pg/ml | 15268 | 91,5 |
| 20,0 pg/ml | 12345 | 74,0 |
| 63,0 pg/ml | 8033 | 48,1 |
| 230,0 pg/ml | 3554 | 21,3 |
| 430,0 pg/ml | 2148 | 12,9 |

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**A. Όριο ανίχνευσης**

Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμηση, ήταν 1,4 pg/ml.

B. Ειδικότητα

Το ποσοστό διασταυρούμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται με σύγκριση της συγκέντρωσης που αποδίδει αναστολή 50%, είναι αντίστοιχα:

| Ένωση | Διασταυρούμενη αντίδραση (%) |
|---|------------------------------|
| 1,25(OH) ₂ -Βιταμίνη.D ₃ | 100 |
| 1,25(OH) ₂ -Βιταμίνη.D ₃ | 92,31 |
| 25OH-Βιταμίνη.D ₃ | 0,001 |
| 24,25(OH) ₂ -Βιταμίνη.D ₃ | 0,005 |
| 25,26(OH) ₂ -Βιταμίνη.D ₃ | 0,20 |

Σημείωση: Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για την αντι 1,25(OH)₂-Βιταμίνη D

Η απόδοση του προσδιορισμού δεν επηρεάζεται από αιμόλυση (ελέγχθηκαν 5 g/L αιμοσφαιρίνης), χολερυθριναμία (ελέγχθηκε 1 g/L χολερυθρίνης) ή τριγλυκερίδια (ελέγχθηκαν 2,5 g/L).

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (ελέγχθηκε 1g/L) και το σύζευγμα χολερυθρίνης (ελέγχθηκε 1g/L) δεν προκαλούν παρεμβολή σε αυτόν τον προσδιορισμό.

Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

| Ορός | N | <X> ± T.A. (pg/ml) | Σ.Δ. (%) | Ορός | N | <X> ± T.A. (pg/ml) | Σ.Δ. (%) |
|------|----|--------------------|----------|------|----|--------------------|----------|
| A | 20 | 24,6 ± 1,7 | 7,1 | A | 10 | 13,6 ± 1,7 | 12,7 |
| B | 20 | 78,6 ± 3,9 | 5,0 | B | 10 | 32,3 ± 3,6 | 11,3 |

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

| Αραίωση δείγματος | Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml) | Μετρημένη συγκέντρωση (pg/ml) | Ανάκτηση (%) |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| 1/1 | 70,0 | 70,0 | 100% |
| 1/2 | 35,0 | 35,7 | 102% |
| 1/4 | 17,5 | 14,5 | 83% |
| 1/8 | 8,8 | 7,8 | 89% |
| 1/16 | 4,4 | 4,6 | 105% |

Το δείγμα αραιώθηκε με διάλυμα έκλυσης.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

| Προσθήκη 1,25(OH) ₂ -βιτ. D (pg/ml) | Μετρημένες συγκεντρώσεις 1,25(OH) ₂ βιτ. D | | Ανάκτηση (%) |
|--|---|------------------------------|-----------------|
| | Συνολική (pg/ml) | Με αναφορά τυφλού (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 46,3 | 23,8 | 95,2% |
| 50,0 | 70,0 | 47,5 | 95,0% |
| 100,0 | 122,7 | 100,2 | 100,2% |

| Προσθήκη 1,25(OH) ₂ -βιτ. D (pg/ml) | Μετρημένες συγκεντρώσεις 1,25(OH) ₂ βιτ. D | | Ανάκτηση (%) |
|--|---|------------------------------|-----------------|
| | Συνολική (pg/ml) | Με αναφορά τυφλού (pg/ml) | |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 52,1 | 29,6 | 118,4% |
| 50,0 | 70,4 | 47,9 | 95,8% |
| 100,0 | 112,9 | 90,4 | 90,4% |

Συντελεστής μετατροπής:

Από pg/ml σε pmol/l : x 2,4
Από pmol/l σε pg/ml : x 0,42

Από όσο είναι δυνατό να γνωρίζουμε, δεν υπάρχει διεθνές υλικό αναφοράς για την παράμετρο αυτή.

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατενυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
 - Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των
 - δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

Το παρατηρηθέν πεδίο τιμών, με βάση τα ποσοστά επί τοις εκατό από 2,5% έως 97,5%

| Πληθυσμός | Πεδίο τιμών (pg/ml) | Μέση τιμή | SD | n |
|--------------------------|------------------------|-----------|------|----|
| Φυσιολογικά άτομα | 19.6 – 54.3 | 35.3 | 10.6 | 51 |

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.
Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HbsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μολύβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσωρεύσεων αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency. Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763
2. Iqbal, S.J. (1994). Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites. Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites. Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). An international comparison of Vitamin D metabolites measurements. Clin. Chem., 30:399-403
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). An international Comparison of Vitamin D metabolites measurements Clin. Chem, 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism. Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action. N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

| | ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" μl | ΒΑΘΜΟΝΟ- ΜΗΤΕΣ μl | ΔΕΙΓΜΑ (ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ μl |
|--|---------------------------|--|--|
| ΕΚΧΥΛΙΣΗ Βαθμονομητές Δείγματα/Οροί ελέγχου Διαλύτης εκχύλισης | - - - | - - - | - 500 2000 |
| Ανάδευση Φυγοκέντριση | | 1 ώρα σε 1200 rpm 5 λεπτά στα 800 g | |
| ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ Υπερκείμενο από το βήμα εκχύλισης | - | - | 1600 |
| ΦΥΣΙΓΓΑ Υπερκείμενο Διαλύτης πλύσης Διγλωρομεθάνιο Απεσταγμένο νερό Φυγοκέντριση Διάλυμα έκλουσης Φυγοκέντριση | | 1600 μl 1000 μl 300 μl 300 μl 5 λεπτά στα 800 g 400 μl 5 λεπτά στα 800 g Ανάμειξη με συσκευή στροβίλισμού | |
| ΕΠΩΑΣΗ Βαθμονομητές Εκχυλισμένα δείγματα Ιχνηθέτης | - - 500 | 150 - 500 | - 150 500 |
| Επώαση | | Όλη τη νύχτα σε θερμ. δωματίου | |
| Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός | - - - - - | | Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) 2 ml Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) |
| Μέτρηση | | Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα. | |

| | | |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Αρ. καταλόγου DIASource : KIP1929 | Αριθμός P.I.: 1700602/eI | Αρ. αναθεώρησης: 140108/1 |
|--------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|



pl

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro ludzkiego 1,25(OH)₂-witaminy D (1,25(OH)₂-Vit.D) w ludzkiej surowicy i osoczu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** DIAsource 1,25(OH)₂-VIT.D.-RIA-CT
- B. **Numer katalogowy:** KIP1929 : 48 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 **Fax: +32 (0) 10 84.99.91**

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

Witamina D₃ jest syntetyzowana głównie w skórze z 7-dehydrocholesterolu, oraz częściowo pochodzi ze składników pokarmowych. W wątrobie, cała witamina D₃ ulega hydroksylacji przy 25 atomie węgla, tworząc 25-OH-D₃. Związek 25-OH-D₃, zanim zacznie wykazywać biologiczną aktywność witaminy D w jelicie cienkim, nerkach i kości, musi ulec dalszym przemianom metabolicznym. U ssaków niecierpiących takich przemian zachodzą wyłącznie w nerkach. Witamina 25-OH-D₃ ulega dalszej hydroksylacji w pozycji 1 α, tworząc 1α,25 dihydroksywitaminę D₃ (1α,25-(OH)₂D₃).

