



VASOPRESSIN Direct

RIA

RK-VPD 100 tests

Revision date: 2012-09-12

ENGLISH

INTENDED USE

This double antibody radioimmuno-assay is designed for the quantitative *in vitro* diagnostic direct measurement of **arginine vasopressin** (anti-diuretic hormone, ADH) in EDTA plasma (1-3).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Immunoreactive vasopressin is measured with a double antibody radioimmunoassay according to a modified method of Glick and Kagan (4). Samples and calibrators are at first pre-incubated with the anti-vasopressin antibody for 24 hours. ¹²⁵I-vasopressin then competes with vasopressin present in samples and calibrators for the same antibody binding sites. After a second incubation of 24 hours incubation, the solid-phase second antibody is added to the mixture, and the antibody-bound fraction is finally precipitated and counted.

REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
Phosphate Buffer lyophilized Buffer	1 vial	B-VPD-PB	Reconstitute with 50 ml of deionized water
Antibody Dilution Buffer	1 vial 6 ml	B-VPD-DB	Ready to use
Antiserum lyophilized anti-vasopressin antibody	1 vial	B-VPD-AS	Reconstitute with 5 ml of Antibody Dilution Buffer
Tracer lyophilized ¹²⁵ I-Vasopressin	1 vial	B-ADH-TR	Reconstitute with 11 ml of Phosphate Buffer
Calibrator¹⁾ Lyophilized synthetic arginine vasopressin in Phosphate Buffer	1 vial	B-VPD-CA	Reconstitute with 5 ml of deionized water
Controls Normal / High²⁾ Arginine Vasopressin in a buffer matrix	2 vials	B-VPD-CONSET	Reconstitute with 5 ml of deionized water
Second Antibody Cellulose coated anti-rabbit antibody	1 vial 11 ml	B-AB2	Ready to use

Table 1

¹⁾ Reconstitution of the Calibrator results in a stock solution of 80 pg/ml arginine vasopressin [Arg 8]-vasopressin.

²⁾ Lot specific amounts of arginine vasopressin in buffer matrix. Refer to the additional QC Data Sheet for exact concentrations.

STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS

Unopened Reagents	
The kit components are stable at 2-8°C. Do not use the kit beyond the expiration date printed on the labels. Do not freeze the Second Antibody.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Phosphate Buffer	Stable for 2 months at 2-8°C
Antibody Dilution Buffer	Store at 2-8°C until expiration date.
Antiserum	Stable for 2 months at -20°C
Tracer	Store at -20°C Aliquot if repeated use is expected
Calibrator	Stable for 2 months at -20°C
Controls	Aliquot if repeated use is expected
Second Antibody	Store at 2-8°C (do not freeze)

Table 2

PRECAUTIONS

SAFETY PRECAUTIONS

- **Radioactive Material:** This kit contains radioactive material which does not exceed 56 kBq of ¹²⁵Iodine.
- The receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the local regulations. Unused solutions and radioactive waste should be disposed of according to local State and Federal regulations.
- All kit reagents except of the second antibody (B-AB2) **contain** components of human origin. Although tested and

found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.

TECHNICAL PRECAUTIONS

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Reconstitute the lyophilized reagents as indicated. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Counting time should be selected in order to keep statistical counting error small: e.g., at 2000 cpm the counting error is at 5%; at 10000 cpm it is only 1%.
- If the initial concentration of an unknown sample reads above the highest calibrator, the sample should be diluted with phosphate buffer and tested again according to the assay procedure.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- 50 µl, 100 µl, 250 µl, 400 µl and 1000 µl precision pipettes with disposable tips.
- 5.0 ml and 10 ml volumetric pipettes.
- Beaker and cylinder necessary for the reconstitution of the phosphate buffer.
- Disposable polystyrene tubes for the preparation of the calibrator dilutions.
- Disposable conical polystyrene tubes to run the assay (e.g. Sarstedt # 57.477).
- Distilled or deionized water.
- Vortex mixer.
- Stir bar and magnetic stirrer.
- Centrifuge.
- Aspiration device.
- Gamma counter.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Appropriate sample collection is essential to ensure accurate results of the vasopressin analysis. The procedure calls for true basal levels, the patient must be fasting for at least 12 hours and must stay recumbent, without any stress and in a quiet environment, for at least 1 hour prior to blood collection.

Collect blood (at least 2 ml) into an **EDTA venipuncture tube** (see below) and immediately place the sample on ice. Centrifuge at 2-8°C at 2000 g for 15 minutes within 10 minutes after blood collection, separate the plasma from the cells and freeze the specimen immediately in a plastic tube at ≤-20°C if it will not be used immediately. The procedure calls for 400 µl of plasma per assay tube.

ASSAY PROCEDURE

Calibrator Dilution: In order to obtain an entire standard curve, serial dilutions of the Calibrator are prepared as follows:

- Label seven tubes A through G and Pipet 1.0 ml of phosphate buffer into tubes B through G.
- Pipet 1.0 ml of the reconstituted Calibrator stock solution (80 pg/ml) into tubes A and B, vortex.
- Transfer 1.0 ml from tube B to tube C, vortex.
- Continue to transfer 1.0 ml from each tube until dilution series is completed.

The corresponding concentrations of arginine vasopressin are:

A 80 pg/ml (73.6 pmol/l)	E 5.0 pg/ml (4.6 pmol/l)
B 40 pg/ml (36.8 pmol/l)	F 2.5 pg/ml (2.3 pmol/l)
C 20 pg/ml (18.4 pmol/l)	G 1.25 pg/ml (1.1 pmol/l)
D 10 pg/ml (9.2 pmol/l)	

Allow all reagents for steps 1-4 to come to room temperature (18-28°C) prior to use.

1. Label 10 polystyrene tubes in duplicate: A to G (Calibrator), NSB (blank), MB (maximum binding) and T (total activity). Label additional polystyrene tubes in duplicate for patient samples and controls.
- 2a. Pipet 700 µl of phosphate buffer into the NSB tubes and 650 µl into the MB tubes.
- 2b. Add 250 µl of phosphate buffer to all remaining tubes, except the T tubes.
- 3a. Pipet 400 µl of each Calibrator (from A to G) into the corresponding tubes.
- 3b. Pipet 400 µl of the patient samples and Controls into the corresponding tubes.
4. Add 50 µl of the reconstituted vasopressin antiserum to all tubes except the NSB and T tubes. Vortex.
5. Incubate all tubes for 24± 3 hours at 18-28°C.
6. Add 100 µl of the reconstituted vasopressin tracer to all tubes. Vortex. Remove the T tubes for counting at step 12, they will require no further processing.
7. Incubate for 24± 3 hours at 18-28°C.
- 8a. Invert the solid phase second antibody bottle several times, add a stir bar and place the bottle on a magnetic stirrer.
- 8b. While stirring the second antibody suspension continuously, add 100 µl of the suspension to all assay tubes (except the T tubes). Vortex.
9. Incubate for 20±1 minutes at 18-28°C. **Do not resuspend the precipitate.**
10. Add 1 ml of deionized water to each tube (except the T tubes).
11. Centrifuge for 5 minutes 1000 x g. Aspirate the supernatant (**except the T tubes**) and retain the precipitates for counting.
12. Count all tubes for 1 minute in a gamma counter.

INTERPRETATION OF RESULTS & STANDARDIZATION

- Record the cpm for all tubes (T, NSB, MB, Calibrators A-G samples and Controls) and calculate the mean cpm for each pair of tubes.
- Subtract the mean assay blank (NSB tubes) from the respective mean of each pair of tubes:
$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{Average}} - \text{cpm}_{\text{Average NSB}}$$
- Calculate the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB tubes), with the NSB-corrected cpm of the MB tubes taken as 100%.
$$B/B_0(\%) = \text{percentbound} = \frac{\text{netcpm}}{\text{netMBcpm}} \times 100$$
- Prepare a lin/log graph paper and plot the percent bound on the vertical axis against the vasopressin concentration (pg/ml) on the horizontal axis for each of the Calibrators. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a spline smoothed fitting algorithm.
- Determine Vasopressin concentrations in the patient samples and Controls from this standard curve. Alternative data reduction methods are equally acceptable. To get the pmol/L concentrations of the results, multiply the pg/ml values by a factor of 0.92.

Standardization: The BÜHLMANN [Arg 8]-vasopressin Calibrator is weighed in material which was calibrated against WHO reference preparation 77/501.

Refer to Table 11 and Figure 1 for examples of results and standard curves. *These results and standard curves are for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this instruction for use.

The accuracy of each actual calibrator lot is calibrated against WHO reference preparation 77/501.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the QC Data Sheet added to the kit. If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) expiration dates of reagents iii) storage and incubation conditions iv) purity of water.

PERFORMANCE LIMITATIONS

- It is mandatory using EDTA plasma **ONLY** in order to inhibit metalloprotease activities.
- Use of conical polystyrene tubes is strongly recommended. During step 11 of the assay procedure, a more solid pellet will be achieved and the following aspiration of the supernatant can be done much easier.
- Patient samples that are not properly collected and handled may cause inaccurate arginine vasopressin results. Patient samples must be frozen immediately in order to ensure correct results at the time of measurement (see Specimen Collection).
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.
- Vasopressin is extremely unstable. It is crucial to freeze the samples immediately. Transportation has to be carried out at -20 °C.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The assay performance characteristics have been validated in duplicates.

Intra-Assay Precision (Within-Run): 6.0%. The intra-assay precision was calculated from the results of 10 pairs of values from each sample in a single run. The values are presented in Table 12.

Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 9.9%. The inter-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from two EDTA plasma samples in 20 different runs. The values are presented in Table 13.

Detection limit (LoB): 0.75 pg/ml (0.82 pmol/l). The limit of blank of Vasopressin Direct RIA was calculated by subtracting two standard deviations of averaged Zero Calibrator duplicates from the counts at maximum binding.

Detection limit (LoQ): 1.3 pg/ml (1.2 pmol/l). The least detectable dose (limit of quantification) of the assay was calculated to be at the intra assay CV of 10%.

