



25OH-VIT.D3-RIA-CT

KIP1961

Read entire protocol before use.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the in vitro quantitative measurement of 25OH-Vit.D3 in human serum and heparin plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name :** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. Catalog number :** KIP1961 : 96 tests
- C. Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)67 88.99.99 Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CLINICAL BACKGROUND

A. *Physiological function of 25OH-Vit.D₃*

25-Hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) is the trivial name of 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-triene-3 β , 25-diol. This secosteroid is produced in the liver by 25-hydroxylation of cholecalciferol or Vitamin D₃. 25OHD₃ is a precursor for other Vitamin D metabolites and has only a limited biological activity in itself. The most active derivative is 1 α ,25-Hydroxyvitamin D₃, produced in the kidney (or placenta) by 1 α -hydroxylation of 25OHD₃. This hormonally regulated steroid stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus. It also stimulates bone resorption and mineralisation thereby preventing the development of rickets, osteoporosis or osteomalacia. This Vitamin D hormone might also be active in other tissues responsible for calcium transport (placenta, kidney, mammary gland, ...) and endocrine glands (beta-cells, parathyroid glands, ...). 25-hydroxyvitamin D₃ is a main precursor for the metabolites.

B. *Regulatory mechanism*

The production of 25-hydroxyvitamin D mainly occurs in the liver although other tissues (intestine, kidney) might perform the same hydroxylation. Although there might be some feedback inhibition of 25-hydroxyvitamin D on its own production, a higher substrate availability (Vitamin D₃) results in higher 25-hydroxyvitamin D production and higher circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in blood.

C. *Clinical applications*

This assay is of importance for the diagnosis of Vitamin D deficiency, insufficiency or intoxication.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

At first calibrators, controls and samples (serum or heparin plasma) are extracted with acetonitrile.

A fixed amount of ^{125}I labelled 25OH Vitamin D₃ competes with the 25OH Vitamin D₃ from either extracted samples, controls or calibrators for a fixed amount of specific antibody sites immobilized to the lower and inner surface of plastic tubes.

After 2 hours incubation at room temperature, an aspiration step stops the competition reaction. The tubes are then washed with 2 ml washing solution and counted in a gamma counter.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	Quantity	Colour Code	Reconstitution			
 Tubes coated with anti 25OH-Vitamin.D ₃	2 x 48	pink	Ready for use			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ¹²⁵ I 25OH-Vitamin.D ₃	Ag	¹²⁵ I	1 vial lyophil. 160 kBq	red	Reconstitute extemporaneously by adding 6 ml of the tracer buffer	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrator 0: horse serum / phosphate buffer, with gentamycin	CAL	0	1 vial lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrators 1-5 in horse serum / phosphate buffer, with gentamycin (see exact values on vial labels)	CAL	N	5 vials lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubation Buffer with sodium azide (< 0.1%)	INC	BUF	1 vial 45 ml	black	Ready for use	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Ethanol solution with sodium azide (< 0.1%)	TRACER	BUF	1 vial 7 ml	red	Ready for use	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table> Acetonitrile	ACETONITRILE	1 vial 25 ml	black	Ready for use		
ACETONITRILE						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wash solution	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controls 1 and 2 in human serum with thymol	CONTROL	N	2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N					

Note : Use Calibrator 0 for dilution of samples with values above the highest calibrator before extraction step.
No international reference material is available.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl.
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Glass tubes (12x75 mm) for extraction step
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration and washing device
8. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).
10. Centrifuge operating at 800-1500 g

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators :** Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water.
- B. Controls :** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. ^{125}I 25OH-Vit.D₃ :** Reconstitute with 6 ml of the tracer buffer.
- D. 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.

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.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- The reconstituted tracer has to be frozen after first use. Then, it is stable until the expiry date.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum and heparin plasma samples must be kept at 2-8°C.
- This kit is suitable for serum and heparin plasma samples. A correlation has been established between 23 serum and heparin plasma samples from same patients: Plasma = 0.95 Serum + 1.25, R = 0.89.
- If the test is not run within 48 h., storage at -20°C is recommended
- After thawing serum and heparin plasma samples should be mixed (Vortex), then centrifuged.

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. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.
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

Extraction step :

1. Label glass tubes (12x75 mm) for extraction: 6 calibrators, 2 controls and up to 40 samples in duplicate.
2. Dispense 100 µl of each calibrator, control or sample in the respective tubes.
3. Add 0.5 ml acetonitrile to each tube.
4. Mix for 7 seconds with a vortex.
5. Centrifuge for 5 minutes at room temperature (at 800-1500 g).

Incubation step :

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample, control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Add 100 µl of the supernatant obtained after the extraction step in the corresponding tubes. Pipette tips have to be saturated with corresponding supernatant before the addition in the tube.
3. Dispense 400 µl Incubation Buffer in each tube, except those for total counts.
4. Add 50 µl Tracer in each tube, including total counts.
5. Incubate for 2 hours, under stirring (300-700 RPM), at room temperature.
6. Aspirate the content of each tube (except total counts).
7. Wash tubes twice with 2 ml Wash Solution and aspirate. Avoid foaming during the addition of the wash solution.
8. After the washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

B/B0 x 100 = (Counts (Calibrator or sample) / Counts (Zero Calibrator)) x 100

- 3. Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper plot the (B/B0 x 100) values for each calibrator point as a function of the 25OH.D3 concentration of each calibrator point, reject obvious outliers.
- 4. 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.
- 5. By interpolation of the sample (B/B0 x 100) values, determine the 25OH.D3 concentrations of the samples from the reference curve.
- 6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 25OH.D3 (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.