Oprócz tkanki nerkowej, pewne ilości 1α,25-(OH)₂D₃ są wytwarzane w łożyskach kobiet ciężarnych oraz w makrofagach w stanach zapalenia tkanki mięsakowatej (sarcoiditis). Znane funkcje witaminy D₃ odnoszą się do postaci 1α,25-(OH)₂D₃, podczas gdy 25-OH-D₃ i sama witamina D₃ nie przejawia istotnej aktywności fizjologicznej. Ponadto, z uwagi na wytwarzanie 1α,25-(OH)₂D₃ w nerkach, oraz działanie tego związku w tkance kostnej i jelicie cienkim, należy traktować 1α,25-(OH)₂D₃ jako hormon. Ten hormon stymuluje absorpcję jelitową wapnia i fosforu. Stymuluje również resorpcję tkanki kostnej i mineralizację kości, chroniąc w ten sposób przed krzywicą i osteomalacją.

Związek 1α,25-(OH)₂D₃ może również być aktywny w innych tkankach odpowiedzialnych za transport wapnia (łożysko, nerki, gruczoł sutkowy,...), oraz w gruczołach endokrynowych, takich jak przytarczyce. 1α,25-(OH)₂D₃ ulega szybkiemu metabolizmowi a czas trwania w osoczu wynosi około 2 – 4 godziny. Jego głównym metabolitem jest kwas kalcytriolowy, 23-węglowa pochodna, która nie przejawia żadnej aktywności biologicznej. Oprócz tej drogi metabolicznej, 1α,25-(OH)₂D₃ podlega hydroksylacji w pozycji 24 tworząc 1,24,25-trihydroksy-witaminę D₃. Ten składnik przejawia mniejszą aktywność biologiczną niż jego prekursor, a ten szlak metaboliczny odgrywa mniejsze znaczenie.

Poziomy 1α,25-(OH)₂D₃ w osoczu lub w surowicy wynoszą od 100 do 1000 i są niższe od poziomów 25-OH-D₃. Ze względu na niskie stężenia i obecność wielu podobnych metabolitów, pomiar 1α,25-(OH)₂D₃ wymaga ekstrakcji i separacji albo za pomocą HPLC, albo chromatografii kolumnowej.


B. Zastosowania kliniczne

Pomiar krążącej 1α,25-(OH)₂D₃ jest wskazany w zaburzeniach metabolizmu wapnia, takich jak: sarkoidoza, niewydolność nerek, nadczynność i niedoczynność przytarczyc, krzywica, hiperkalcemia paraneoplastyczna, oporność na witaminę oraz leczenie środkami przeciwdrgawkowymi.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Ekstrahowane za pomocą mieszaniny rozpuszczalników są wyłącznie próbki i kontrole, a nie kalibratory. Ekstrahowane substancje są umieszczane w pojemnikach w celu oddzielenia 1,25(OH)₂-witaminy D₃ od innych metabolitów witaminy D. Po elucji próbek i kontroli, kalibratory, próbki i kontrole są inkubowane w opłaszczonych probówkach. Stała ilość 1,25(OH)₂-witaminy D znakowanej 125I współzawodniczy z 1,25(OH)₂-witaminą D obecną w badanej próbce lub w kalibratorze o stałą ilość miejsc na przeciwiolach, unieruchomionych na ściankach probówki polistyrenowej. Po całkowitej inkubacji w temperaturze pokojowej, wykonanie aspiracji przerywa reakcję kompetycyjną. Następnie próbki są płukane za pomocą roztworu do płukania i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia 1,25(OH)₂-witaminy D są określane na podstawie odniesienia dawki z krzywej kalibracyjnej.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

| Odczynniki | Zestaw 48 oznaczeń | Kolor | Rekonstrukcja |
|--|--|----------|--|
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px;">  Probówki opłaszczone anty-1,25(OH)₂-witamina D </div> | 1 x 48 | zielony | Gotowe do zastosowania. |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> Ag ¹²⁵I </div> <p>ZNACZNIK IZOTOPOWY: 1,25(OH)₂-witamina D oznakowany jodem¹²⁵ (poziom HPLC) w buforze fosforanowym wraz z kazeiną bydlęcą i gentamycyną.</p> | 1 fiolka materiał liofilizowany 75 kBq | czerwony | Dodaj 26 ml roztworu do rekonstrukcji. |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> CAL N </div> <p>Kalibratory - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w buforze fosforanowym wraz z kazeiną bydlęcą i gentamycyną..</p> | 5 fiolek materiał liofilizowany | żółty | Dodaj 2 ml roztworu do elucji |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> WASH SOLN CONC </div> <p>Roztwór płuczący (TRIS HCl)</p> | 1 fiolka 10 ml | brązowy | Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne). |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> CONTROL N </div> <p>Kontrole - N = od 1 do 2 w osoczu ludzkiej z gentamycyną</p> | 2 fioleki materiał liofilizowany | srebrny | Dodać 2 ml wody destylowanej |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> REC SOLN </div> <p>Roztwór do rekonstrukcji : bufor fosforanowy z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%)</p> | 1 fiolka 30 ml | czarny | Gotowe do zastosowania. |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> ELU SOLN </div> <p>Roztwór do elucji: bufor fosforanowy z kazeiną bydlęcą, metanolem i azydkiem (<0,1%)</p> | 1 fiolka 30 ml | zielony | Gotowe do zastosowania. |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> GEL </div> <p>Pojemniki Bond Elut Silica</p> | 20 | | Przechowywać w temperaturze pokojowej. |

Uwaga: Roztwór do elucji należy wykorzystywać jako kalibrator 0 oraz do rozcieńczania próbek z wartościami przekraczającymi najwyższe wartości kalibratorów (rozcieńczyć po etapie separacji).

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Dwuizopropyleter. (p.a.)
3. Cykloheksan. (p.a.)
4. Octan etylu. (p.a.)
5. Etanol absolutny. (p.a.)
6. Dwuchlorometan. (p.a.)

NB: Zestaw DIAsource do ekstrakcji, zawierający wszystkie te rozpuszczalniki, dostępny jest pod numerem odniesienia: 3019700. Zestaw ten zawiera wystarczającą ilość rozpuszczalników do przeprowadzenia 5 x 48 testów 1,25(OH)₂-VIT.D-RIA-CT.