Spiking Recovery: 101.8%. EDTA plasma was spiked with increasing amounts of synthetic arginine-vasopressin and analyzed according to the assay procedure. The values are presented in Table 14.

Specificity: The following cross-reactions of the vasopressin antiserum were determined at 50% binding:

Arginine vasopressin	100.0	%
Lysine vasopressin*	0.25	%
Desmopressin (DDAVP)	0.0085	%
Oxytocin	0.001	%
Vasotocin	0.001	%

* In Pigs and Hippopotamus the arginine at position eight is replaced by lysine

Method comparison: The VASOPRESSIN-DIRECT RIA has been compared with the Bühlmann VASOPRESSIN RIA (RK-AR1; column extraction). Results obtained with 28 blood donors (EDTA plasma) show an excellent correlation (see Figure 2).

The clinical validity of the BÜHLMANN VASOPRESSIN-RIA (RK-VPD) was demonstrated in many clinical and research publications (5-7).

REFERENCE INTERVALS

In a recent evaluation with 68 blood donors, we have established a normal value (mean+2SD) of **≤6.7 pg/ml** with values between undetectable and 7.6 pg/ml.

Values for blood donors may be slightly elevated due to unknown fasting conditions and unknown position before donation. The osmolality has not been determined. Therefore, correctly collected basal values should be in the lower range or even undetectable.

Vasopressin is mainly determined after dynamic testing by stimulation or suppression of vasopressin release.

DEUTSCH

VERWENDUNGSZWECK

Dieser Doppel-Antikörper Radioimmuno-Assay RIA wird für die direkte, quantitative *in vitro* diagnostische Bestimmung von **Arginin-Vasopressin** (Antidiuretisches Hormon, ADH) in EDTA Plasma verwendet (1-3).

PRINZIP DER METHODE

Immunreaktives Vasopressin wird mit Hilfe eines Doppel-Antikörper Radioimmuno-Assay, entsprechend der Methode von Glick und Kagan (4), bestimmt. Die Proben und Kalibratoren werden zuerst für 24 Stunden mit einem Anti-Vasopressin Antikörper (AK) vorinkubiert. Nach der Zugabe von ¹²⁵I-Vasopressin konkurriert dieses mit dem in den Proben und Kalibratoren vorhandenen Vasopressin für die vorhandenen Antikörper Bindungsstellen. Nach einer zweiten 24 Stunden Inkubation, wird ein zweiter Antikörper zugegeben, welcher an einer festen Phase (Zellulose) gebunden ist. Die am Antikörper gebundene Fraktion wird danach präzipitiert und in einem Gamma-Counter gezählt.

GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Rekonstitution
Phosphat-Puffer lyophilisierter Puffer	1 Flasche	B-VPD-PB	Mit 50 ml deionisiertem Wasser lösen
Antikörper Verdünnungspuffer	1 Flasche 6 ml	B-VPD-DB	Gebrauchsfertig
Antiserum lyophilisierter Anti-Vasopressin Ak	1 Flasche	B-VPD-AS	Mit 5 ml Antikörper Verdünnungspuffer lösen
Tracer lyophilisiertes ¹²⁵ I-Vasopressin	1 Flasche	B-ADH-TR	Mit 11 ml Phosphat-Puffer lösen
Kalibrator¹⁾ lyoph. synthetisches Vasopressin	1 Flasche	B-VPD-CA	Mit 5 ml deionisiertem Wasser lösen
Kontrollen Normal / High²⁾ Arginin Vasopressin in einer Puffermatrix	2 Flaschen	B-VPD-CONSET	Mit 5 ml deionisiertem Wasser lösen
2. Antikörper Zellulose gebundener Anti-Kaninchen Ak	1 Flasche 11 ml	B-AB2	Gebrauchsfertig

Tabelle 3

¹⁾ Die Rekonstitution des Kalibrators resultiert in einer Stocklösung von 80 pg/ml Arginin-Vasopressin [Arg 8]-Vasopressin.

²⁾ Lot-abhängige Menge Arginin-Vasopressin in einer Puffermatrix. Siehe das zusätzliche QC Datenblatt für die genaue Konzentration.

LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER REAGENZIEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Die Kit-Komponenten sind bei 2-8°C haltbar. Nach Ablauf des Verfalldatums nicht mehr verwenden. Den 2. Antikörper nicht einfrieren.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Phosphat-Puffer	Bei 2-8°C für 2 Monate haltbar.
Antikörper Verdünnungspuffer	Bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
Antiserum	Bei -20°C für 2 Monate haltbar.
Tracer	Bei -20°C lagern. Bei wiederholtem Gebrauch aliquotieren.
Kalibrator	Bei -20°C für 2 Monate haltbar.
Kontrollen	Bei wiederholtem Gebrauch aliquotieren.
2. Antikörper	Bei 2-8°C lagern. (nicht einfrieren)

Tabelle 4

VORSICHTSMASSNAHMEN

SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Radioaktives Material: Der RK-VPD Kit enthält radioaktives Material (125Jod) von weniger als 56 kBq.
- Der Erwerb, sowie der Gebrauch von radioaktivem Material muss entsprechend der landesspezifischen Bestimmungen erfolgen. Wir empfehlen, dass Sie sich über die lokalen Bestimmungen Ihres Landes bezüglich der Vorsichtsmaßnahmen beim Gebrauch und der Entsorgung von Kitreagenzien, radioaktivem Material und Patientenproben informieren.
- Reagenzien, die Material humanen Ursprungs enthalten: Alle Kitreagenzien, ausser dem 2. Antikörper (B-AB2) enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.

TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Die Reagenzien dürfen nicht nach dem Verfallsdatum verwendet werden, das auf den Etiketten angegeben ist.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Lots.
- Lassen Sie die Reagenzien auf Raumtemperatur äquilibrieren. Lösen Sie lyophilisierte Reagenzien wie angegeben auf. Reagenzien vor Gebrauch gut mischen (vortexen).
- Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Tests verwendet werden.
- Die Zählzeit sollte so gewählt werden, dass der statische Zählfehler klein ist. Bei 2000 cpm ist der Zählfehler bei 5%; bei 10000 cpm nur noch 1%.
- Falls die Konzentration einer unbekannten Probe höher als der höchste Kalibrator ist, muss die Probe mit Phosphat-Puffer weiter verdünnt und noch einmal getestet werden.

ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 50 µl, 100 µl, 250 µl, 400 µl und 1000 µl Präzisionspipetten mit Einwegspitzen.
- 5.0 ml und 10 ml volumetrische Pipette.
- Becher und Messzylinder für die Rekonstitution des Phosphat-Puffers.
- Einweg Polystyrenröhrchen für die Vorbereitung der Kalibrator-Verdünnungen.
- Konische Einweg Polystyrenröhrchen für die Testdurchführung (z.B. Sarstedt Art.-Nr. 57.477).
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser.
- Vortex Schüttler.
- Magnetrührer mit Rührstab.
- Zentrifuge.
- Absaugvorrichtung.
- Gammastrahlungszähler (Gamma-Counter).

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Eine korrekte Probengewinnung ist essentiell für den Erhalt von aussagekräftigen Resultaten in der Vasopressin Analyse. Falls die Testdurchführung nach tatsächlichen Basalwerten verlangt, darf der Patient während mindestens 12 Stunden keine Nahrung zu sich nehmen und muß für

mindestens 1 Stunde, vor der Blutentnahme, in einer ruhigen Umgebung ohne Streßeinwirkung liegen.

Die Blutproben (mindestens 2 ml) werden in **EDTA-Blutabnehmerröhrchen** gesammelt und unmittelbar danach auf Eis gelegt und innerhalb von 10 Minuten für 15 Minuten bei 2-8°C und 2000 x g zentrifugiert. Das Plasma wird von den Zellen getrennt und in einem Plastikröhrchen bei -20°C direkt eingefroren. Die Testdurchführung verlangt nach 400 µl Plasma pro Probenröhrchen.

ARBEITSANLEITUNG

Kalibrator Verdünnung: Um eine vollständige Standardkurve zu erhalten, muss eine serielle Verdünnungsreihe folgendermaßen durchgeführt werden:

- Sieben Röhrchen von A-G markieren und 1 ml Phosphat-Puffer in Röhrchen B-G pipettieren.
 - 1 ml gelöste Kalibrator Stocklösung (80 pg/ml) in Röhrchen A und B geben, vortexen.
 - 1 ml von Röhrchen B in Röhrchen C geben, vortexen.
 - Jeweils 1 ml in das nächste Röhrchen geben und vortexen, um die Verdünnungsreihe zu erstellen. Folgende Arginin-Vasopressin Konzentrationen werden hergestellt:
- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| A 80 pg/ml (73.6 pmol/l) | E 5.0 pg/ml (4.6 pmol/l) |
| B 40 pg/ml (36.8 pmol/l) | F 2.5 pg/ml (2.3 pmol/l) |
| C 20 pg/ml (18.4 pmol/l) | G 1.25 pg/ml (1.1 pmol/l) |
| D 10 pg/ml (9.2 pmol/l) | |

Alle Reagenzien für die Schritte 1 bis 4 müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28°C) gebracht werden.