25OH-Vit.D3		cpm	B/Bo x 100
Total count		40301	-
Calibrator	0 ng/ml	23803	100 %
	3.0 ng/ml	20171	85 %
	9.0 ng/ml	16237	68 %
	20.0 ng/ml	12156	51 %
	65.0 ng/ml	7090	30 %
	130.0 ng/ml	5330	22 %

Note : 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

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 25OH-Vitamin.D3 concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 1.2 ng/ml.

B. Specificity

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

Compound	Cross-Reactivity (%)
25OH-Vitamin D3	100
25OH-Vitamin D2	<0.3
1,25(OH)2-Vitamin.D3	89*
1,25(OH)2-Vitamin.D2	<0.01
Vitamin D3	<0.03
Vitamin D2	<0.03
24,25(OH)2-Vitamin.D3	<0.8

* As 1,25(OH)2-Vit.D3 concentrations are practically 1000 times lower than 25-OH-Vit.D3, this cross-reactivity is insignificant and does not interfere in this 25-OH-Vit.D3 assay.

The assay performance is not affected by hemolysis (5 g/L haemoglobin tested) or bilirubinemia (0.25 g/L bilirubin tested).

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19.1 ± 1.4	7.3	A	9	6.7 ± 0.5	7.2
B	43	10.4 ± 0.9	8.8	B	9	13.1 ± 1.0	7.3

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST	
Added 25OH-Vit.D3 (ng/ml)	Recovery (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

DILUTION TEST			
Sample dilution	Theoretical concent. (ng/ml)	Measured concent. (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	42.5	42.5	100
1/2	21.3	20.9	98.4
1/4	10.6	11.2	105.3
1/8	5.3	5.7	107.0
1/16	2.7	2.6	98.8
1/32	1.3	1.3	98.0

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 15 and 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
Sample 1	9.5	9.2	10.1
Sample 2	36.8	33.9	36.2

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. Do not freeze-thaw more than twice.
- Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XV. EXPECTED VALUES

Dietary intake, race, season and age are known to affect the normal levels of 25OH.Vit.D3.

The expected values given hereafter should not be considered as absolute. DIAsource evaluated serum collected from 39 male and 40 female, healthy according to Ca, PTH and albumin values, from Western Europe. The age of the volunteers fell within the range of 17 - 58 years. Samples were collected during the months of December 2010 and January 2011. The mean for the population (n = 79) was 12.5 ng/mL, ranging from 4.1 to 28.7 ng/ml (based on 2.5 % to 97.5 % percentiles).

Each laboratory should establish its own range based on their local population.

Recent literature has suggested the following ranges for the classification of 25 OH Vitamin D status: Deficiency: 0-10 ng/mL; Insufficiency: 10-30 ng/mL; Sufficiency: 30 to 150 ng/mL; Toxicity: >150 ng/mL.

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.

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 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. All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A log book 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 radiosafety 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.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) CONTROLS ml
<u>EXTRACTION</u>			
Calibrators	-	0.1	-
Samples/Controls	-	-	0.1
Acetonitrile	-	0.5	0.5
Vortex Centrifugation	Vortex for 7 seconds 5 minutes at 800-1500 g		
<u>INCUBATION</u>			
Supernatant of extraction	-	0.1	0.1
Incubation Buffer	-	0.4	0.4
Tracer	0.05	0.05	0.05
Incubation	2 hours at room temperature under stirring (300-700 RPM)		
Separation	-	aspirate	
Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate	
Wash solution		2.0	
Separation		aspirate carefully	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1961	P.I. Number : 1700543/en	Revision nr : 110328/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date: 2011-03-28

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 25OH-Vit.D3 dans le sérum ou le plasma hépariné humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1961 : 96 tests
- C. **Fabriqué par:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. **Fonction physiologique de 25OH-Vit.D₃**

25-Hydroxyvitamine D₃ (25OHD₃) est le nom trivial de 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-triene-3β, 25-diol. Ce sécostéroïde est produit dans le foie par la 25-hydroxylation de cholecalciferol ou Vitamine D₃. 25OHD₃ est un précurseur pour d'autres métabolites Vitamine D et n'a qu'une activité biologique restreinte. Le dérivé le plus actif est 1α,25-Hydroxyvitamine D₃, produit dans les reins (ou le placenta) par la 1α-hydroxylation de 25OHD₃. Ce stéroïde régulé de façon hormonale stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Il stimule aussi la résorption et la minéralisation osseuses et prévient ainsi le développement du rachitisme, de l'ostéoporose ou de l'ostéomalacie. Cette hormone Vitamine D peut aussi être active dans d'autres tissus responsables pour la transport de calcium (la placenta, les reins, les glandes mammaires,...) et des glandes endocrines (les cellules bêta, les glandes parathyroïdes,...). 25-hydroxyvitamine D₃ est le précurseur principal pour les métabolites.

B. **Mécanisme régulateur**

La production de 25-hydroxyvitamine D se fait principalement dans le foie, bien que d'autres tissus (l'intestin, les reins) puissent effectuer la même hydroxylation. Quoiqu'il puisse apparaître quelque inhibition rétroactive de la 25-hydroxyvitamine D sur sa propre production, une disponibilité plus grande du substrat (Vitamine D₃) résulte en une augmentation de la production de 25-hydroxyvitamine D et des concentrations augmentées de 25-hydroxyvitamine D circulant dans le sang.