7. Pipety do dozowania: 200 µl, 500 µl, 1 ml i 2 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi).

8. Probówki szklane (12 x 75 mm) do ekstrakcji i elucji. (zamknięte korkiem do etapu ekstrakcji).
9. Probówki szklane (16 x 100 mm) lub (12 x 120 mm), lub probówki polipropylenowe (falcon 2097), do płukania pojemników.
10. Mieszadło wirowe
11. Mieszadło magnetyczne
12. Wirówka 800 g.
13. Wytrząsarka probówek (1200 rpm)
14. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
15. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
16. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Kalibratory rozpuścić za pomocą 2 ml roztworu do elucji (**bezpośrednio przed etapem inkubacji**).
- B. Kontrole:** Kontrole należy rekonstruować przy pomocy 2 ml wody destylowanej.
- C. ¹²⁵I 1,25(OH)₂-witamina D:** Rozpuścić za pomocą 26 ml roztworu do rekonstrukcji.
- D. Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wylać pod koniec dnia.
- E. Rozpuszczalnik do ekstrakcji:** Potrzeba 2 ml na każdą badaną kontrolę lub próbkę. **Przygotuj świeży roztwór** diizopropyleteru, cykloheksanu, octanu etylu (w proporcji 50, 40, 10).
- F. Rozpuszczalnik do płukania:** Potrzeba 1 ml na każdą badaną kontrolę lub próbkę. **Przygotuj świeży roztwór** diizopropyleteru, cykloheksanu, octanu etylu, bezwodnego etanolu (w proporcji 50, 40, 10, 1).

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstrukcją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykietach, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C; z wyjątkiem pojemników, które muszą być przechowywane w temperaturze pokojowej.
- Kalibratory i kontrole są bardzo nietrwałe, należy je wykorzystać zaraz po rozpuszczeniu, lub od razu zamrozić w niewielkich objętościach, przechowując w temperaturze -20°C do 3 miesięcy. Unikać wielokrotnego rozmrażania i zamrażania.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczący powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znacznik izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiolece w temperaturze od 2 do 8°C.
- Rozpuszczalniki do ekstrakcji i płukania powinny być świeże, nie wolno ich przechowywać.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy lub osocza muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w niewielkich ilościach w temperaturze -20°C..
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Po rozmrożeniu, próbki powinny być wymieszane i odwirowane.
- Surowica lub osocze (EDTA i heparyna) prowadzą do podobnych wyników.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

I. Ekstrakcja: ! Dotyczy wyłącznie kontroli i próbek.

1. Oznaczyć szklane probówki (12 x 75 mm) do ekstrakcji: 2 kontrole i do 16 próbek.

2. Dodać 0,5 ml kontroli lub próbki do odpowiedniej probówki.
3. Dodać do każdej probówki 2 ml rozpuszczalnika do ekstrakcji.
4. Probówki są zamykane korkiem i umieszczane w wytrząsarce na 1 godzinę przy 1200 obr/min.
5. Wirować każdą probówkę przez 5 minut w temperaturze pokojowej (przy 800 g).
6. Supernatanty są potrzebne do dalszych etapów separacji.

II. Separacja: ! Dotyczy wyłącznie kontroli i próbek.

1. Oznaczyć probówki szklane (16 x 100 mm) lub (12 x 120 mm), lub probówki polipropylenowe (falcon 2097), do płukania pojemników: 2 kontrole i do 16 próbek.
2. W każdej probówce umieścić pojemnik "Bond Elut".
3. Na pojemniki nanieść po 1,6 ml supernatantu (2 x 0,8 ml) uzyskanego w etapie ekstrakcji.
4. Następnie, przepłukać pojemniki 1 ml rozpuszczalnika do płukania (porównać przygotowanie odczynników). ! Należy uważać, aby nigdy nie stosować próżni w stosunku do pojemników, ale pozwolić rozpuszczalnikowi spłynąć siłami grawitacji.
5. Na każdy pojemnik dodać po 300 µl dwuchlorometanu, pozostawić do spłynięcia siłami grawitacji.
6. Na każdy pojemnik dodać po 300 µl wody destylowanej.
7. Wirować każdą probówkę przez 5 minut w temperaturze pokojowej (800 g).
8. Oznaczyć szklane probówki (12 x 75 mm) do elucji 1,25(OH)₂-witaminy D. Po odwirowaniu, przenieść pojemniki do odpowiednich szklanych probówek.
9. Na każdy pojemnik nanieść po 400 µl roztworu do elucji, aby wypłukać 1,25 (OH)₂-witaminę D i wirować przez 5 minut w temperaturze pokojowej (800 g).
10. Frakcję wypłukaną należy wymieszać za pomocą mieszadła typu worteks.

Nota: Po tym etapie, najszybciej jak to możliwe, próbki muszą zostać inkubowane w opłaszczonych probówkach, aby uniknąć odczłupienia.

III. Inkubacja :

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe probówki.
2. Od razu wymieszać (na worteksie) kalibratory (jako kalibrator zerowy wykorzystać roztwór do elucji), ekstrahowane kontrole i próbki oraz dodać po 150 µl do odpowiednich probówek.
3. Do każdej probówki, w tym do probówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczenia, dodać po 500 µl 1,25(OH)₂-witaminy D oznakowanego jodem¹²⁵.
4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwieczonych pęcherzyków powietrza.
5. Inkubować przez jedną noc w temperaturze pokojowej.
6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczenia). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej probówki.
7. Przepłukać probówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczenia) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
8. Aspirować (lub osuszyć) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczenia).
9. Ponownie przepłukać próbki za pomocą 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczenia) a następnie aspirować (lub osuszyć).
10. Po ostatnim płukaniu, pozostawić probówki odwrócone przez 2 minuty a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
11. Zliczać probówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Obliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiązania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0) zgodnie z poniższym wzorem:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

3. Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B₀(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia 1,25(OH)₂-witaminy D każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
4. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości (B/B₀(%)) próbki należy określić stężenia 1,25(OH)₂-witaminy D w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanej znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego 1,25(OH)₂-witaminy D (B₀/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

| 1,25(OH) ₂ -witamina D | | cpm | B/Bo (%) |
|-----------------------------------|-------------|-------|----------|
| Zliczanie całkowite | | 43937 | |
| Kalibrator | 0,0 pg/ml | 16687 | 100,0 |
| | 6,0 pg/ml | 15268 | 91,5 |
| | 20,0 pg/ml | 12345 | 74,0 |
| | 63,0 pg/ml | 8033 | 48,1 |
| | 230,0 pg/ml | 3554 | 21,3 |
| | 430,0 pg/ml | 2148 | 12,9 |

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmiennie stężenie dwóch odchyleń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 1,4 pg/ml.