1. 10 Polystyrenröhrchen im Doppel markieren: Kalibrator A bis G, NSB (Blank), MB (maximale Bindung) und T (totale Aktivität). Weitere Röhrchen im Doppel für die Patientenproben und die Kontrollen markieren.
- 2a. 700 µl Phosphat-Puffer in das NSB und 650 µl in das MB Röhrchen geben.
- 2b. 250 µl Phosphat-Puffer in sämtliche weiteren Röhrchen, ausser dem T Röhrchen, geben.
- 3a. 400 µl von jedem Kalibrator (A-G) in das entsprechende Röhrchen geben.
- 3b. 400 µl Patientenproben und Kontrollen in das entsprechende Röhrchen geben.
4. 50 µl gelöstes Vasopressin Antiserum zu allen Röhrchen, ausser dem NSB und dem T Röhrchen, geben.
5. Alle Röhrchen bei 18-28°C für 24±3 Stunden inkubieren.
6. 100 µl gelöster ¹²⁵I-Vasopressin-Tracer zu allen Röhrchen geben, vortexen. Das T Röhrchen bis zum Schritt 12 zur Seite legen.
7. Die verbleibenden Röhrchen für 24±3 Stunden bei 18-28°C inkubieren
- 8a. Den 2. Antikörper (feste Phase) mehrmals invertieren einen Rührstab hineingeben und auf einem Magnetrührer stellen.
- 8b. Während des Rührens, werden je 100 µl des 2. Antikörpers zu sämtlichen Probenröhrchen (außer T Röhrchen) zugegeben, vortexen.
9. Für 20±1 Minuten bei 18-28°C inkubieren. **Das Präzipitat danach nicht mehr lösen.**
10. 1 ml deionisiertes Wasser zu jedem Röhrchen (ausser T Röhrchen) geben.
11. Für 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugieren. Den Überstand (außer T Röhrchen) absaugen (Aspiration) und das Präzipitat für die Zählung zurückbehalten.
12. Alle Röhrchen für eine Minute in einem Gamma-Counter messen.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE & STANDARDISIERUNG

- Für alle Röhrchen werden im Gammazähler die cpm bestimmt (T, NSB, MB, Kalibratoren A-G, Proben und Kontrollen) und die entsprechenden Mittelwerte ermittelt.
- Der Mittelwert vom Blank (NSB) wird von den anderen Mittelwerten subtrahiert.

$$\text{Netto cpm} = \text{cpm}_{\text{Mittelwert}} - \text{cpm}_{\text{Mittelwert NSB}}$$

Die Bindung (%) der Kalibratoren und Proben wird errechnet als Quotient des jeweiligen Mittelwertes (cpm) zum MB (cpm).

$$\% \text{ Bindung} = \frac{\text{netto cpm}}{\text{netto MB cpm}} \times 100$$

- Auf einem halblogarithmischen (lin/log) Papier wird auf der vertikalen Achse die Bindung in Prozent und auf der horizontalen Achse die Vasopressin Konzentration der Kalibratoren (pg/ml) aufgetragen. Die beste passende Kurve durch die Punkte zeichnen oder mit einem entsprechenden Computerprogramm eine vier Parameter Analyse anwenden.
- Die Vasopressin Konzentrationen der Patientenproben und der Kontrollen aus der erstellten Standardkurve herauslesen. Alternative Datenverdichtungsmethoden können ebenfalls verwendet werden.

Um die Ergebnisse in pmol/L umzurechnen, werden die Ergebnisse in pg/ml mit dem Faktor 0.92 multipliziert.

Standardisierung: Der BÜHLMANN [Arg 8]-Vasopressin Standard wird bei der Produktion gegen die WHO Referenzpräparation 77/501 kalibriert.

Siehe Table 11 und Figure 1 für ein Zahlenbeispiel und eine Standardkurve. Diese Standardkurve ist nur zu Anschauungszwecken dargestellt. Eine Standardkurve muß für jedes zu testende Probenset erstellt werden.

QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht, durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Jedes Kalibratoren Lot wird gegen das WHO-Standard 77/501 getestet.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereiches liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC Datenblatt angegeben. Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen.

Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, iv) Wasserreinheit.

LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Es ist absolut notwendig nur EDTA Plasma zu verwenden um Metalloproteasen zu deaktivieren. Heparin-Plasma kann nicht im Vasopressin direct Test verwendet werden und interferiert mit der Antikörperbindung.
- Die Verwendung konischer Polystyrenröhrchen wird dringen empfohlen. Während Schritt 11 der Arbeitsanleitung wird dadurch ein kompakteres Pellet erhalten, und das nachfolgende Absaugen des Überstandes kann einfacher durchgeführt werden.

- Nicht korrekt gesammelte, oder behandelte Patientenproben können zu ungenauen Resultaten führen. Die Plasma-proben müssen unmittelbar nach Abnahme eingefroren werden um die Richtigkeit der Vasopressin-Konzentration zum Zeitpunkt der Messung zu gewährleisten (siehe Untersuchungsmaterial und Lagerung, S.5).
- Vasopressinwerte sollten dem Arzt nur als zusätzliche Information zur Erstellung einer Diagnose dienen.
- Vasopressin ist extrem instabil. Es ist erforderlich, die Proben sofort einzufrieren. Die Proben sollten gefroren bei -20 °C transportiert werden.

LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale wurden in Doppelbestimmung ermittelt.

Intra-Assay Präzision: 6.0%. Die Intra-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von 10 Wertepaaren errechnet, die im gleichen Testansatz erhalten wurden. Die Resultate sind in Table 12 angegeben.

Inter-Assay Präzision: 9.9%. Die Inter-Assay Präzision wurde aus den Resultaten von 20 Wertepaaren von zwei EDTA Plasmaproben aus 20 verschiedenen Testansätzen berechnet. Die Resultate sind in Table 13 angegeben.

Nachweisgrenze (LoB): 0.75 pg/ml (0.82 pmol/l). Die analytische Sensitivität des Vasopressin direct RIA wurde aus gemittelten Null Kalibratoren (MB) errechnet. Dabei wurden 2 Standardabweichungen vom cpm Mittelwert des MB subtrahiert.

Nachweisgrenze (LoQ): 1.3 pg/ml (1.2 pmol/l). Die funktionell kleinste nachweisbare Menge (FLDD) Vasopressin wurde im Intra-Assay bestimmt, bei einem Grenzwert des Variationskoeffizienten von 10%.

Wiederfindung: 101.8%. Eine EDTA Plasmaprobe wurde mit ansteigender Menge synthetischem Arginin-Vasopressin versetzt und anschließend entsprechend der Arbeitsanleitung gemessen. Die Resultate sind in Table 14 angegeben.

Spezifität: Die folgenden Kreuzreaktionen des Vasopressin Antiserums wurde bei einer Bindung von 50% bestimmt:

Arginin-Vasopressin	100.0 %
Lysin-Vasopressin*	0.25 %
Desmopressin (DDAVP)	0.0085 %
Oxytocin	0.001 %
Vasotocin	0.001 %

* In Schweinen und Flußpferden ist das Arginin an Position acht durch ein Lysin ersetzt.

Methodenvergleich: Der Vasopressin direct RIA wurde mit dem Bühlmann Vasopressin RIA (RK-AR1; Säulenextraktion) verglichen. Die Resultate von 28 normalen Blutspendern zeigten eine hervorragenden Korrelation (siehe Figure 2). Die klinische Relevanz des Bühlmann Vasopressin direct RIA wurde in verschiedenen klinischen und Forschungspublikationen gezeigt (5-7).

REFERENZBEREICHE

In einer Evaluation mit 68 normalen Blutspendern wurde ein Referenzbereich (Mittelwert+2SD) von **≤ 6.7 pg/ml** ermittelt, in einem Bereich von nicht nachweisbar bis 7.6 pg/ml.

Die Werte von Blutspendern können leicht erhöht sein, da zumeist nicht bekannt ist ob der Spender in den letzten 12 Stunden Nahrung zu sich genommen hat, und ob er in liegender Position war. Die Osmolalität wurde nicht bestimmt. Dadurch ist anzunehmen, daß korrekt abgenommene Blutproben im unteren Bereich oder sogar nicht nachweisbar sind.

Vasopressin wird meist nach Durchführung von dynamisches Testen nach Stimulation oder Suppression der Vasopressin Ausschüttung bestimmt.

FRANÇAIS

UTILISATION

Ce radioimmuno-essai à double anticorps est destiné à la détermination quantitative, directe et *in vitro* de l'**arginine vasopressine** (hormone anti-diurétique, ADH) dans les échantillons de plasma EDTA (1-3).

PRINCIPE DU DOSAGE

L'arginine vasopressine immunoréactive est dosée au moyen d'un RIA à double anticorps basé sur la méthode modifiée de Glick and Kagan (4). Les échantillons plasmatiques et les calibrateurs sont pré-incubés durant 24 heures avec l'anticorps anti-vasopressine. La vasopressine marquée à 125 I entre en compétition avec celle présente dans les échantillons et les calibrateurs pour les mêmes sites de liaison de l'anticorps. Après une seconde incubation de 24 heures, le second anticorps en phase solide est ajouté au mélange. La fraction liée est finalement précipitée puis mesurée.

REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
Tampon phosphate lyophilisé	1 flacon	B-VPD-PB	Reconstituer avec 50 ml d'eau déionisée
Tampon de dilution de l'anticorps	1 flacon 6 ml	B-VPD-DB	Prêt à l'emploi
Antisérum anti-vasopressine lyophilisé	1 flacon	B-VPD-AS	Reconstituer avec 5 ml de tampon de dilution de l'anticorps
Marqueur radioactif lyophilisé 125 I-Vasopressine	1 flacon	B-ADH-TR	Reconstituer avec 11 ml de tampon phosphate.
Calibrateur ¹⁾ Arginine vasopressine synthétique lyophilisée ds tampon phosphate	1 flacon	B-VPD-CA	Reconstituer avec 5 ml d'eau déionisée
Contrôles normal/élevé ²⁾ Arginine Vasopressine dans une matrice tampon	2 flacons	B-VPD-CONSET	Reconstituer avec 5 ml d'eau déionisée
Second Anticorps Ac coaté cellulose anti-lapin	1 flacon 11 ml	B-AB2	Prêt à l'emploi

Table 5

¹⁾ La reconstitution du calibrateur permet d'obtenir une solution stock de 80 pg/ml d'arginine vasopressine.

²⁾ Concentrations d'arginine vasopressine [Arg 8]-vasopressine (dans une matrice tamponnée) spécifiques à chaque lot. Cf. documents de QC spécifiques pour les concentrations exactes.

STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non entamés/ fermés	
Les composants de la trousse sont stables à 2-8°C. Ne pas dépasser les dates de péremption imprimées sur les étiquettes des flacons. Ne pas congeler le second anticorps.	
Réactifs ouverts/reconstitués	
Tampon phosphate	Stable durant 2 mois à 2-8°C
Tampon de dilution de l'anticorps	Stable à 2-8°C jusqu'à la date d'expiration.
Antisérum	Stable durant 2 mois à -20°C
Marqueur radioactif	Conserver à -20°C. Aliquoter en cas d'utilisation répétée
Calibrateur	Stable durant 2 mois à -20°C
Contrôles	Aliquoter en cas d'utilisation répétée
Second anticorps	Conserver à 2-8°C (ne pas congeler)

Table 6

PRECAUTIONS

PRECAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Matériel radioactif: cette trousse contient des substances radioactives dont la radioactivité n'excède pas 56 kBq (1.5 μ Ci) d' 125 I.
- La réception, l'acquisition, la possession, l'utilisation et le transfert de substances radioactives ne doivent se faire qu'en respectant la réglementation de chaque pays. Nous

conseillons vivement à tous les utilisateurs de s'adresser aux autorités locales afin d'obtenir les directives précises concernant l'utilisation des réactifs contenus dans la trousse et la gestion des déchets radioactifs et biologiques (échantillons analysés).

- Matériel d'origine humaine : Tous les composants de cette trousse, à l'exception du second anticorps (B-AB2) contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.

PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Laisser les réactifs équilibrer à la température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Le temps de comptage devrait être suffisant de manière à éviter des erreurs statistiques (ex. au comptage de 2000 cpm correspond une marge d'erreur de 5%; le comptage de 10000 induit une marge d'erreur de 1%).
- Si les résultats obtenus sont supérieurs au calibrateur le plus concentré, il convient de procéder à la dilution de l'échantillon avec le tampon phosphate préalablement à un nouveau dosage.

MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour pipeter 50 μ l, 100 μ l, 250 μ l, 400 μ l et 1000 μ l
- Pipette volumétrique de 5.0 ml et 10 ml
- Bécher et éprouvette graduée pour la préparation du tampon phosphate
- Tubes jetables en polystyrène pour la dilution des calibrateurs
- Tubes jetables coniques pour le RIA en polystyrène (*par ex.* tubes Sarstedt; # 57.477)
- Eau distillée ou déionisée
- Vortex
- Agitateur magnétique et support
- Centrifugeuse
- Système d'aspiration
- Compteur - Gamma

PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Le prélèvement correct des échantillons est essentiel pour l'obtention de résultats de dosage pertinents. Si le protocole requiert des valeurs basales, il convient de faire jeûner le patient durant 12 heures et de lui demander de rester au repos dans un environnement calme et sans stress durant l'heure qui précède le prélèvement. Il faut recueillir au moins 2 ml de sang dans un **tube EDTA pour ponction veineuse** qui sera immédiatement placé sur de la glace après le prélèvement, puis centrifugé à 2-8°C à 2000 g pendant 15 minutes dans les 10 minutes qui suivent le prélèvement. Le plasma sera séparé des cellules puis congelé immédiatement à -20°C dans des tubes en plastique ou utilisé sans attendre pour l'essai (cf. ci-dessous). La procédure requiert 400 μ l de plasma par tube à essai.

PROCEDURE DE DOSAGE

Dilution du calibrateur : Afin d'obtenir une courbe d'étalonnage entière, des dilutions en série du calibrateur devront être réalisées.

- Identifier 7 tubes de A à G et pipeter 1.0 ml de tampon phosphate dans les tubes de B à G.
 - Pipeter 1.0 ml de calibrateur reconstitué (stock = 80 pg/ml) dans les tubes A et B, vortexer.
 - Transférer 1.0 ml du tube B au tube C, vortexer.
 - Continuer de transférer 1.0 ml de chaque tube jusqu'à ce que la série de dilution soit complète. Les concentrations correspondantes d'arginine vasopressine seront obtenues :
- | | |
|--------------------------|---------------------------|
| A 80 pg/ml (73.6 pmol/L) | E 5.0 pg/ml (4.6 pmol/L) |
| B 40 pg/ml (36.8 pmol/L) | F 2.5 pg/ml (2.3 pmol/L) |
| C 20 pg/ml (18.4 pmol/L) | G 1.25 pg/ml (1.1 pmol/L) |
| D 10 pg/ml (9.2 pmol/L) | |

Remarque: veiller à ce que tous les réactifs utilisés dans les étapes de 1 à 4 soient à température ambiante (18-28°C) avant utilisation.

1. Identifier 10 tubes en polystyrène en double: A à G (calibrateurs), NSB (blanc), MB (liaison maximale) et T (activité totale). Identifier autant d'autres tubes en polystyrène en double qu'il y a d'échantillons et de contrôles à analyser.
- 2a. Pipeter 700 µl de tampon phosphate dans les tubes NSB tubes et 650 µl dans les tubes MB.
- 2b. Ajouter 250 µl de tampon phosphate à tous les autres tubes, à l'exception des tubes T.
- 3a. Pipeter 400 µl de chaque calibrateur de A à G dans les tubes correspondants.
- 3b. Pipeter 400 µl des échantillons de patients et des contrôles dans les tubes correspondants.
4. Ajouter 50 µl d'antisérum reconstitué à tous les tubes à l'exception des tubes NSB et T. Vortexer.
5. Incuber durant 24 ± 3 heures à 18-28°C.
6. Ajouter 100 µl de marqueur radioactif à chaque tube. Vortexer. Mettre des bouchons sur les tubes T et les mettre de côté jusqu'à l'étape 12.
7. Incuber à nouveau pendant 24 ± 3 heures à 18-28°C.
- 8a. Retourner plusieurs fois le flacon contenant le second anticorps, y ajouter l'agitateur magnétique. Placer le flacon sur la plaque magnétique.
- 8b. Alors que l'anticorps est toujours sur la plaque magnétique, ajouter 100 µl de la suspension à tous les tubes à l'exception des tubes T. Vortexer.
9. Incuber durant 20 minutes $\pm$ 1 minute à 18-28°C **en prenant soin de ne pas remettre le précipité en suspension.**
10. Ajouter 1 ml d'eau déionisée à chaque tube à l'exception des tubes T.
11. Centrifuger pendant 5 minutes et 1000 x g. Aspirer tous les surnageants à l'exception des tubes T. Conserver les précipités pour le comptage.
12. Procéder au comptage de tous les tubes pendant 1 minute dans le compteur gamma.

CALCULATION DES RESULTATS & STANDARDISATION

Enregistrer les cpm de tous les tubes (T, NSB, MB, calibrateurs A-H, échantillons et contrôles) et calculer la moyenne de cpm pour tous les doubles. Soustraire la moyenne des tubes NSB des moyennes des doubles obtenues.

$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{moyenne}} - \text{cpm}_{\text{moyenne NSB}}$$

Calculer la liaison de chaque paire de tubes selon la formule suivante: MB – NSB = 100%.

$$\text{B/BO}(\%) = \text{pourcentage de liaison} = \frac{\text{cpm nets}}{\text{cpm MB nets}} \times 100$$

Préparer du papier lin/log et reporter les % de liaison sur l'axe vertical et les concentrations d'arginine vasopressine en pg/ml sur l'axe horizontal pour chaque calibrateur, échantillon et contrôle. Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression (spline smoothed). Déterminer les concentrations de vasopressine pour chaque patient et chaque contrôle à partir de la courbe d'étalonnage. D'autres méthodes de traitement des données peuvent également être employées.

Pour obtenir les concentrations en pmol/l, il convient de multiplier les résultats en pg/ml par le facteur 0.92.

Cf. Table 11 et Figure 1 pour des exemples de courbes d'étalonnage. Ces éléments ne sont donnés qu'à titre d'exemple. Il convient de générer une courbe d'étalonnage lors de chaque dosage.

Standardisation: le calibrateur arginine vasopressine BÜHLMANN - [Arg 8]-vasopressine - est calibré par rapport à la préparation de référence WHO 77/501.

CONTROLE QUALITE

Une compréhension approfondie de ce manuel est nécessaire à l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

La justesse de chaque calibrateur en cours est vérifiée en le comparant à la préparation de référence WHO 77/501.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage ainsi que des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire.

Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur la feuille de contrôle contenue dans chaque trousse.

Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) date de péremption des réactifs, iii) conditions de stockage et d'incubation, iv) pureté de l'eau.

LIMITATIONS DE PERFORMANCE

- L'utilisation de plasma EDTA est indispensable afin d'inhiber des activités de metalloprotease.
- L'utilisation de tubes coniques est également recommandée. A l'étape 11 de la procédure, un sédiment plus compact sera obtenu et l'aspiration consécutive du surnageant en sera facilitée.
- Les prélèvements non conformes aux recommandations peuvent induire des résultats erronés (cf. prélèvement des échantillons). La congélation immédiate des échantillons plasmatiques ou leur extraction sans délai permet de retrouver avec exactitude la concentration de vasopressine au moment du prélèvement.
- Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant d'études épidémiologiques, de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.
- Vasopressine est extrêmement instable. Enfin il faut transporter les échantillons congelés à -20 °C.

CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques de performances de l'essai ont été validées sur des échantillons testés en double.

Précision Intra-essai (Within-Run) : 6.0%. Elle a été calculée à partir des résultats de 10 paires de valeurs au cours d'un même essai. Les résultats obtenus se trouvent en Table 12.

Précision Inter-essai (Run-to-Run) : 9.9%. Elle a été calculée à partir des résultats de 10 paires de valeurs au cours de 10 essais consécutifs. Les résultats obtenus se trouvent en Table 13.

Limite de détection (LoD) : 0.75 pg/ml (0.82 pmol/L) La sensibilité analytique de la vasopressine a été calculée en enlevant 2 déviations standard de la moyenne des cpm de la liaison maximale et en reportant la valeur obtenue sur la courbe standard.

Limite de quantification (LoQ) : 1.3 pg/ml (1.2 pmol/L), avec un cut-off intra-essai de CV = 10%.