C. **Applications cliniques**

Cette trousse est importante pour le diagnostic de déficience, insuffisance ou intoxication en Vitamine D.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

D’abord les calibrateurs, les contrôles et les échantillons (de sérum ou de plasma hépariné) sont extraits avec de l’acétonitrile. Une quantité fixe de 25OH Vitamine D₃ marquée avec I¹²⁵, entre en concurrence avec la 25OH Vitamine D₃ des échantillons, contrôles ou calibrateurs extraits pour une quantité fixe d’anticorps spécifiques, immobilisés sur la surface basse et interne du tube plastic. Après 2 heures d’incubation à température ambiante, une phase d’aspiration met fin à la réaction de concurrence. Les tubes sont alors lavés avec 2 ml de Solution de lavage et comptés dans un compteur gamma.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	Quantité	Code Couleur	Reconstitution			
 Tubes tapissés avec l'anti 25OH-Vitamine D ₃	2 x 48	Rose	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ¹²⁵ I 25OH-Vitamine D ₃	Ag	¹²⁵ I	1 flacon lyophil. 160 kBq	Rouge	Reconstituer en extemporané en ajoutant 6 ml de tampon traceur	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur 0: sérum de cheval/tampon phosphate avec de la gentamycine	CAL	0	1 flacon lyophil.	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateurs 1-5 dans du sérum de cheval / tampon phosphate avec de la gentamycine (cf. valeurs exactes sur chaque flacon)	CAL	N	5 flacons lyophil.	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon d'incubation avec de l'azoture de sodium	INC	BUF	1 flacon 45 ml	Noir	Prêt à l'emploi	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Solution éthanolique et de l'azoture (<0,1%)	TRACER	BUF	1 flacon 7 ml	Rouge	Prêt à l'emploi	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table> Acétonitrile	ACETONITRILE	1 flacon 25 ml	Noir	Prêt à l'emploi		
ACETONITRILE						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de Lavage	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophil.	Argent	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons avec des valeurs au-dessus du calibrateur le plus haut avant la phase d’extraction. Des références internationales ne sont pas disponibles.

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl.
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Tubes en verre (12x75 mm) pour la phase d’extraction.
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Systèmes d’aspiration et de lavage.
- Tout compteur gamma capable de mesurer I¹²⁵ peut être utilisé (rendement minimum 70%).
- Centrifugeuse fonctionnant à 800-1500 g.

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. Calibrateurs :** Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d’eau distillée.
- B. Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d’eau distillée.
- C. I125 25OH-Vit.D₃ :** Reconstituer avec 6 ml de tampon traceur.
- D. 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.

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.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à –20°C pendant 3 mois maximum.
- Après la première utilisation le traceur reconstitué doit être congelé. Il est alors stable jusqu’à la date d’expiration.
- 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 et de plasma héparinés doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Cette trousse convient pour des échantillons de sérum et de plasma hépariné. Une corrélation a été établie entre 23 échantillons de sérum et de plasma hépariné de certains patients: plasma = 0,95 + 1,25 sérum, R = 0,89.
- Si le test n’est pas réalisé dans les 48 heures, un stockage à -20°C est recommandé
- Après la décongélation les échantillons de sérum et de plasma héparinés doivent être mélangés (Vortex), puis centrifugés.

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 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 :**
- Marquer des tubes en verre (12x75 mm) pour extraction : 6 calibrateurs, 2 contrôles et jusque 40 échantillons en double.
 - Distribuer 100 µl de chaque calibrateur, contrôle ou échantillon dans les tubes respectifs.
 - Ajouter 0,5 ml acétonitrile à chaque tube.
 - Mélanger 7 secondes avec un vortex.
 - Centrifuger 5 minutes à température ambiante (à 800-1500 g).

- Etape d’incubation :**
- Identifier les tubes tapissés fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l’activité totale, identifier 2 tubes non tapissés.
 - Ajouter 100 µl du surnageant obtenu après la phase d’extraction dans les tubes respectifs. Les pointes des pipettes doivent être saturées du surnageant en question avant l’addition dans le tube.
 - Distribuer 400 µl du tampon d’incubation dans chaque tube (sauf ceux pour la détermination de l’activité totale).
 - Ajouter 50 µl de traceur à chaque tube, ceux pour la détermination de l’activité totale inclus.
 - Incuber pendant 2 heures à température ambiante en agitant (300 à 700 TPM).
 - Aspirer le contenu de chaque tube (sauf ceux pour la détermination de l’activité totale).
 - Laver les tubes 2 fois avec 2 ml de Solution de lavage et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l’addition de la Solution de Lavage
 - Après le lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.

9. 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 25OH.D3, 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 25OH.D3 à partir de la courbe d’étalonnage.
6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 25OH.D3 non marquée (B0/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont fournies pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d’une courbe d’étalonnage.

25OH-Vit.D3	cpm	B/Bo x 100
Activité totale	40301	-
Calibrateur		
0 ng/ml	23803	100 %
3,0 ng/ml	20171	85 %
9,0 ng/ml	16237	68 %
20,0 ng/ml	12156	51 %
65,0 ng/ml	7090	30 %
130,0 ng/ml	5330	22 %

Note : 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

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 1,2 ng/ml.

B. Spécificité

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

Elément	Réactivité Croisée (%)
25OH-Vitamine D3	100
25OH-Vitamine D2	<0,3
1,25(OH)2-Vitamine, D3	89*
1,25(OH)2-Vitamine, D2	<0,01
Vitamine D3	<0,03
Vitamine D2	<0,03
24,25(OH)2-Vitamine, D3	<0,8

* Vu que les concentrations de 1,25(OH)2-Vit.D3 sont environ 1000 fois plus basses que 25-OH-Vit.D3, cette réactivité croisée est insignifiante et n’intervient pas dans ce test 25-OH-Vit.D3.

La performance de l’analyse n’est pas affectée par l’hémolyse (on a testé 5 g/L d’hémoglobine) ou la présence de bilirubine (on a testé 0,25 g/L de bilirubine).