B. Swoistość

Odsetek reaktywności krzyżowej oceniany przez porównanie stężenia prowadzącego do 50% zahamowania przedstawia się następująco:

| Związek | Reaktywność krzyżowa (%) |
|-------------------------------------|--------------------------|
| 1,25(OH) ₂ -witamina D3 | 100 |
| 1,25(OH) ₂ -witamina D2 | 92,31 |
| 25OH-witamina D3 | 0,001 |
| 24,25(OH) ₂ -witamina D3 | 0,005 |
| 25,26(OH) ₂ -witamina D3 | 0,20 |

Nota: w tej tabeli przedstawiono reaktywność krzyżową dla przeciwciał anty-1,25(OH)₂-witaminy D

Na wynik oznaczenia nie wpływa hemoliza (przetestowano dla stężenia 5 g/l hemoglobiny), bilirubinemia (przetestowano dla stężenia 1 g/l bilirubiny) ani trójglicerydy (przetestowano dla stężenia 2,5 g/l).

Kwas askorbinowy (witamina C; przetestowano dla stężenia 1 g/l) ani koniugaty bilirubiny (przetestowano dla stężenia 1 g/l) nie wpływają na wynik oznaczenia.

C. Precyzja

PRECYZJA W SERII

PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

| Surowica | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) | Surowica | N | <X> ± SD (pg/ml) | CV (%) |
|----------|----|------------------|--------|----------|----|------------------|--------|
| A | 20 | 24,6 ± 1,7 | 7,1 | A | 10 | 13,6 ± 1,7 | 12,7 |
| B | 20 | 78,6 ± 3,9 | 5,0 | B | 10 | 32,3 ± 3,6 | 11,3 |

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

| Rozcieńczenie próbki | Stężenie teoretyczne (pg/ml) | Stężenie zmierzone (pg/ml) | Odzysk (%) |
|----------------------|------------------------------|----------------------------|------------|
| 1/1 | 70,0 | 70,0 | 100% |
| 1/2 | 35,0 | 35,7 | 102% |
| 1/4 | 17,5 | 14,5 | 83% |
| 1/8 | 8,8 | 7,8 | 89% |
| 1/16 | 4,4 | 4,6 | 105% |

Próbka została rozcieńczona za pomocą roztworu do elucji.

BADANIE ODZYSKU

| Dodana 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Zmierzone stęż. 1,25(OH) ₂ Vit.D łącznie (pg/ml) | Zaślepienie (pg/ml) | Odzysk (%) |
|---|--|---------------------|------------|
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 46,3 | 23,8 | 95,2% |
| 50,0 | 70,0 | 47,5 | 95,0% |
| 100,0 | 122,7 | 100,2 | 100,2% |
| Dodana 1,25(OH) ₂ -Vit.D (pg/ml) | Zmierzone stęż. 1,25(OH) ₂ Vit.D łącznie (pg/ml) | Zaślepienie (pg/ml) | Odzysk (%) |
| 0,0 | 22,5 | | |
| 25,0 | 52,1 | 29,6 | 118,4% |
| 50,0 | 70,4 | 47,9 | 95,8% |
| 100,0 | 112,9 | 90,4 | 90,4% |

Współczynnik konwersji :

Z pg/ml na pmol/l : x 2,4
Z pmol/l na pg/ml : x 0,42

Według naszej wiedzy, dla tego parametru nie ma żadnego międzynarodowego materiału referencyjnego.

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbkę zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne.

Zakres jest oparty na percentylach od 2,5% do 97,5%.

| Populacja | Zakres (pg/ml) | Średnia | SD | n |
|-----------------|----------------|---------|------|----|
| Zdrowi osobnicy | 19,6 – 54,3 | 35,3 | 10,6 | 51 |

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Bouillon R.A., Auwerx J.D., Lissens W.D. and Pelemans W.K. (1987) **Vitamin D status in elderly; season substrate deficiency causes 1,25-dihydroxycholecalciferol deficiency.** Am. J. Clin. Nutr., 45:755-763
2. Iqbal, S.J. (1994). **Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites.** Ann. Clin. Biochem., 31:109-124
3. Mawer E.B. (1980). **Clinical implications of measurements of circulating vitamin D metabolites.** Clinics in Endocr. Metabol., 9:63-79
4. Jongen M.J.M., Van Ginkel F.C., Vander Vijgh W.J.F., Kuiper S., Netelenbos J.C. and Lips P; (1984). **An international comparison of Vitamin D metabolites measurements.** Clin. Chem., 30:399-403
5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

| | CAŁKOWIT A LICZBA ZLICZEŃ µl | KALIBRATORY µl | PRÓBKİ KONTROLE µl |
|---|--|---|--------------------|
| EKSTRAKcja Kalibratory Próbki / kontrole Rozpuszczalnik do ekstrakcji | - - - | - - - | - 500 2000 |
| Wytrząsanie Wirowanie | 1 godzina 1200 obr/min 5 minut przy 800 g | | |
| ROZDZIELENIE Supernatant z etapu ekstrakcji | - | - | 1600 |
| POJEMNIK Supernatant Rozpuszczalnik do płukania Dwuchlorometan Woda destylowana Wirowanie Roztwór do elucji Wirowanie | 1600 µl 1000 µl 300 µl 300 µl 5 minut przy 800 g 400 µl 5 minut przy 800 g Mieszanie przy pomocy mieszadła typu worteł | | |
| INKUBACJA Kalibratory Próbki ekstrahowane Znacznik izotopowy | - - 500 | 150 - 500 | - 150 500 |
| Inkubacja | Przez jedną noc w temperaturze pokojowej | | |
| Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie | - - - - - | Aspiracja (lub odlewanie) 2,0 ml Aspiracja (lub odlewanie) 2,0 ml Aspiracja (lub odlewanie) | |
| Zliczanie | Zliczanie próbek przez 60 sekund w liczniku gamma | | |

| | | |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Nr katalogowy DIAsource KIP1929 | Numer P.I. 1700602/pl | Nr aktualizacji : 140108/1 |
|------------------------------------|--------------------------|-------------------------------|