Test de récupération : des concentrations croissantes d'arginine-vasopressine synthétiques furent ajoutées à un échantillon de plasma avant analyse d'après le protocole standard. Les résultats sont présentés en Table 14.

Spécificité : Les réactions croisées suivantes de l'antisérum de vasopressine furent définies à 50% de liaison :

Arginine vasopressine 100.0 %

Lysine vasopressine* 0.25 %

Desmopressine (DDAVP) 0.0085 %

Ocytocine 0.001 %

Vasotocine 0.001 %

* Chez les procs et les hippopotames l'arginine en position 8 est remplacée par la lysine

Comparaison de méthodes : La méthode Vasopressine Directe RIA a été comparée à la méthode Bühlmann VASOPRESSIN RIA (RK-AR1 avec extraction). Les résultats obtenus avec 28 échantillons de donneurs sains (plasma EDTA) mettent à jour une excellente corrélation (cf. Figure 2). La validité clinique de la trousse VASOPRESSIN-RIA (RK-VPD) a été démontrée dans de nombreuses études cliniques et travaux de recherche (5-7).

DOMAINES DE REFERENCE

Lors d'une évaluation récentes de 68 échantillons de plasma EDTA de donneurs apparemment sains, nous avons établi le domaine de référence suivante (moyenne + 2 SD) **≤6.7 pg/ml** avec des résultats allant de < à la limite de détection à 7.6 pg/ml.

Il est important de souligner que les conditions de prélèvement des échantillons de donneurs sains n'étant pas connues (jeûne et position) les valeurs pourraient être légèrement élevées.

Pour cette raison, les valeurs basales d'échantillons prélevées dans des conditions conformes au protocole sont susceptibles d'être plus basses, voire en dessous de la limite de détection. De nombreuses procédures mesurent la dynamique d'une stimulation ou d'une suppression de la sécrétion de vasopressine.

ITALIANO

USO

Questo radioimmunosaggio basato su un doppio anticorpo è designato per la determinazione quantitativa diretta *in vitro* della **vasopressina arginina** (ormone anti-diuretico, ADH) nel plasma EDTA (1-3).

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

La vasopressina immunoreattiva viene misurata con un radioimmunosaggio a doppio anticorpo secondo un metodo modificato di Glick e Kagan (4). I campioni ed i calibratori sono inizialmente pre-incubati per 24 ore con un anticorpo anti-vasopressina. La vasopressina marcata con ¹²⁵I compete quindi con la vasopressina presente nei campioni e nei calibratori per lo stesso anticorpo legante i siti. Dopo una seconda incubazione di 24 ore, il secondo anticorpo in fase solida viene aggiunto alla miscela, la frazione legata all'anticorpo viene quindi precipitata e contata.

REAGENTI FORNITI E PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
Tampone fosfato Tampone liofilo	1 flacone	B-VPD-PB	Ricostituire con 50 ml di acqua deionizzata
Tampone di diluizione dell'anticorpo	1 flacone 6 ml	B-VPD-DB	Pronto all'uso
Antisiero Anticorpo liofilo anti-vasopressina	1 flacone	B-ADH-AS	Ricostituire con 5 ml di Tampone di Diluizione dell'Anticorpo
Tracciante Vasopressina liofila marcata con I ¹²⁵	1 flacone	B-VPD-TR	Ricostituire con 11 ml di Tampone Fosfato
Calibratore¹⁾ Arginina vasopressina liofila, sintetica in un Tampone Fosfato	1 flacone	B-VPD-CA	Ricostituire con 5 ml di acqua deionizzata
Controlli normale / elevato²⁾ Arginina vasopressina in una matrice tampone	2 flaconi	B-VPD-CONSET	Ricostituire con 5 ml di acqua deionizzata
Secondo anticorpo Un anticorpo anti-coniglio coattato con cellulosa	1 flacone 11 ml	B-AB2	Pronto all'uso

Tabella 7

¹⁾ La ricostituzione del calibratore produce una soluzione stock di 80 pg/ml di arginina vasopressina.

²⁾ Quantitativi lotto specifici di arginina vasopressina, [Arg 8]-vasopressina, in una matrice tampone. Fare riferimento ad ulteriori dati di QC per le concentrazioni esatte.

CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non utilizzati	
I componenti sono stabili a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza del kit stampata sull'etichetta. Non congelare il secondo anticorpo.	
Reagenti aperti/ ricostituiti	
Tampone fosfato	Stabile per 2 mesi a 2-8°C
Tampone di diluizione dell'anticorpo	Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza
Antisiero	Stabile per 2 mesi a -20°C
Tracciante	Conservare a -20°C Aliquotare per utilizzi futuri
Calibratore	per 2 mesi a -20°C
Controlli	Aliquotare per utilizzi futuri
Secondo anticorpo	Conservare a 2-8°C (non congelare)

Tabella 8

PRECAUZIONI

PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- **Materiale Radioattivo:** Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera i 56 kBq di Iodio125.
- Il ricevimento, acquisizione, possesso, utilizzo e trasferimento sono soggetti alle regolamentazioni locali. In merito alle precauzioni per la manipolazione e l'eliminazione dei reagenti, del materiale radioattivo e dei campioni, consigliamo vivamente di consultare le regolamentazioni specifiche del vostro paese.
- **Reagenti Contenenti Materiale di Origine Umana:** Tutti i reagenti oltre al secondo anticorpo (B-AB2) contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio utilizzando le dovute precauzioni.

PRECAUZIONI TECNICHE

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Ricostituire i reagenti liofilizzati secondo le indicazioni. Miscelare bene (agitare in modo vorticoso) i reagenti prima dell'uso.
- Se l'iniziale concentrazione di un campione non noto è superiore al calibratore più elevato, il campione deve essere ulteriormente diluito con tampone fosfato e dosato secondo quanto previsto dal dosaggio.
- Il tempo per la conta deve essere sufficiente ad evitare errori statistici e.g. l'accumulo di 2000 cpm produrrà un errore del 5%, 10000 cpm produrranno un errore dell'1%.

MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso per 50 µl, 100 µl, 250 µl, 400 µl e 1000 µl.
- Pipette volumetriche da 5.0 ml e 10 ml.
- Beuta e cilindro necessari per la ricostituzione del tampone fosfato.
- Provette di polistirene monouso per la preparazione delle diluizioni del calibratore.
- Provette di polistirene coniche monouso per l'esecuzione del dosaggio (i.g.. Sarstedt # 57.477).
- Acqua distillata o deionizzata.
- Vortex mixer.
- Barra magnetica ed agitatore magnetico
- Centrifuga.
- Dispositivo per aspirazione.
- Gamma counter.

PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

E' essenziale effettuare il prelievo in maniera idonea per assicurare risultati accurati di vasopressina. La procedura richiede livelli basali reali, il paziente deve essere a digiuno per almeno 12 ore e deve essere tranquillo, senza stress ed in un ambiente sereno, per almeno 1 ora prima del prelievo. Prelevare almeno 2 ml di sangue nella **provetta con EDTA** (vedi di seguito) e collocare immediatamente il campione nel ghiaccio. Centrifugare a 2-8°C a 2000 g per 15 minuti entro 10 minuti dopo il prelievo, separare il plasma dalle cellule e congelare il campione immediatamente in una provetta di

plastica a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ se non utilizzato immediatamente. La procedura richiede 400 µl di plasma per ogni provetta.

DOSAGGIO

Diluizione del calibratore: Per ottenere una curva standard intera, si preparano come segue diluizioni seriali del calibratore:

- Etichettare sette provette dalla A alla G e dispensare 1.0 ml di tampone fosfato nelle provette dalla B alla G.
- Dispensare 1.0 ml della soluzione stock ricostituita dei calibratori (80 pg/ml) nelle provette A e B, vortexare.
- Trasferire 1.0 ml dalla provetta B a quella C, vortexare.
- Continuare a trasferire 1.0 ml di ciascuna provette finché non viene completata la serie di diluizioni.

Le concentrazioni corrispondenti di arginina vasopressina saranno:

A	80 pg/ml (73.6 pmol/l)	E	5.0 pg/ml (4.6 pmol/l)
B	40 pg/ml (36.8 pmol/l)	F	2.5 pg/ml (2.3 pmol/l)
C	20 pg/ml (18.4 pmol/l)	G	1.25 pg/ml (1.1 pmol/l)
D	10 pg/ml (9.2 pmol/l)		

Consentire a tutti i reagenti ai punti 1-4 di raggiungere temperatura ambiente (18-28°C) prima dell'utilizzo.

1. Etichettare 10 provette di polistirene in duplicato: dalla A alla G (calibratore), NSB (bianco), MB (legame massimo) e T (attività totale). Etichettare altre provette di polistirene in duplicato per i campioni dei pazienti ed i controlli.
- 2a. Dispensare 700 µl di tampone fosfato nelle provette NSB e 650 µl nelle provette MB.
- 2b. Aggiungere 250 µl di tampone fosfato a tutte le provette rimanenti, eccetto le provette T.
- 3a. Dispensare 400 µl di ciascun calibratore (dalla A alla G) nelle provette corrispondenti.
- 3b. Dispensare 400 µl dei campioni e dei controlli nelle provette corrispondenti.
4. Aggiungere 50 µl dell'antisiero vasopressina ricostituito a tutte le provette eccetto quelle NSB e T. vortexare.
5. Incubare tutte le provette per 24 ore $\pm$ 3 ore a 18-28°C.
6. Aggiungere 100 µl del tracciante vasopressina ricostituito a tutte le provette. Vortexare. Rimuovere le provette T per le conte al punto 12, non è necessaria un'ulteriore processazione.
7. Incubare per 24 ore $\pm$ 3 ore a 18-28°C.
- 8a. Capovolgere il flacone del secondo anticorpo in fase solida diverse volte, aggiungere una barra agitatrice e collocare il flacone su un agitatore magnetico.
- 8b. Agitare la sospensione contenente il secondo anticorpo continuamente, aggiungere, 100 µl della sospensione a tutte le provette (eccetto le provette T). Vortexare.
9. Incubare per 20 minuti $\pm$ 1 minuto a 18-28°C. **Non risospendere il precipitato.**
10. Aggiungere 1 ml di acqua deionizzata ad ogni provetta (eccetto le provette T).
11. Centrifugare per 5 minuti a 1000 x g. Aspirare il supernatante (**eccetto le provette T**) e conservare il precipitato per la conta.
12. Contare tutte le provette per 1 minuto in un gamma counter.