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Echantil- lon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Echantil- lon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION	
25OH-Vit.D3 ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

TEST DE DILUTION			
Dilution	Concent. théorique (ng/ml)	Concent. mesurée. (ng/ml)	Récupération (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l’échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d’un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 15 ou 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l’anticorps.

DELAÏ			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
échantillon 1	9,5	9,2	10,1
échantillon 2	36,8	33,9	36,2

XIV. CONTROLE 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 contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d’acceptation pour les écarts des valeurs en doublet des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

L’alimentation, la race, la saison et l’âge ont une influence sur les taux de 25OH.Vit.D3, normaux.

Les valeurs attendues reprises ci-dessous ne doivent pas être considérées comme des valeurs absolues. DIASource a évalué le sérum de 39 hommes et 40 femmes d’Europe de l’ouest ayant des valeurs normales du Ca, de la PTH et de l’albumine. L’âge des volontaires se situait dans la fourchette de 17 à 58 ans. Les échantillons ont été prélevés pendant les mois de décembre 2010 et janvier 2011. La moyenne pour la population (n = 79) était de 12,5 ng/mL, la fourchette allant de 4,1 à 28,7 ng/ml (basé sur les percentiles 2,5 % à 97,5 %).

Tous les laboratoires doivent établir leur fourchette à partir de leur population locale.

Une bibliographie récente a suggéré les fourchettes suivantes pour la classification du statut en 25 OH Vitamine D: carence: 0 à 10 ng/mL; insuffisance: 10 à 30 ng/mL; normal: 30 à 150 ng/mL; toxicité: >150 ng/mL.

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 (35n5 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.

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 transmettront 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'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture 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. 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.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE ml	CALIBRA- TEURS ml	ECHANTIL- LON(S) CONTROLE(S) ml
<u>EXTRACTION</u>			
Calibrateurs	-	0,1	-
Echantillons/Contrôles	-	-	0,1
Acétonitrile	-	0,5	0,5
Vortex Centrifugation	Vortex durant 7 seconds 5 minutes à 800- 1500 g		
<u>INCUBATION</u>			
Surnageant d'extraction	-	0,1	0,1
Tampon d'incubation	-	0,4	0,4
Traceur	0,05	0,05	0,05
Incubation	2 heures à température ambiante en agitant (300 à 700 TPM).		
Séparation	-	aspirez	
Solution de Lavage	-	2.0	
Séparation	-	aspirez	
Solution de Lavage	-	2.0	
Séparation	-	aspirez gentiment	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

Numéro de catalogue DIAsource : KIP1961	Numéro de P.I.: 1700543/fr	Numéro de révision : 110328/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Date de révision : 2011-03-28



Lees het hele protocol voor gebruik.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. BEOOGD GEBRUIK

Radioimmunotest voor de kwantitatieve bepaling in vitro van 25OH-Vit.D3 in humaan serum en heparineplasma.

II. ALGEMENE INFORMATIE

- A. **Gedeponeerd handelsmerk :** DIASource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1961 : 96 testen
- C. **Geproduceerd door :** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. KLINISCHE ACHTERGROND

A. Fysiologische functie van 25OH-Vit.D₃

25-Hydroxyvitamine D₃ (25OHD₃) is de triviale naam van 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-triene-3β, 25-diol. Deze secosteroïde wordt in de lever geproduceerd door 25-hydroxylatie van cholecalciferol of Vitamine D₃. 25OHD₃ is een precursor voor andere Vitamine D metabolieten en heeft zelf slechts een beperkte biologische activiteit. Het meest actieve derivaat is 1α,25-Hydroxyvitamine D₃, geproduceerd in de nier (of placenta) door 1α-hydroxylatie van 25OHD₃. Dit hormonaal geregelde steroïde stimuleert de absorptie door de ingewanden van zowel calcium als fosfor. Het stimuleert ook beenderresorptie en -mineralisatie en verhindert zo de ontwikkeling van rachitis, osteoporosis of osteomalacia. Dit Vitamine D-hormoon kan ook actief zijn in andere weefsels verantwoordelijk voor calciumtransport. (placenta, nier, borstklier,...) en endocriene klieren (beta-cellen, paraschildklier,...). 25-hydroxyvitamin D₃ is een hoofdprecursor voor de metabolieten.

B. Regulatiemechanisme

De productie van 25-hydroxyvitamine D doet zich vooral in de lever voor hoewel andere weefsels (darm, nier) dezelfde hydroxylatie kunnen uitvoeren. Hoewel er een zekere feed-back belemmering kan zijn van 25-hydroxyvitamine D op zijn eigen productie, resulteert een hogere substraatbeschikbaarheid (Vitamine D₃) in een hogere 25-hydroxyvitamine D productie en hogere 25-hydroxyvitamine D concentraties in omloop in het bloed.

C. Klinische toepassingen

Deze test is van belang voor de diagnose van Vitamine D deficiëntie, insufficiëntie of intoxicatie.

IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Eerst worden kalibrators, controles en monsters (serum of heparineplasma) geëxtraheerd met acetonitrile. Een vaste hoeveelheid ¹²⁵I gelabelde 25OH Vitamine D₃ concurreert met de 25OH Vitamine D₃ van geëxtraheerde monsters ,controles of kalibrators voor een vaste hoeveelheid van specifieke sites van antilichamen, geïmmobiliseerd op het onder- en binnenoppervlak van plastic buizen. Na twee uur incubatie bij kamertemperatuur stopt een afzuigfase de competitie-reactie. De buizen worden dan gewassen met 2 ml wasoplossing en geteld in een gammateller.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Quantity	Kleur-code	Reconstitutie			
 Buizen gecoat met anti 25OH-Vitamine D ₃	2 x 48	roze	Klaar voor gebruik			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ¹²⁵ I 25OH-Vitamine D ₃	Ag	¹²⁵ I	1 flacon gevries- droogd 160 kBq	rood	Ex-tempora reconstitueren door toevoeging van 6 ml tracerbuffer	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Kalibrator 0: paardenserum/fosfaatbuffer met gentamycine	CAL	0	1 flacon gevries- droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrators 1-5 in paardenserum/fosfaatbuffer met gentamycine (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden)	CAL	N	5 flacons gevries- droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubatiebuffer met sodiumazide	INC	BUF	1 flacon 45 ml	zwart	Klaar voor gebruik	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Ethanolische oplossing met sodiumazide (< 0,1%)	TRACER	BUF	1 flacon 7 ml	rood	Klaar voor gebruik	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table> Acetonitrile	ACETONITRILE	1 flacon 25 ml	zwart	Klaar voor gebruik		
ACETONITRILE						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	bruin	70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles 1 en 2 in menselijk serum met thymol	CONTROL	N	2 flacons gevries- droogd	zilver	0,5 ml gedistilleerd water toevoegen	
CONTROL	N					

Nota : Gebruik kalibrator 0 voor verdunning van monsters met waarden boven de hoogste kalibrator voor extractiefase. Er is geen internationaal referentiemateriaal beschikbaar.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

- Gedestilleerd water.
- Pipetten voor een volume van 50 µl, 100 µl, 400 µl en 500 µl.
- Vortexmenger.
- Magnetische roerder
- Glazen buizen (12x75 mm) voor de extractiefase.
- Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
- Zuig- en wastoestel.
- Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I. Een maximale telfefficiëntie moet worden gegarandeerd.
- Centrifuge werkend bij 800-1500 g

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

A. Kalibrators : Reconstitueer de kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
B. Controles : Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
C. I125 25OH-Vit.D₃ : Reconstitueer met 6ml van de tracerbuffer.
D. Werk-wasoplossing: Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 x). Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

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.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en controles gedurende 1 week houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden.
- De gereconstitueerde tracer moet na het eerste gebruik bevroren worden. Hij is dan stabiel tot de vervaldatum.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serummonsters en monsters van heparineplasma moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Deze kit is geschikt voor serummonsters en monsters van heparineplasma. Er is een verband gelegd tussen 23 serummonsters en monsters van heparineplasma van dezelfde patiënten: plasma = 0,95 serum + 1,25; R = 0,89.
- Indien de bepaling niet binnen 48 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Na het ontdooien moeten serummonsters en heparineplasma gemixt worden (Vortex) en vervolgens gecentrifugeerd.

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 pipetteerapparatuur zullen de precisie verhogen. Respecteer de incubatietijden. Bereid een kalibratiecurve voor elke run; men mag geen gegevens gebruiken van voorafgaande runs.

B. Procedure

Extractiefase :

- Label glazen buizen (12x75 mm) voor extractie: 6 kalibrators, 2 controles en tot 40 monsters in duplo.
- Dien 100 µl van elke kalibrator, controle of monsters toe in de respectievelijke buizen.
- Voeg 0,5 ml acetonitrile toe bij elke buis.
- Mix met een vortex gedurende 7 seconden.
- Centrifugeer 5 minuten bij kamertemperatuur (bij 800-1500 g).

Incubatiefase :

- Etiketeer de gecoate buizen in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketeer 2 normale buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
- Voeg 100 µl toe van de supernatant bekomen na de extractiefase in de overeenkomstige buizen . De pipettepunten moeten verzadigd zijn met de overeenstemmende supernatant voor de toevoeging in de buis
- Dien 400 µl incubatiebuffer toe in elke buis , behalve diegene voor de totaal tellingen.
- Voeg 50 µl tracer toe in elke buis, ook de totaal tellingen.
- Incubeer al roerend (300-700 tpm) gedurende 2 uur bij kamertemperatuur.
- Zuig de inhoud van elke buis op (met uitzondering van de totaal tellingen)
- Was de buizen tweemaal met 2 ml wasoplossing en zuig af. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de wasoplossing.
- Na de wasfase moeten de buizen gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
- Tel de buizen 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:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{cpm (Kalibrator of monster)}}{\text{cpm (Nulkalibrator)}} \times 100$$

- 3. Zet de (B/B0(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de 25OH-Vit.D₃ 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 25OH-Vit.D₃ 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 25OH-Vit.D₃ (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.

25OH-Vit.D ₃	cpm	B/Bo x 100
Totaaltelling	40301	-
Kalibrator		
0 ng/ml	23803	100 %
3,0 ng/ml	20171	85 %
9,0 ng/ml	16237	68 %
20,0 ng/ml	12156	51 %
65,0 ng/ml	7090	30 %
130,0 ng/ml	5330	22 %

Nota : 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare 25OH-Vitamine D₃ concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 1,2 ng/ml.

B. Specificiteit

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

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	<0,01
Vitamin D3	<0,03
Vitamin D2	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	<0,8

* Daar 1,25(OH)₂-Vit.D₃ concentraties ongeveer 1000 maal lager zijn dan 25-OH-Vit.D₃, is deze kruisreactiviteit onbeduidend en heeft hij geen invloed op deze 25-OH-Vit.D₃ test.

Hemolyse (5 g/l hemoglobine getest) of bilirubinemie (0,25 g/l bilirubine getest) heeft geen invloed op de eigenschappen van de test.