| | Used symbols |
|-----------------|------------------------------------|
| | Consult instructions for use |
| | Storage temperature |
| | Use by |
| LOT | Batch code |
| REF | Catalogue number |
| CONTROL | Control |
| I V D | In vitro diagnostic medical device |
| | Manufacturer |
| | Contains sufficient for <n> tests |
| WASH SOLN CONC | Wash solution concentrated |
| CAL 0 | Zero calibrator |
| CAL N | Calibrator # |
| CONTROL N | Control # |
| Ag 125I | Tracer |
| Ab 125I | Tracer |
| Ag 125I CONC | Tracer concentrated |
| Ab 125I CONC | Tracer concentrated |
| | Tubes |
| INC BUF | Incubation buffer |
| ACETONITRILE | Acetonitrile |
| SERUM | Serum |
| DIL SPE | Specimen diluent |
| DIL BUF | Dilution buffer |
| ANTISERUM | Antiserum |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoabsorbent |
| DIL CAL | Calibrator diluent |
| REC SOLN | Reconstitution solution |
| PEG | Polyethylene glycol |
| EXTR SOLN | Extraction solution |
| ELU SOLN | Elution solution |
| GEL | Bond Elut Silica cartridges |
| PRE SOLN | Pre-treatment solution |
| NEUTR SOLN | Neutralization solution |
| TRACEUR BUF | Tracer buffer |
| µT | Microtiterplate |
| Ab HRP | HRP Conjugate |
| Ag HRP | HRP Conjugate |
| Ab HRP CONC | HRP Conjugate concentrate |
| Ag HRP CONC | HRP Conjugate concentrate |
| CONJ BUF | Conjugate buffer |
| CHROM TMB CONC | Chromogenic TMB concentrate |
| CHROM TMB | Chromogenic TMB solution |
| SUB BUF | Substrate buffer |
| STOP SOLN | Stop solution |
| INC SER | Incubation serum |
| BUF | Buffer |
| Ab AP | AP Conjugate |
| SUB PNPP | Substrate PNPP |
| BIOT CONJ CONC | Biotin conjugate concentrate |
| AVID HRP CONC | Avidine HRP concentrate |
| ASS BUF | Assay buffer |
| Ab BIOT | Biotin conjugate |
| Ab | Specific Antibody |
| SAV HRP CONC | Streptavidin HRP concentrate |
| NSB | Non-specific binding |
| 2nd Ab | 2nd Antibody |
| ACID BUF | Acidification Buffer |
| DIST | Distributor |
| TRAY | Incubation trays |
| PMSF | PMSF solution |
| | Protect from light |
| STRIP | Dot Strip |
| SUB | Substrate |
| EXTR SOLN CONC | Extraction Buffer Concentrate |
| CART | Cartridge |
| SAV HRP | Streptavidin HRP |
| PIPETTE | Pipette |
| WASH SOLN | Wash buffer |

| | Symboles utilisés |
|-----------------|---|
| | Consulter les instructions d'utilisation |
| | Température de conservation |
| | Utiliser jusqu'à |
| LOT | Numéro de lot |
| REF | Référence de catalogue |
| CONTROL | Contrôle |
| IV D | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
| | Fabricant |
| | Contenu suffisant pour <n> tests |
| WASH SOLN CONC | Solution de lavage concentrée |
| CAL 0 | Calibrateur zéro |
| CAL N | Calibrateur # |
| CONTROL N | Contrôle # |
| Ag 125I | Traceur |
| Ab 125I | Traceur |
| Ag 125I CONC | Traceur concentré |
| Ab 125I CONC | Traceur concentré |
| | Tubes |
| INC BUF | Tampon d'incubation |
| ACETONITRILE | Acétonitrile |
| SERUM | Sérum |
| DIL SPE | Diluant du spécimen |
| DIL BUF | Tampon de dilution |
| ANTISERUM | Antisérum |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoabsorbant |
| DIL CAL | Diluant de calibrateur |
| REC SOLN | Solution de reconstitution |
| PEG | Glycol Polyéthylène |
| EXTR SOLN | Solution d'extraction |
| ELU SOLN | Solution d'élution |
| GEL | Cartouches Bond Elut Silica |
| PRE SOLN | Solution de pré-traitement |
| NEUTR SOLN | Solution de neutralisation |
| TRACEUR BUF | Tampon traceur |
| ULI | Microplaque de titration |
| Ab HRP | HRP Conjugué |
| Ag HRP | HRP Conjugué |
| Ab HRP CONC | HRP Conjugué concentré |
| Ag HRP CONC | HRP Conjugué concentré |
| CONJ BUF | Tampon conjugué |
| CHROM TMB CONC | Chromogène TMB concentré |
| CHROM TMB | Solution chromogène TMB |
| SUB BUF | Tampon substrat |
| STOP SOLN | Solution d'arrêt |
| INC SER | Sérum d'incubation |
| BUF | Tampon |
| Ab AP | AP Conjugué |
| SUB PNPP | Tampon PNPP |
| BIOT CONJ CONC | Biotine conjugué concentré |
| AVID HRP CONC | Avidine HRP concentré |
| ASS BUF | Tampon de test |
| Ab BIOT | Biotine conjugué |
| Ab | Anticorps spécifique |
| SAV HRP CONC | Concentré streptavidine HRP |
| NSB | Liant non spécifique |
| 2nd Ab | Second anticorps |
| ACID BUF | Tampon d'acidification |
| DIST | Distributeur |
| TRAY | Plaque d'incubation |
| PMSF | Solution PMSF |
| | Conserver à l'abri de la lumière |
| STRIP | Bandelette de dots |
| SUB | Substrat |
| EXTR SOLN CONC | Tampon d'extraction concentré |
| CART | Cartouche |
| SAV HRP | Streptavidine-peroxydase de raifort |
| PIPETTE | Pipette |
| WASH SOLN | Tampon de lavage |

| | Gebruikte symbolen |
|-----------------|--|
| | Raadpleeg de gebruiksaanwijzing |
| | Bewaartemperatuur |
| | Houdbaar tot |
| LOT | Lotnummer |
| REF | Catalogusnummer |
| CONTROL | Controle |
| I V D | Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek |
| | Fabrikant |
| | Inhoud voldoende voor <n> testen |
| WASH SOLN CONC | Wasoplossing, geconcentreerd |
| CAL 0 | Nulkalibrator |
| CAL N | Kalibrator # |
| CONTROL N | Controle # |
| Ag 125I | Tracer |
| Ab 125I | Tracer |
| Ag 125I CONC | Tracer geconcentreerd |
| Ab 125I CONC | Tracer geconcentreerd |
| | Buisjes |
| INC BUF | Incubatiebuffer |
| ACETONITRILE | Acetonitrile |
| SERUM | Serum |
| DIL SPE | Specimen diluent |
| DIL BUF | Verdunningsbuffer |
| ANTISERUM | Antiserum |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoabsorbent |
| DIL CAL | Kalibratorverdunner |
| REC SOLN | Reconstitutieoplossing |
| PEG | Polyethyleen glycol |
| EXTR SOLN | Extractieoplossing |
| ELU SOLN | Elutieoplossing |
| GEL | Bond Elut Silica kolom |
| PRE SOLN | Pre-behandelingsoplossing |
| NEUTR SOLN | Neutralisatieoplossing |
| TRACEUR BUF | Tracerbuffer |
| U U | Microtiterplaat |
| Ab HRP | HRP Conjugaat |
| Ag HRP | HRP Conjugaat |
| Ab HRP CONC | HRP Conjugaat geconcentreerd |
| Ag HRP CONC | HRP Conjugaat geconcentreerd |
| CONJ BUF | Conjugaat buffer |
| CHROM TMB CONC | Chromogene TMB geconcentreerd |
| CHROM TMB | Chromogene Oplossing TMB |
| SUB BUF | Substraatbuffer |
| STOP SOLN | Stopoplossing |
| INC SER | Incubatieserum |
| BUF | Buffer |
| Ab AP | AP Conjugaat |
| SUB PNPP | Substraat PNPP |
| BIOT CONJ CONC | Geconcentreerd Biotine conjugaat |
| AVID HRP CONC | Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat |
| ASS BUF | Assay buffer |
| Ab BIOT | Biotine conjugaat |
| Ab | Specifiek antilichaam |
| SAV HRP CONC | Streptavidine-HRP concentraat |
| NSB | Aspecifieke binding |
| 2nd Ab | 2de antilichaam |
| ACID BUF | Verzurringsbuffer |
| DIST | Distributeur |
| TRAY | Incubatievlotje |
| PMSF | PMSF oplossing |
| | Beschermen tegen licht |
| STRIP | Strip met dots |
| SUB | Substraat |
| EXTR SOLN CONC | Extractiebuffer concentraat |
| CART | Cassette |
| SAV HRP | Streptavidine - HRP |
| PIPETTE | Pipet |
| WASH SOLN | Wasbuffer |