CALCOLAZIONE DEI RISULTATI & STANDARDIZZAZIONE

- Registrare i cpm di tutte le provette (T, NSB, MB, calibratori A-G campioni e controlli) e calcolare i cpm medi per ciascuna coppia di provette.
- Sottrarre i bianchi medi (provette NSB) dalle rispettive medie di ciascuna coppia di provette:

$$\text{Cpm netti} = \text{cpm}_{\text{Media}} - \text{cpm}_{\text{Media NSB}}$$

Calcolare il legame di ciascuna coppia di provette come percentuale del legame massimo (provette MB), con i cpm corretti con NSB delle provette MB prese al 100%.

$$B/B_0(\%) = \text{percentbound} = \frac{\text{netcpm}}{\text{netMBcpm}} \times 100$$

Preparare un grafico lin/log e tracciare la percentuale di legato sull'asse verticale verso la concentrazione di vasopressina (pg/ml) sull'asse orizzontale per ciascuno dei Calibratori. Tracciare la migliore curva e calcolare la curva standard utilizzando un algoritmo spline smoothed.

Determinare le concentrazioni di Vasopressina per i campioni ed i controlli dalla curva standard. Sono accettabili anche metodi alternativi per il calcolo dei dati. Per ottenere le concentrazioni in pmol/L, moltiplicare i valori in pg/ml per 0.92. Vedi Table 11 and Figure 1 per esempi dei risultati e della curva standard. Questi risultati e le curve standard sono solo a scopo dimostrativo. Occorre generare una curva standard per ciascun set di campioni da dosare

Standardizzazione: Il calibratore BÜHLMANN arginina vasopressina, [Arg 8]-vasopressina, è pesato in materiale calibrato verso la preparazione di riferimento del WHO n° 77/501.

CONTROLLO DI QUALITÀ

Occorre attenersi scrupolosamente a quanto descritto in questa metodica per poter utilizzare al meglio il prodotto. Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni per l'utilizzo.

L'accuratezza di ciascun calibratore è controllata comparandola con la preparazione di riferimento del WHO 77/501.

La riproducibilità dei parametri della curva standard ed i valori dei controlli devono essere entro limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. I limiti di confidenza per i controlli sono lotto specifici e stampati sul foglio di QC aggiunto al kit.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude gli errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, dispositivi per il controllo della temperatura e del tempo ii) date di scadenza dei reagenti iii) conservazione e condizioni di incubazione iv) purezza dell'acqua.

LIMITI DELLE PRESTAZIONI

- E' obbligatorio usare SOLO plasma EDTA per inibire l'attività della metallo proteasi. Il plasma eparinizzato non può essere utilizzato nel dosaggio della Vasopressina diretta e interferirà con l'anticorpo legante.
- Usare provette coniche di polistirene. Durante il punto 11 della procedura, si ottiene un precipitato più solido e la successiva aspirazione del supernatante viene effettuata in maniera più agevole.
- I campioni che non vengono prelevati e trattati in maniera idonea possono produrre risultati inaccurati di arginina vasopressina (vedi prelievo dei campioni). Il congelamento dei campioni di plasma preserverà l'integrità della concentrazione di vasopressina al momento del prelievo.
- I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dagli studi epidemiologici, dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.
- Vasopressina e estremamente instabile. Quindi è essenziale di trasportare i campioni congelati a -20 °C.

CHARACTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le caratteristiche di prestazione del dosaggio sono state convalidate in duplicato

Precisione intra-dosaggio (all'interno della seduta): 6.0%.

La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 10 coppie di valori di ciascun campione in un'unica seduta. I valori sono presentati in Table 12.

Precisione inter-dosaggio (da una seduta all'altra): 9.9%.

La precisione inter-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori di due campioni in 20 sedute diverse. I valori sono presentati in Table 13.

Limite del Bianco (LoB): 0.75 pg/ml (0.82 pmol/l). La sensibilità analitica del dosaggio Vasopressin direct RIA è stata calcolata sottraendo le due deviazioni standard dei duplicati medi del Calibratore Zero (MB) dalle conte del legame massimo.

Limite di Quantification (LoQ): 1.3 pg/ml (1.2 pmol/l). La dose funzionale minima rilevabile (FLDD) del dosaggio è stata calcolata con un cut-off dei CV intra dosaggio = 10%.

Recupero: 101.8%. Un campione di plasma è stato diluito con quantitativi crescenti di arginina-vasopressina sintetica e dosati secondo quanto previsto dal dosaggio. I valori sono presentati in Table 14.

Specificità: Le seguenti crossreazioni dell'antisiero vasopressina sono state determinate al 50% del legame:

Arginina vasopressina	100.0 %
Lisina vasopressina*	0.25 %
Desmopressina (DDAVP)	0.0085 %
Ossitocina	0.001 %
Vasotocina	0.001 %

* Nei maiali e nell'Ippopotamo l'arginina in posizione otto è sostituita dalla lisina.

Comparazione di metodi: Il dosaggio VASOPRESSIN-DIRECT RIA è stato comparato con il dosaggio Bühlmann VASOPRESSIN RIA (RK-AR1; estrazione con colonna). I risultati ottenuti con 28 donatori di sangue (plasma EDTA) presentano un'eccellente correlazione (vedi Figure 2).

La validità clinica del dosaggio BÜHLMANN VASOPRESSIN-RIA (RK-VPD) è stata dimostrata in molte pubblicazioni cliniche ed a scopo di ricerca (5-7).

INTERVALLO DI RIFERENZA

In una recente valutazione con 68 donatori, abbiamo stabilito un range atteso (media+ 2 SD) di **≤6.7 pg/ml** con valori tra non rilevabile e 7.6 pg/ml.

I valori per i donatori di sangue possono essere leggermente elevati a causa di digiuno non noto e di una posizione non nota prima della donazione. Non è stata determinata l'osmolalità. La maggior parte delle procedure necessitano di test dinamici attraverso stimolazione o soppressione del rilascio di vasopressina.

USO PREVISTO

Este radioinmunoanálisis de doble anticuerpo ha sido diseñado para la medición directa diagnóstica cuantitativa *in vitro* de **vasopresina arginina** (hormona antidiurética, ADH) en plasma con EDTA (1-3).

PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO

La vasopresina inmunoreactiva se mide con un radioinmunoanálisis de doble anticuerpo de acuerdo con un método modificado de Glick y Kagan (4). Las muestras y los calibradores se preincubaban en primer lugar durante 24 horas con el anticuerpo anti-vasopresina. La ¹²⁵I-vasopresina compete entonces con la vasopresina presente en las muestras y en los calibradores por los mismos sitios de unión del anticuerpo. Después de una segunda incubación de 24 horas se añade el segundo anticuerpo de fase sólida a la mezcla, la fracción unida al anticuerpo finalmente precipita y se cuenta.

REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
Tampón fosfato Tampón liofilizado	1 vial	B-VPD-PB	Reconstituir con 50 ml de agua desionizada
Tampón de dilución del anticuerpo	1 vial 6 ml	B-VPD-DB	Listo para usar
Antisuero Anticuerpo anti-vasopresina liofilizado	1 vial	B-VPD-AS	Reconstituir con 5 ml de tampón de dilución del anticuerpo
Trazador ¹²⁵ I-Vasopresina liofilizada	1 vial	B-VPD-TR	Reconstituir con 11 ml de tampón fosfato
Calibrador¹⁾ Vasopresina arginina sintética liofilizada en tampón fosfato	1 vial	B-ADH-CA	Reconstituir con 5 ml de agua desionizada
Controles Normal / Alto²⁾ Vasopresina arginina en una matriz de tampón	2 viales	B-VPD-CONSET	Reconstituir con 5 ml de agua desionizada
Segundo anticuerpo Anticuerpo anti-conejo recubierto con celulosa	1 vial 11 ml	B-AB2	Listo para usar

Tabla 9

¹⁾ La reconstitución del calibrador da como resultado una solución de stock de 80 pg/ml de vasopresina arginina, [Arg 8]-vasopresina.

²⁾ Cantidades de vasopresina arginina en la matriz de tampón específicas del lote. Consulte la hoja de datos de control de calidad adicional para las concentraciones exactas.

ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivos sin abrir	
Todos los componentes del kit son estables a 2-8°C. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad indicada en las etiquetas. No congele el segundo anticuerpo.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Tampón fosfato	Estables durante 2 meses a 2-8°C
Tampón de dilución del anticuerpo	Almacénese a 2-8°C hasta la fecha de caducidad.
Antisuero	Estable durante 2 meses a -20°C.
Trazador	Almacénese a -20°C Hacer partes alícuotas si se espera un uso repetido
Calibrador	Estable durante 2 meses a -20°C.
Controles	Hacer partes alícuotas si se espera un uso repetido
Segundo anticuerpo	Almacénese a 2-8°C (no lo congele)

Table 10

PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- **Material radiactivo:** Este kit contiene material radiactivo que no supera 56 kBq de yodo 125.
- La recepción, adquisición, posesión, el uso y la cesión están sujetos a las normativas locales. Respecto a las precauciones adecuadas para la manipulación y eliminación de los reactivos del kit, material radiactivo, desechos radiactivos y especímenes de los pacientes, recomendamos encarecidamente que consulte primero las normativas locales especiales de su país.
- **Reactivos que contienen material de origen humano:** Todos los reactivos del kit excepto el segundo anticuerpo (B-AB2) contienen componentes de origen humano. Todos los sueros utilizados en la preparación de los componentes del kit han sido analizados por un método aprobado por la FDA, dando resultados negativos para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, y para los anticuerpos del virus de la hepatitis C y VIH1/2 (virus de inmunodeficiencia humana 1/2). Aunque estos métodos son extremadamente exactos, no se garantiza que este material no pueda transmitir hepatitis o SIDA. Por consiguiente, todas las muestras de pacientes y todos los componentes del kit deben ser manipulados como si fueran susceptibles de transmitir infecciones. Todos los reactivos y muestras de los pacientes que contengan material de origen humano deben ser manipulados de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio tomando las precauciones adecuadas.