C. Precisie

BINNEN EEN TEST

TUSSEN TESTEN

Monster	N	<X> ± SD (ng/ml)	V.C. (%)	Monster	N	<X> ± SD (ng/ml)	V.C. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Standaarddeviatie; VC : Variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECOVERY TEST	
25OH-Vit.D ₃ toegevoegd (ng/ml)	Recovery (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

VERDUNNINGSTEST			
Verdunning	Theoretische concentratie (ng/ml)	Concentratie die bepaald werd (ng/ml)	Recovery (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

E. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster

Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 15 of 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoate buisjes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
monster 1	9,5	9,2	0,1
monster 2	36,8	33,9	6,2

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. Gelieve niet meer dan twee keer in te vriezen en te ontdooien.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. TE VERWACHTE WAARDEN

Voedselopname, ras, seizoen en leeftijd tasten mogelijk de normale 25OH.Vit.D₃- spiegels aan.

De te verwachten waarden die hierna worden vermeld, mogen niet als absolute waarden worden beschouwd. DIASource evalueerde serum afgenomen bij 39 mannen en 40 vrouwen uit West-Europa die volgens de Ca-, PTH- en albuminewaarden gezond waren. De leeftijd van de vrijwilligers lag tussen 17 en 58 jaar. Monsters werden afgenomen tijdens de maanden december 2010 en januari 2011. Het gemiddelde voor de populatie (n = 79) was 12,5 ng/ml, variërend van 4,1 tot 28,7 ng/ml (gebaseerd op een percentiel van 2,5% tot 97,5%).

Elk laboratorium moet op basis van de lokale populatie zijn eigen bereik bepalen.

Recente literatuur suggereert de volgende bereiken voor de classificatie van 25 OH vitamine D-status: deficiëntie: 0-10 ng/ml; insufficiëntie: 10-30 ng/ml; sufficiëntie: 30 tot 150 ng/ml; toxiciteit: > 150 ng/ml.

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.

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 infectieus materiaal.

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 werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen. 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.

XVII. BIBLIOGRAFIE

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN ml	KALIBRA- TORS ml	MONSTER(S) CONTROLE(S) ml
<u>EXTRACTIE</u>			
Kalibrators	-	0,1	-
Monsters/Controles	-	-	0,1
Acetonitrile	-	0,5	0,5
Vortex Centrifugatie	Vortex gedurende 7 seconden 5 minuten bij 800-1500 g		
<u>INCUBATIE</u>			
Supernatant of extractie	-	0,1	0,1
Incubatiebuffer	-	0,4	0,4
Tracer	0,05	0,05	0,05
Incubatie	2 uren bij kamertemperatuur, al roerend (300-700 tpm).		
Scheiding	-	opzuigen	
Wasoplossing	-	2.0	
Scheiding	-	opzuigen	
Wasoplossing	-	2.0	
Scheiding	-	Voorzichtig opzuigen	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer : KIP1961	Nummer van de bijsluiters : 1700543/nl	Revisienr : 110328/1
--	---	-------------------------

Revisiedatum : 2011-03-28

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem 25OH-Vit.D3 in Serum und Heparinplasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Katalognummer:** KIP1961 : 96 tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

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. **Die physiologische Bedeutung des 25-OH-Vitamins D₃**

25-Hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) ist die Trivialbezeichnung für 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-trien-3β, 25-diol. Dieses Secosteroid wird in der Leber durch Hydroxylierung von Cholecalciferol oder Vitamin D₃ gebildet. 25OHD₃ ist eine Vorstufe für andere Vitamin D-Metaboliten und besitzt selbst nur eine begrenzte biologische Aktivität. Der biologisch aktivste Abkömmling ist das 1α,25-Hydroxyvitamin D₃, das in der Niere (oder der Plazenta) durch 1α-Hydroxylierung des 25OHD₃ gebildet wird. Dieses hormonell gesteuerte Steroid regt im Darm die Aufnahme von Calcium und Phosphor an. Es stimuliert weiters die Knochenresorption und -mineralisierung und trägt dadurch zur Verhinderung einer Rachitis, Osteoporose oder Osteomalazie bei. Auch in anderen, für den Calciumtransport verantwortlichen Geweben (Plazenta, Niere, Brustdrüsen, usw.) und in den endokrinen Drüsen (Betazellen, Parathyroidzellen, usw.) kann dieses Vitamin D-Hormon wirksam werden. 25-Hydroxyvitamin D₃ ist die hauptsächliche Vorstufe für die Metaboliten.

B. **Der Steuerungsmechanismus**

Die Produktion des 25-Hydroxyvitamins D findet hauptsächlich in der Leber statt, obwohl die gleiche Hydroxylierung auch von anderen Geweben (Darm, Niere) durchgeführt werden kann. Obwohl es möglicherweise eine Feedbackhemmung durch die Produktion des 25-Hydroxyvitamins D gibt, führt ein höheres Substratangebot (Vitamin D₃) zu einer erhöhten Produktion des 25-Hydroxyvitamins D sowie zu einer Erhöhung der Konzentration des 25-Hydroxyvitamins D im Blut.