| | Benutzte Symbole |
|-----------------|------------------------------|
| | Gebrauchsanweisung beachten |
| | Lagern bei |
| | Verwendbar bis |
| LOT | Chargenbezeichnung |
| REF | Bestellnummer |
| CONTROL | Kontrolle |
| IV D | In Vitro Diagnostikum |
| | Hersteller |
| | Ausreichend für <n> Ansätze |
| WASH SOLN CONC | Waschlösung-Konzentrat |
| CAL 0 | Null kalibrator |
| CAL N | Kalibrator # |
| CONTROL N | Kontrolle # |
| Ag 125I | Tracer |
| Ab 125I | Tracer |
| Ag 125I CONC | Tracer Konzentrat |
| Ab 125I CONC | Tracer Konzentrat |
| | Röhrchen |
| INC BUF | Inkubationspuffer |
| ACETONITRILE | Azetonitril |
| SERUM | Humanserum |
| DIL SPE | Probenverdünner |
| DIL BUF | Verdünnungspuffer |
| ANTISERUM | Antiserum |
| IMMUNOADSORBENT | Immunadsorbens |
| DIL CAL | Kalibratorverdünnung |
| REC SOLN | Rekonstitutionslösung |
| PEG | Polyethylenglykol |
| EXTR SOLN | Extraktionslösung |
| ELU SOLN | Eluierungslösung |
| GEL | Bond Elut Silikakartuschen |
| PRE SOLN | Vorbehandlungslösung |
| NEUTR SOLN | Neutralisierungslösung |
| TRACEUR BUF | Tracer-Puffer |
| MULTI | Mikrotiterplatte |
| Ab HRP | HRP Konjugat |
| Ag HRP | HRP Konjugat |
| Ab HRP CONC | HRP Konjugat Konzentrat |
| Ag HRP CONC | HRP Konjugat Konzentrat |
| CONJ BUF | Konjugatpuffer |
| CHROM TMB CONC | Chromogenes TMB Konzentrat |
| CHROM TMB | Farblösung TMB |
| SUB BUF | Substratpuffer |
| STOP SOLN | Stopplösung |
| INC SER | Inkubationsserum |
| BUF | Puffer |
| Ab AP | AP Konjugat |
| SUB PNPP | Substrat PNPP |
| BIOT CONJ CONC | Biotin-Konjugat-Konzentrat |
| AVID HRP CONC | Avidin-HRP-Konzentrat |
| ASS BUF | Assaypuffer |
| Ab BIOT | Biotin-Konjugat |
| Ab | Spezifischer Antikörper |
| SAV HRP CONC | HRP Streptavidinkonzentrat |
| NSB | Unspezifische Bindung |
| 2nd Ab | Sekundärer Antikörper |
| ACID BUF | Ansäuerungspuffer |
| DIST | Vertreiber |
| TRAY | Inkubationsschale |
| PMSF | PMSF Lösung |
| | Vor Licht schützen |
| STRIP | Tüpfelstreifen |
| SUB | Substrat |
| EXTR SOLN CONC | Konzentrat Extraktionspuffer |
| CART | Kassette |
| SAV HRP | Streptavidin HRP |
| PIPETTE | Pipet |
| WASH SOLN | Waschpuffer |

| | Simboli utilizzati |
|-----------------|---|
| | Consultare le istruzioni per l'uso |
| | Limitazioni di temperatura |
| | Utilizzare entro |
| LOT | Numero di lotto |
| REF | Numero di catalogo |
| CONTROL | Controllo |
| IV D | Dispositivo medico-diagnostico in vitro |
| | Fabbricante |
| | Contenuto sufficiente per <n> saggi |
| WASH SOLN CONC | Tampone di lavaggio concentrato |
| CAL 0 | Calibratore zero |
| CAL N | Standard # |
| CONTROL N | Controllo # |
| Ag 125I | Marcato |
| Ab 125I | Marcato |
| Ag 125I CONC | Marcato concentrato |
| Ab 125I CONC | Marcato concentrato |
| | Provette |
| INC BUF | Tampone incubazione |
| ACETONITRILE | Acetonitrile |
| SERUM | Siero |
| DIL SPE | Diluyente campione |
| DIL BUF | Tampone diluizione |
| ANTISERUM | Antisiero |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoassorbente |
| DIL CAL | Diluyente calibratore |
| REC SOLN | Soluzione di ricostituzione |
| PEG | Polietilenglicole |
| EXTR SOLN | Soluzione di estrazione |
| ELU SOLN | Soluzione di eluizione |
| GEL | Cartucce di silice bond elut |
| PRE SOLN | Soluzione di pretrattamento |
| NEUTR SOLN | Soluzione di neutralizzazione |
| TRACEUR BUF | Tracer Buffer |
| ULI | Piastra di microtitolazione |
| Ab HRP | HRP Coniugato |
| Ag HRP | HRP Coniugato |
| Ab HRP CONC | HRP Coniugato concentrato |
| Ag HRP CONC | HRP Coniugato concentrato |
| CONJ BUF | Buffer coniugato |
| CHROM TMB CONC | Cromogena TMB concentrato |
| CHROM TMB | Soluzione cromogena TMB |
| SUB BUF | Tampone substrato |
| STOP SOLN | Soluzione di arresto |
| INC SER | Incubazione con siero |
| BUF | Buffer |
| Ab AP | AP Coniugato |
| SUB PNPP | Substrato PNPP |
| BIOT CONJ CONC | Concentrato coniugato con biotina |
| AVID HRP CONC | Concentrato avidina HRP |
| ASS BUF | Soluzione tampone per test |
| Ab BIOT | Coniugato con biotina |
| Ab | Anticorpo Specifico |
| SAV HRP CONC | Streptavidina-HRP concentrata |
| NSB | Legame non-specifico |
| 2nd Ab | 2° Anticorpo |
| ACID BUF | Tampone Acidificante |
| DIST | Distributore |
| TRAY | Vassoi di incubazione |
| PMSF | Soluzione di PMSF |
| | Proteggere dalla luce |
| STRIP | Dot strip |
| SUB | Substrato |
| EXTR SOLN CONC | Concentrato del tampone di estrazione |
| CART | Cartuccia |
| SAV HRP | HRP coniugata a streptavidina |
| PIPETTE | Pipetta |
| WASH SOLN | Tampone di lavaggio |