PRECAUCIONES TÉCNICAS

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Deje atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Reconstituya los reactivos liofilizados tal como está indicado. Mezcle bien (con agitador de vórtice) los reactivos antes de su uso.
- Si la lectura de la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que la del calibrador más alto, la muestra extraída debe diluirse con tampón fosfato y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo.
- El tiempo de recuento debe ser suficiente para evitar un error estadístico del recuento: p.ej., la acumulación de 2000 cpm producirá un error del recuento del 5%, 10000 cpm producirán un error de recuento del 1%.

MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS

- Pipetas de precisión de 50 µl, 100 µl, 250 µl, 400 µl y 1000 µl con puntas desechables.
- Pipetas volumétricas de 5,0 ml y 10 ml.
- Vaso y cilindro necesarios para la reconstitución del tampón fosfato.
- Tubos de poliestireno desechables para la preparación de las disoluciones del calibrador.
- Tubos cónicos de poliestireno desechables para realizar el ensayo (p.ej. Sarstedt # 57.477).
- Agua destilada o desionizada.
- Mezclador vortex.
- Barra de agitación y agitador magnético.
- Centrífuga.
- Dispositivo de aspiración.

- Contador gamma.

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

La recogida adecuada de las muestras es esencial para asegurar la exactitud de los resultados del análisis de vasopresina. El procedimiento requiere niveles basales verdaderos, el paciente debe ayunar durante 12 horas como mínimo y debe permanecer recostado, sin ningún estrés y en un entorno tranquilo, como mínimo 1 hora antes de la recogida de sangre.

Recoja sangre (como mínimo 2 ml) en un **tubo de venipunción con EDTA** (véase más abajo) y coloque inmediatamente la muestra en hielo. Centrifugue a 2-8°C a 2000 g durante 15 minutos antes de 10 minutos después de la recogida de sangre, separe el plasma de las células y congele el espécimen inmediatamente en un tubo de plástico a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ si no se va a utilizar inmediatamente. El procedimiento requiere 400 μl de plasma por tubo de ensayo.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Dilución del calibrador: Para obtener una curva estándar completa se preparan diluciones en serie del calibrador del modo siguiente:

- Etiquete siete tubos A hasta G y pipetee 1,0 ml de tampón fosfato en los tubos B hasta G.
- Pipetee 1,0 ml de la solución stock de calibrador reconstituido (80 pg/ml) en los tubos A y B, agite con el vórtex.
- Transfiera 1,0 ml del tubo B al tubo C, agite con el vórtex.
- Continúe con la transferencia de 1,0 ml de cada tubo hasta que se complete la serie de diluciones.

Las concentraciones correspondientes de vasopresina arginina serán:

A 80 pg/ml (73,6 pmol/l)	E 5,0 pg/ml (4,6 pmol/l)
B 40 pg/ml (36,8 pmol/l)	F 2,5 pg/ml (2,3 pmol/l)
C20 pg/ml (18,4 pmol/l)	G 1,25 pg/ml (1,1 pmol/l)
D10 pg/ml (9,2 pmol/l)	

Deje que todos los reactivos de los pasos 1-4 alcancen la temperatura ambiente (18-28°C) antes de su uso.

1. Etiquete 10 tubos de poliestireno por duplicado: A a G (Calibrador), NSB (blanco), MB (máxima unión) y T (actividad total). Etiquete tubos de poliestireno adicionales por duplicado para las muestras de los pacientes y los controles.
- 2a. Pipetee 700 μl de tampón fosfato en los tubos NSB y 650 μl en los tubos MB.
- 2b. Añada 250 μl de tampón fosfato a todos los tubos restantes, excepto los tubos T.
- 3a. Pipetee 400 μl de cada calibrador (de A a G) en los tubos correspondientes.
- 3b. Pipetee 400 μl de las muestras de los pacientes y de los controles en los tubos correspondientes.
4. Añada 50 μl del antisuero de vasopresina reconstituido a todos los tubos excepto a los tubos NSB y T. Agite con el vórtex.
5. Incube todos los tubos durante 24 horas $\pm$ 3 horas a 18-28°C.
6. Añada 100 μl del trazador de vasopresina reconstituido a todos los tubos. Agite con el vórtex. Retire los tubos T para el recuento del paso 12, ya que no requerirán mayor procesamiento.
7. Incube durante 24 horas $\pm$ 3 horas a 18-28°C.
- 8a. Invierta la botella del segundo anticuerpo de fase sólida varias veces, añada una barra de agitación y coloque la botella en un agitador magnético.

8b. Mientras se agita de manera continuada la suspensión del segundo anticuerpo añada 100 μl de la suspensión a todos los tubos de ensayo (excepto a los tubos T). Agite con el vórtex.

9. Incube durante 20 minutos $\pm$ 1 minuto a 18-28°C. **No vuelva a suspender el precipitado.**
10. Añada 1 ml de agua desionizada a todos los tubos (excepto a los tubos T).
11. Centrifugue durante 5 minutos 1000 x g. Aspire el sobrenadante (**excepto en los tubos T**) y conserve los precipitados para el recuento.
12. Cuente todos los tubos durante 1 minuto en un contador gamma.

RESULTADOS Y ESTANDARIZACIÓN

- Registre las cpm para todos los tubos (T, NSB, MB, calibradores A-G, muestras y controles) y calcule el promedio de cpm para cada par de tubos.
- Reste el promedio del blanco del ensayo (tubos NSB) del promedio respectivo de cada par de tubos:

$$\text{cpm netas} = \text{cpm}_{\text{Promedio}} - \text{cpm}_{\text{Promedio de NSB}}$$

- Calcule la unión de cada par de tubos como un porcentaje de la máxima unión (tubos MB), considerando las cpm de los tubos MB corregidas por el NSB como el 100%.

$$\text{B/B}_0(\%) = \text{percentbound} = \frac{\text{netcpm}}{\text{netMBcpm}} \times 100$$

- Prepare un papel gráfico semilogarítmico y represente el porcentaje unido en el eje vertical frente a la concentración de vasopresina (pg/ml) en el eje horizontal para cada uno de los calibradores. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de ajuste alisado "spline".
- Determine las concentraciones de vasopresina para las muestras de los pacientes y los controles a partir de esta curva estándar. Son aceptables igualmente métodos alternativos de reducción de datos.

Para dar las concentraciones de los resultados en pmol/L, multiplique los valores en pg/ml por un factor de 0,92.

Véase Table 11 y Figure 1 para ejemplos de resultados y curvas estándar. *Estos resultados y curvas estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.*

Estandarización: El Calibrador BÜHLMANN de vasopresina arginina, [Arg 8]-vasopresina, está calibrado contra la preparación de referencia de la OMS 77/501.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para que la utilización del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente estas instrucciones de uso.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional del kit.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) fechas de

caducidad de los reactivos iii) condiciones de almacenamiento e incubación iv) pureza del agua.

LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

- Es fundamental utilizar únicamente plasma con EDTA para inhibir las actividades de las metaloproteasas.
- Se recomienda encarecidamente el uso de tubos cónicos de poliestireno. Se conseguirá un pellet más sólido durante el paso 11 del procedimiento del ensayo y la posterior aspiración del sobrenadante puede ser mucho más fácil.
- Las muestras de los pacientes que no se recojan y manipulen adecuadamente pueden causar resultados inexactos de vasopresina arginina (véase Recogida de muestras). La congelación inmediata de las muestras de plasma o su extracción sin demora preservará la integridad de la concentración de vasopresina en el momento del muestreo.
- Los resultados del ensayo deben interpretarse considerando la información disponible de estudios epidemiológicos, la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- Vasopresina es extramamente inestable. Entonces las muestras deben ser transportado congeladas a - 20 °C.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Las características de rendimiento del análisis han sido validadas por duplicado.

Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 6.0%. La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 10 pares de valores obtenidos de cada muestra en una única prueba. Los valores se presentan en Table 12.

Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 9.9%. La precisión inter-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores obtenidos en 20 pruebas diferentes. Los valores se presentan en Table 13.

Límite para el blanco (LoB): 0.75 pg/ml (0.82 pmol/L). La sensibilidad analítica del RIA Directo de Vasopresina se calculó al restar 2 desviaciones estándar de los duplicados promediados del calibrador cero de los recuentos en la máxima unión.

Límite de cuantificación (LoQ): 1,3 pg/ml (1,2 pmol/L). La dosis mínima detectable funcional (DMDF) del ensayo se calculó con un valor de corte del intra-ensayo CV = 10%.

Recuperación del spiking: 101.8%. La muestra de plasma se enriqueció con cantidades crecientes de vasopresina-arginina sintética y se analizó según el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en Table 14.

Especificidad: Las siguientes reacciones cruzadas del antisuero de vasopresina se determinaron en el 50% de unión:

Vasopresina arginina	100.0	%
Vasopresina lisina*	0.25	%
Desmopresina (DDAVP)	0.0085	%
Oxitocina	0.001	%
Vasotocina	0.001	%

* En cerdos e hipopótamos la arginina en la posición ocho se reemplaza por lisina

Comparación del método: El Vasopressin direct RIA se ha comparado con el Vasopressin RIA de Bühlmann (RK-AR1; extracción de columna). Los resultados obtenidos con 28 donantes de sangre (plasma con EDTA) muestran una correlación excelente (véase Figure 2).

La validez clínica del Vasopressin RIA de Bühlmann (RK-VPD) se ha demostrado en muchas publicaciones clínicas y de investigación (5-7).