C. **Klinische Anwendungen**

Dieser Assay ist für die Diagnose des Vitamin D-Mangels, seiner Unzulänglichkeit oder Intoxikation von Bedeutung.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden Kalibratoren, Kontrollen und Proben (Serum oder Heparinplasma) mit Azetonitril extrahiert. Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I markiertes 25-OH-Vitamin D₃ konkurriert mit dem aus Proben, Kontrollen oder Kalibratoren extrahierten 25-OH-Vitamin D₃ um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen, die im unteren Innenteil von Kunststoffröhrchen immobilisiert sind. Nach 2 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit 2 ml Waschlösung gewaschen und in einem Gamma-Counter gezählt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	Quantität	Farbcode	Rekonstitution			
 Mit anti 25-OH-Vitamin D ₃ -beschichtete Röhrchen	2 x 48	rosa	Gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> I ¹²⁵ 25-OH-Vitamin D ₃	Ag	¹²⁵ I	1 Gefäß lyophil. 160 kBq	rot	zeitnahes Rekonstituieren durch Zugabe von 6 ml Tracer-Puffer	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null-Kalibrator: Pferdeserum /Phosphatpuffer mit Gentamicin	CAL	0	1 Gefäß lyophil.	gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratoren 1-5: Pferdeserum/Phosphatpuffer mit Gentamicin (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten)	CAL	N	5 Gefäße lyophil.	gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Inkubationspuffer mit Natriumazid (< 0,1%)	INC	BUF	1 Gefäß 45 ml	schwarz	Gebrauchsfertig	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Äthanollösung mit Natriumazid (< 0,1%)	TRACER	BUF	1 Gefäß 7 ml	rot	Gebrauchsfertig	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>AZETONITRIL</td></tr></table> Azetonitril	AZETONITRIL	1 Gefäß 25 ml	schwarz	Gebrauchsfertig		
AZETONITRIL						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen.
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen: N = 1 oder 2 in Humanserum und Thymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophil.	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator für die Verdünnung von Proben mit Werten über dem höchsten Kalibrator vor der Extraktion. Es sind keine weiteren internationalen Referenzdokumente vorhanden.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

- Dest. Wasser
- Pipetten: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl.
- Vortexmixer
- Magnetrührer
- Glasröhrchen (12 x 75 mm) für den Extraktionsschritt
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
- Absaug- und Waschvorrichtung
- Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.
- Zentrifuge für Betrieb mit 800-1500 g

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
B. Kontrollen : Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
C. I125 25-OH-Vitamin D₃: Rekonstituieren Sie mit 6 ml Tracer-Puffer.
D. Waschlösung: Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

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.
- Nach der Rekonstitution sind Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8 °C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden for maximum 3 months ,für maximal 3 Monate.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Der rekonstituierte Tracer ist nach dem ersten Gebrauch tiefzufrieren und dann bis zum Verfalldatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND –VORBEREITUNG

- Serumproben und Heparin Plasmaproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Dieser Kit ist für Serum- und Heparin Plasmaproben geeignet. Eine Korrelation wurde zwischen 23 Serum- und Heparin Plasmaproben des gleichen Patienten festgestellt: Plasma = 0,95 Serum + 1,25, R= 0,89.
- Falls der Test nicht innerhalb von 48 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Nach dem Auftauen Serumproben und Heparinplasma zuerst mischen (Vortexmixer), dann zentrifugieren.

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

Extraktionsschritt:

- Beschriften Sie Glasröhrchen (12 x 75 mm) für Extraktion: 6 Kalibratoren, 2 Kontrollen und bis zu 40 Proben in doppelter Ausfertigung
- Geben Sie 100 µl jedes Kalibrators, jeder Kontrolle oder Probe in die entsprechenden Röhrchen.
- Pipettieren Sie 0,5 ml Azetonitril in jedes Röhrchen.
- Mischen Sie 7 Sekunden mit einem Vortexmixer.
- Zentrifugieren Sie 5 Minuten bei Raumtemperatur (bei 800-1500 g).

Inkubationsschritt:

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Pipettieren Sie 100 µl des Überstandes aus dem Extraktionsschritt in die entsprechenden Röhrchen. Die Pipettenspitzen jeweils vor dem Pipettieren mit dem entsprechenden Überstand sättigen.
- Geben Sie 400 µl Inkubationspuffer in alle Röhrchen (außer T).
- Pipettieren Sie 50 µl Tracer in alle Röhrchen (einschließlich T).
- Inkubieren Sie 2 Stunden, unter Rühren (300-700 UPM), bei Raumtemperatur.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität).
- Waschen Sie die Röhrchen zweimal mit 2 ml Waschlösung und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Lassen Sie nach dem Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen 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/B0 (%) = $\frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$
- Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B0(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 25OH.D3 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 25OH.D3 Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B0(%) der Referenzkurve.
- Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 25OH.D3 (B0/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

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

25OH-Vit.D3		Cpm	B/Bo x 100
Gesamtaktivität		40301	-
Kalibrator	0 ng/ml	23803	100 %
	3,0 ng/ml	20171	85 %
	9,0 ng/ml	16237	68 %
	20,0 ng/ml	12156	51 %
	65,0 ng/ml	7090	30 %
	130,0 ng/ml	5330	22 %

Bemerkung: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

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 25-OH-Vitamin D3 Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 1,2 ng/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 (%)
25OH-Vitamin D3	100
25OH-Vitamin D2	<0,3
1,25(OH)2-Vitamin,D3	89*
1,25(OH)2-Vitamin,D2	<0,01
Vitamin D3	<0,03
Vitamin D2	<0,03
24,25(OH)2-Vitamin,D3	<0,8

* Da die 1,25(OH)2-Vitamin D3 Konzentrationen praktisch 1.000 Mal niedriger sind als die des 25-OH-Vitamins D3, ist diese Kreuz-Reaktivität als nicht signifikant für den 25-OH-Vitamin D3 Assay einzustufen.

Die Leistung des Tests wird nicht durch Hämolyse (mit 5g/L Hämoglobin getestet) oder Bilirubinämie (mit 0,25 g/L Bilirubin getestet) beeinflusst.