| | Símbolos utilizados |
|-----------------|--|
| | Consultar las instrucciones de uso |
| | Limitación de temperatura |
| | Fecha de caducidad |
| LOT | Código de lote |
| REF | Número de catálogo |
| CONTROL | Control |
| IV D | Producto sanitario para diagnóstico in vitro |
| | Fabricante |
| | Contenido suficiente para <n> ensayos |
| WASH SOLN CONC | Solución de lavado concentrada |
| CAL 0 | Calibrador cero |
| CAL N | Calibrador # |
| CONTROL N | Control # |
| Ag 125I | Trazador |
| Ab 125I | Trazador |
| Ag 125I CONC | Trazador concentrada |
| Ab 125I CONC | Trazador concentrada |
| | Tubos |
| INC BUF | Tampón de incubación |
| ACETONITRILE | Acetonitrilo |
| SERUM | Suero |
| DIL SPE | Diluyente de Muestra |
| DIL BUF | Tampón de dilución |
| ANTISERUM | Antisuero |
| IMMUNOADSORBENT | Inmunoadsorbente |
| DIL CAL | Diluyente de calibrador |
| REC SOLN | Solución de Reconstitución |
| PEG | Glicol Polietileno |
| EXTR SOLN | Solución de extracción |
| ELU SOLN | Solución de elución |
| GEL | Cartuchos Bond Elut Sílica |
| PRE SOLN | Solución de Pre-tratamiento |
| NEUTR SOLN | Solución de Neutralización |
| TRACEUR BUF | Tampón de trazador |
| MLI | Placa de microvaloración |
| Ab HRP | HRP Conjugado |
| Ag HRP | HRP Conjugado |
| Ab HRP CONC | HRP Conjugado concentrada |
| Ag HRP CONC | HRP Conjugado concentrada |
| CONJ BUF | Tampón de Conjugado |
| CHROM TMB CONC | Cromógena TMB concentrada |
| CHROM TMB | Solución Cromógena TMB |
| SUB BUF | Tampón de sustrato |
| STOP SOLN | Solución de Parada |
| INC SER | Suero de Incubación |
| BUF | Tampón |
| Ab AP | AP Conjugado |
| SUB PNPP | Sustrato PNPP |
| BIOT CONJ CONC | Concentrado de conjugado de biotina |
| AVID HRP CONC | Concentrado avidina-HRP |
| ASS BUF | Tampón de ensayo |
| Ab BIOT | Conjugado de biotina |
| Ab | Anticuerpo específico |
| SAV HRP CONC | Estreptavidina-HRP Concentrado |
| NSB | Unión no específica |
| 2nd Ab | Segundo anticuerpo |
| ACID BUF | Tampón de Acidificación |
| DIST | Distribuidor |
| TRAY | Bandejas de incubación |
| PMSF | Solución de PMSF |
| | Proteger de la luz |
| STRIP | Tries Dot |
| SUB | Sustrato |
| EXTR SOLN CONC | Concentrado de tampón de extracción |
| CART | Cartucho |
| SAV HRP | Estreptavidina HRP |
| PIPETTE | Pipeta |
| WASH SOLN | Tampón de lavado |

| | Símbolos utilizados |
|-----------------|--|
| | Consulte instruções de utilização |
| | Temperatura de conservação |
| | Utilizar antes de |
| LOT | Código de lote |
| REF | Número de catálogo |
| CONTROL | Controlo |
| IVD | Dispositivo médico de diagnóstico in vitro |
| | Fabricante |
| | Conteúdo suficiente para <n> testes |
| WASH SOLN CONC | Solução de lavagem concentrada |
| CAL 0 | Calibrador zero |
| CAL N | Calibrador # |
| CONTROL N | Controlo # |
| Ag 1251 | Marcador |
| Ab 1251 | Marcador |
| Ag 1251 CONC | Marcador concentrada |
| Ab 1251 CONC | Marcador concentrada |
| | Tubos |
| INC BUF | Tampão de incubação |
| ACETONITRILE | Acetonitrilo |
| SERUM | Soro |
| DIL SPE | Diluidor de espécimes |
| DIL BUF | Tampão de diluição |
| ANTISERUM | Anti-soro |
| IMMUNOADSORBENT | Imunoadsorvente |
| DIL CAL | Diluyente do calibrador |
| REC SOLN | Solução de Reconstituição |
| PEG | Polietileno-glicol |
| EXTR SOLN | Solução de Extracção |
| ELU SOLN | Solução de Eluição |
| GEL | Cartuchos de sílica Bond Elut |
| PRE SOLN | Solução de pré-tratamento |
| NEUTR SOLN | Solução de neutralização |
| TRACEUR BUF | Tampão Marcador |
| TLT | Placa de micro titulação |
| Ab HRP | HRP Conjugação |
| Ag HRP | HRP Conjugação |
| Ab HRP CONC | HRP Conjugação concentrada |
| Ag HRP CONC | HRP Conjugação concentrada |
| CONJ BUF | Conjuga o tampão |
| CHROM TMB CONC | Cromogénica TMB concentrada |
| CHROM TMB | Solução Cromogénica TMB |
| SUB BUF | Tampão de substrato |
| STOP SOLN | Solução de Paragem |
| INC SER | Soro de incubação |
| BUF | Tampão |
| Ab AP | AP Conjugação |
| SUB PNPP | Substrato PNPP |
| BIOT CONJ CONC | Concentrado conjugado de biotina |
| AVID HRP CONC | Concentrado HRP de avidina |
| ASS BUF | Tampão de ensaio |
| Ab BIOT | Conjugado de biotina |
| Ab | Anticorpo específico |
| SAV HRP CONC | Estreptavidina HRP concentrado |
| NSB | Ligações não específicas |
| 2nd Ab | Anticorpo secundário |
| ACID BUF | Tampão de acidificação |
| DIST | Distribuidor |
| TRAY | Bandeja de incubação |
| PMSF | Solução PMSF |
| | Proteger da luz |
| STRIP | Tira " Dot" |
| SUB | Substrato |
| EXTR SOLN CONC | Tampão de extração concentrado |
| CART | Cartucho |
| SAV HRP | Estreptavidina HRP |
| PIPETTE | Pipeta |
| WASH SOLN | Tampão de lavagem |