INTERVALOS DE REFERENCIA

En una evaluación con 68 donantes de sangre hemos establecido un intervalo de referencia (media+ 2 DE) de **≤ 6,7 pg/ml** con valores entre indetectable y 7,6 pg/ml.

Los valores de los donantes de sangre pueden ser ligeramente elevados a causa de las condiciones desconocidas de ayuno y de posición previas a la donación. La osmolalidad no se ha determinado. Por lo tanto, los valores basales recogidos correctamente deben estar en el intervalo bajo o incluso indetectable.

Muchos procedimientos necesitan pruebas dinámicas con estimulación o supresión de la liberación de vasopresina.

Table 11: **Example of Results**
Incubation temperature at BÜHLMANN: 20°C.
Data reduction: Multicalc Software (PerkinElmer), spline smoothed option.

	cpm	B/T [%]	B/B ₀ [%]	Conc [pg/ml]	CV [%]
Total	31445	100.0			
Total	31261	100.0			
Total Avg.	31353	100.0			0.4
NSB	768	2.45			
NSB	701	2.25			
NSB Avg.	736	2.35			6.1
MB	9863	31.46	100		
MB	9921	31.65	100		
MB	10428	33.26	100		
MB	10083	32.16	100		
MB Avg.	10074	32.13	100		2.5
Calibrator G	9442	30.12	93.2	1.25	
Calibrator G	9444	30.12	93.3	1.25	
Calibrator G Avg.	9443	30.12	93.2	1.25	0.0
Calibrator F	9187	29.3	90.5	2.5	
Calibrator F	9215	29.39	90.8	2.5	
Calibrator F Avg.	9201	29.35	90.7	2.5	0.2
Calibrator E	8474	27.03	82.9	5.0	
Calibrator E	8440	26.92	82.5	5.0	
Calibrator E Avg.	8457	26.97	82.7	5.0	0.3
Calibrator D	6789	21.65	64.8	10.0	
Calibrator D	6819	21.75	65.1	10.0	
Calibrator D Avg.	6804	21.70	65.0	10.0	0.3
Calibrator C	5621	17.93	52.3	20.0	
Calibrator C	5681	18.12	53.0	20.0	
Calibrator C Avg.	5651	18.02	52.6	20.0	0.8
Calibrator B	4173	13.31	36.8	40.0	
Calibrator B	4319	13.78	38.4	40.0	
Calibrator B Avg.	4246	13.54	37.6	40.0	2.4
Calibrator A	2877	9.18	22.9	80.0	
Calibrator A	2909	9.28	23.3	80.0	
Calibrator A Avg.	2893	9.23	23.1	80.0	0.8
Control NORMAL	9036		88.9	2.94	
Control NORMAL	9009		88.6	3.02	
Control NORM. Avg	9023		88.7	2.98	2.0
Control High	6743		64.3	11.5	
Control High	6817		65.1	11.1	
Control High Avg.	6780		64.7	11.3	2.6

ED-20 = 92.7 pg/ml ED-50 = 22.4 pg/ml ED-80 = 5.42 pg/ml

Figure 1: **Example of a standard curve**

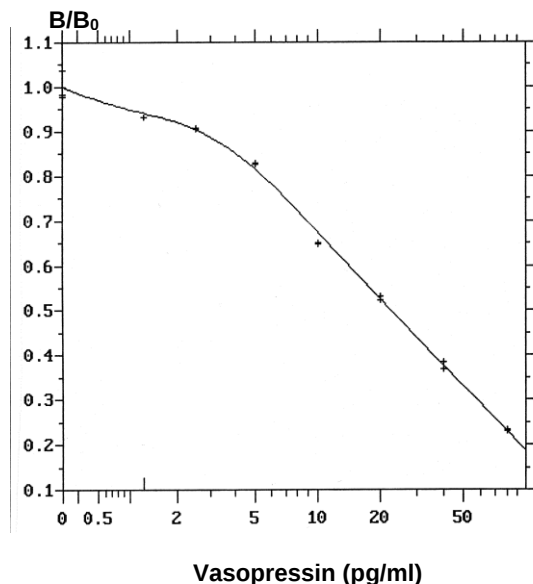


Table 12: **Intra-Assay Precision (Within-Run)**

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
Plasma 1	4.0	0.39	9.5
Plasma 2	6.7	0.42	6.2
Plasma 3	19.1	0.44	2.3
Mean			6.0

Table 13: **Inter-Assay Precision (Run-to-Run)**

Sample	Mean [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
Plasma 4	1.78	0.23	13.0
Plasma 5	12.27	0.83	6.8
Mean			9.9

Table 14: **Spiking Recovery**

Sample	basic value [pg/ml]	spiked with [pg/ml]	Calculated [pg/ml]	Observed [pg/ml]	Recovery [%]
Plasma 6	2.0	2.6	4.6	5.0	109
	2.0	7.8	9.8	10.1	103
	2.0	23.3	25.3	26.4	104
	2.0	70.0	72.0	65.7	91
Mean					101.8

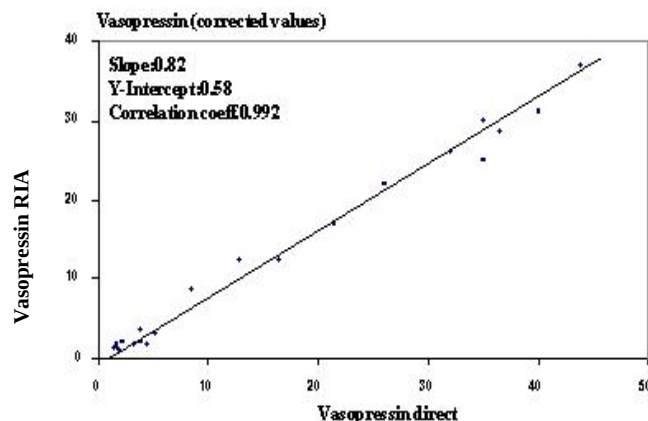


Figure 2: **Method Comparison RK-VPD vs. RK-AR1**

Table description: cf. "Results", "Performance Characteristics" (page 3) and "Reference Intervals" (page 4).

Tabellenbeschreibung: siehe "Berechnung der Ergebnisse & Standardisierung" (Seite 6), "Leistungsmerkmale" und "Referenzbereiche" (Seite 6).

Explications relatives aux tableaux : voir « Résultats », « Caractéristiques de Performance » (page 8) et « Domaines de référence » (page 9).

Descrizione tavola: cf. "Risultati" (pagina 10), "Caratteristiche delle Prestazioni" e "Intervallo di referenzia" (pagina 11).

Explicaciones relativas a las Tablas: ver "Resultados" (página 13), "CARACTERÍSTICAS DE Rendimiento" y "Intervalos de Referencia" (página 14).

1. Zane Burday, S., Streck, W. F.: *Diabetes insipidus and SIADH*. In: Streck, W.F., Lockwood, D.H.: *Endocrine Diagnosis: Clinical and laboratory approach*, 107-124 (1983).
2. Oelkers, W.: *Hyponatremia and inappropriate secretion of vasopressin in patients with hypopituitarism*. N. Engl. J. Med. 321, 492-496 (1989).
3. Kamoi, K. et al.: *Atrial natriuretic peptide in patients with the syndrome of inappropriate anti-diuretic hormone secretion and with diabetes insipidus*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 70, 1385-1390 (1990).
4. Glick, S.M., Kagan, A.: *Radioimmunoassay of arginine vasopressin*. In: Jaffe, B.M., Behrmann, H.R.: *Methods of hormone radioimmunoassays*. Academic Press, New York (1979).
5. Jacobson, S. et al.: *Development of hypertension and uraemia after pyelonephritis in childhood: 27 year follow up*. Br. Med. J. 299, 703-709 (1989).
6. Ferrari, R. et al.: *Sample treatment for long-distance transport of plasma for hormone assay*. Clin. Chem. 35, 331-332 (1989).
7. Serrière V et al.: *Vasopressin receptor distribution in the liver controls calcium wave propagation and bile flow*. FASEB J. 15, 1484-6 (2001)

RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURE

RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURE							
Polystyrene tubes in duplicate	Phosph. Buffer (μl)	Standard, Control, Sample (μl)	Antiserum (μl)		Tracer (μl)		Second Antibody (μl)
Total	--	--	--		100		--
NSB	700	--	--		100		100
MB	650	--	50		100		100
Std A 80 pg/ml	250	400	50		100		100
Std B 40 pg/ml	250	400	50		100		100
Std C 20 pg/ml	250	400	50		100		100
Std D 10 pg/ml	250	400	50		100		100
Std E 5 pg/ml	250	400	50		100		100
Std F 2.5 pg/ml	250	400	50		100		100
Std G 1.25 pg/ml	250	400	50		100		100
Control NORMAL	250	400	50		100		100
Control ELEVATED	250	400	50		100		100
Sample	250	400	50		100		100

APPENDIX IV
SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
REF	Catalogue number Bestellnummer Référence du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
LOT	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
IVD	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Upper limit of temperature Temperaturobergrenze Limite supérieure de température Limite superiore di temperatura Límite superior de temperatura
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Radioactive Material Radioaktives Material Matériel radioactif Materiale radioattivo Material radiactivo

Symbol	Explanation
BUF H3PO4	Phosphate Buffer Phosphat-Puffer Tampon phosphate Tampone fosfato Tampón fosfato
BUF DIL	Antibody Dilution Buffer Antikörper Verdünnungspuffer Tampon de dilution de l'anticorps Tampone di diluizione dell'anticorpo Tampón de dilución para anticuerpo
Ab	Antiserum Antiserum Antisérum Antisiero Antisuero
TR	Tracer Tracer Traceur Tracciante Trazador
CAL	Calibrator Kalibrator Calibrateur Calibratore Calibrador
CONTROL N	Control Normal Normalkontrolle Contrôle normal Controllo normale Control normal
CONTROL H	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
Ab2	2 nd Antibody 2. Antikörper 2 ^{ème} Anticorps Secondo anticorpo Segundo anticuerpo



Reg. Nr. 22176



Printing Date
2013-01-14