| | Χρησιμοποιούμενα σύμβολα |
|-----------------|--|
| | Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης |
| | Θερμοκρασία αποθήκευσης |
| | Ημερομηνία λήξης |
| LOT | Αριθμός παρτίδας |
| REF | Αριθμός καταλόγου |
| CONTROL | Πρότυπο ελέγχου |
| IVD | In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν |
| | Κατασκευαστής |
| | Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις |
| WASH SOLN CONC | Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης |
| CAL 0 | Μηδενικός βαθμονομητής |
| CAL N | Βαθμονομητής # |
| CONTROL N | Ορός ελέγχου # |
| Ag 125I | Ιζηθέτης |
| Ab 125I | Ιζηθέτης |
| Ag 125I CONC | Χρωμογόνος Ιζηθέτης |
| Ab 125I CONC | Χρωμογόνος Ιζηθέτης |
| | Σωληνάρια |
| INC BUF | Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης |
| ACETONITRILE | Ακετονιτρίλιο |
| SERUM | Ορός |
| DIL SPE | Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων |
| DIL BUF | Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης |
| ANTISERUM | Αντιορός |
| IMMUNOADSORBENT | Ανοσοπροσροφητικό |
| DIL CAL | Αραιωτικό βαθμονομητών |
| REC SOLN | Διάλυμα ανασύστασης |
| PEG | Πολυαιθυλενογλυκόλη |
| EXTR SOLN | Διάλυμα εκχύλισης |
| ELU SOLN | Διάλυμα έκλουσης |
| GEL | Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut |
| PRE SOLN | Διάλυμα προεπεξεργασίας |
| NEUTR SOLN | Διάλυμα εξουδετέρωσης |
| TRACEUR BUF | Ρυθμιστικό διάλυμα |
| μλ | Πλάκα μικροτιλοδότησης |
| Ab HRP | HRP Σύζευγμα |
| Ag HRP | HRP Σύζευγμα |
| Ab HRP CONC | Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα |
| Ag HRP CONC | Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα |
| CONJ BUF | Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος |
| CHROM TMB CONC | Χρωμογόνος TMB |
| CHROM TMB | Διάλυμα χρωμογόνου TMB |
| SUB BUF | Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος |
| STOP SOLN | Ανασχετικό αντιδραστήριο |
| INC SER | Ορός επώασης |
| BUF | Ρυθμιστικό διάλυμα |
| Ab AP | AP Σύζευγμα |
| SUB PNPP | PNPP υποστρώματος |
| BIOT CONJ CONC | Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη |
| AVID HRP CONC | Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP |
| ASS BUF | Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού |
| Ab BIOT | αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη |
| Ab | Ειδικό Αντίσωμα |
| SAV HRP CONC | Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεζευγμένη με HRP |
| NSB | μη-ειδική δέσμευση |
| 2nd Ab | 2ο Αντίσωμα |
| ACID BUF | Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο |
| DIST | Διανομέας |
| TRAY | Δίσκοι επώασης |
| PMSF | Διάλυμα PMSF |
| | Προστατεύετε από το φως |
| STRIP | Ταινία κουκκίδων |
| SUB | Υπόστρωμα |
| EXTR SOLN CONC | Συμπύκνωμα ρυθμ. διαλύματος εκχύλισης |
| CART | Φύσιγγα |
| SAV HRP | Στρεπταβιδίνη HRP |
| PIPETTE | πιπέτα |
| WASH SOLN | Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης |

| | Używane symbole |
|-----------------|---|
| | Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją |
| | Temperatura przechowywania |
| | Zużyć przed |
| LOT | Kod serii |
| REF | Numer katalogowy |
| CONTROL | Kontrola |
| I V D | Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro |
| | Producent |
| | Zawartość wystarczająca do <n> testów |
| WASH SOLN CONC | Roztwór płuczący stężony |
| CAL 0 | Kalibrator zerowy |
| CAL N | Kalibrator nr |
| CONTROL N | Kontrola nr |
| Ag 125I | Znacznik izotopowy |
| Ab 125I | Znacznik izotopowy |
| Ag 125I CONC | Znacznik izotopowy stężony |
| Ab 125I CONC | Znacznik izotopowy stężony |
| | Probówki |
| INC BUF | Wymagana inkubacja buforu |
| ACETONITRILE | Acetonitryl |
| SERUM | Surowica |
| DIL SPE | Rozcieńczalnik próbki |
| DIL BUF | Bufor do rozcieńczania |
| ANTISERUM | Antysurowica |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoabsorbent |
| DIL CAL | Rozcieńczalnik kalibratora |
| REC SOLN | Roztwór do rozcieńczania |
| PEG | Glikol poli(oksy)etylenowy |
| EXTR SOLN | Roztwór ekstrakcyjny |
| ELU SOLN | Roztwór elucyjny |
| GEL | Kolumny krzemionkowe Bond Elut |
| PRE SOLN | Roztwór do przygotowania wstępnego |
| NEUTR SOLN | Roztwór neutralizujący |
| TRACEUR BUF | Bufor znacznika |
| ULF | mikropłytki |
| Ab HRP | Koniugat peroksydazy chrzanowej |
| Ag HRP | Koniugat peroksydazy chrzanowej |
| Ab HRP CONC | Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej |
| Ag HRP CONC | Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej |
| CONJ BUF | Bufor do koniugacji |
| CHROM TMB CONC | Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny) |
| CHROM TMB | Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny) |
| SUB BUF | Bufor substratu |
| STOP SOLN | Roztwór zatrzymujący reakcję |
| INC SER | Wymagana inkubacja surowicy |
| BUF | Bufor |
| Ab AP | Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej) |
| SUB PNPP | p-nitrofenylofosforan substratowy |
| BIOT CONJ CONC | Koncentrat koniugatu biotyny |
| AVID HRP CONC | Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną |
| ASS BUF | Bufor do oznaczania |
| Ab BIOT | Koniugatu biotyny |
| Ab | Przeciwciało swoiste |
| SAV HRP CONC | Koncentrat streptawidyny HRP |
| NSB | Wiązanie nieswoiste |
| 2nd Ab | Drugie przeciwciało |
| ACID BUF | Bufor zakwaszający |
| DIST | Dystrybutor |
| TRAY | Tacki do inkubacji |
| PMSF | Roztwór fluorku fenylometylosulfonilu (PMSF - z ang. phenylmethylsulfonyl fluoride) |
| | Chronić przed światłem |
| STRIP | Pasek testowy z antygenami - „Dot Strip” |
| SUB | Substrat |
| EXTR SOLN CONC | Stężony bufor do ekstrakcji |
| CART | Kaseta |
| SAV HRP | Streptawidyna sprzężona z peroksydazą chrzanową (HRP - z ang. horseradish peroxidase) |
| PIPETTE | Pipeta |
| WASH SOLN | Bufor do płukania |