C. Präzision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST	
Zugeg. 25-OH-Vit.D3 (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
0	-
7,5	100
15,0	107
30,0	100
60,0	98

VERDÜNNUNGSTEST			
Probeverdünung	Theoretische Konzent. (ng/ml)	Gemessene Konzent. (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 15 oder 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
Probe 1	9,5	9,2	10,1
Probe 2	36,8	33,9	36,2

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Wenn die Resultate für Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 sich nicht innerhalb des auf dem Fläschchenetikett angegebenen Bereichs befinden, können die Resultate nicht verwendet werden, wenn es keine zufrieden stellende Erklärung für die Diskrepanz gibt.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erinnern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Nahrungsaufnahme, Rasse, Jahreszeit und Alter haben einen Einfluss auf die Normalwerte des 25-OH-Vitamins D3. Die nachfolgend erwarteten Ergebnisse sollten nicht als absolut betrachtet werden. DIAsource evaluierte Serum, das von von 39 Männern und 40 Frauen aus Westeuropa gesammelt wurde, die gesund nach ihren Ca-, PTH- und Albumin-Werten waren. Das Alter der Freiwilligen lag zwischen 17 und 58 Jahren. Die Proben wurden in den Monaten Dezember 2010 und Januar 2011 gesammelt. Der Durchschnittswert (n= 79) lag bei 12,5 ng/ml, mit Bereichsgrenzen von 4,1 bis 28,7 ng/ml (basierend auf 2,5 bis 97,5 Perzentilen). Jedes Labor sollte seinen eigenen Bereich, basierend auf der lokalen Bevölkerung, etablieren.

Aktuelle Literatur schlägt die folgenden Bereiche für die Klassifizierung von 25 OH Vitamin D vor: Mangel: 0-10 ng/ml; Unzulänglichkeit: 10-30 ng/ml; Ausreichend: 30 bis 150 ng/ml; Giftigkeit: >150 mg/ml.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ^{125}I (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.

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 Waschschrte 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. 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 Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert 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.

XVII. LITERATUR

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT ml	KALIBRA- TOREN ml	PROBE(N) KONTROLLEN ml
<u>EXTRAKTION</u>			
Kalibratoren	-	0,1	-
Proben / Kontrollen	-	-	0,1
Azetonitril	-	0,5	0,5
Vortex Zentrifugierung	Vortex 7 Sekunden 5 Minuten bei 800-1500 g		
<u>INKUBATION</u>			
Extraktionsüberstand	-	0,1	0,1
Inkubationspuffer	-	0,4	0,4
Tracer	0,05	0,05	0,05
Inkubation	2 Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren (300-700 UPM)		
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	2,0	
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	2,0	
Separation	-	vorsichtig absaugen	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		

DIASource Katalognummer: KIP1961	Beipackzettel- nummer: 1700543/de	Nummer der Originalausgabe: 110328/1
-------------------------------------	--------------------------------------	--

Revisionsdatum : 2011-03-28



Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del 25OH-Vit.D3 umano nel siero o nel plasma eparinizzato.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1961 : 96 tests
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Funzione fisiologica di 25OH-Vit.D₃

25-idrossivitamina D₃ (25OHD₃) è la denominazione comune di 9,10-secocalesta-5,7,10(19)-triene-3β,25-diolo. Questo secosteroide viene prodotto nel fegato attraverso la 25-idrossilazione del colecalciferolo o della vitamina D₃. 25OHD₃ è un precursore per altri metaboliti della vitamina D ed è dotato esclusivamente di un'attività biologica limitata. Il derivato più attivo è 1α,25-idrossivitamina D₃, prodotta nel rene (o nella placenta) da 1α-idrossilazione di 25OHD₃. Questo steroide regolato ormonalmente stimola l'assorbimento sia del calcio che del fosforo da parte dell'intestino. Esso stimola, inoltre, il riassorbimento e la mineralizzazione ossea prevenendo lo sviluppo del rachitismo, dell'osteoporosi o della osteomalacia. Questo ormone della vitamina D potrebbe risultare attivo anche in altri tessuti responsabili del trasporto del calcio (placenta, rene, ghiandole mammarie, ecc.) e nella ghiandole endocrine (cellule beta, paratiroidi, ecc.) La 25-idrossivitamina D₃ è il principale precursore per i metaboliti.

B. Meccanismo di regolazione

La produzione di 25-idrossivitamina D avviene principalmente nel fegato sebbene altri tessuti (intestino, reni) potrebbero eseguire la stessa idrossilazione. Sebbene possa verificarsi una certa inibizione da retroazione nella stessa produzione di 25-idrossivitamina D, una maggiore disponibilità di substrato (vitamina D₃) comporta una maggiore produzione di 25-idrossivitamina D e una maggiore concentrazione di 25-idrossivitamina D in circolazione nel sangue.

C. Applicazioni cliniche

Questo dosaggio è importante ai fini della diagnosi di carenza o insufficienza di vitamina D, o in caso di intossicazione.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

In un primo tempo i calibratori, i controlli e i campioni (siero e di plasma eparinizzato) vengono estratti con acetonitrile. Una quantità definita di 25OH vitamina D₃ marcata con ¹²⁵I compete con 25OH vitamina D₃ ottenuta da qualsiasi campione, controllo o calibratore estratto per un numero definito di siti di anticorpo specifici adsorbito sulla superficie inferiore e interna delle provette di plastica. Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono lavate con tampone di lavaggio e contate in un contatore gamma.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Quantità	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti 25OH-Vitamina.D₃	2 x 48	rosa	Pronte per l'uso
Ag ¹²⁵I 25OH-Vitamina.D₃I¹²⁵	1 flacone liofilizzati 160 kBq	rosso	Ricostituire al momento aggiungendo 6 ml di tracer buffer
CAL 0 Calibratore 0: siero di cavallo/tampone fosfato con gentamicina	1 flacone liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
CAL N Calibratori 1-5 in siero di cavallo/tampone fosfato con gentamicina (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi)	5 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
INC BUF Tampone incubazione con azide di sodio (<0,1%)	1 flacone 45 ml	nero	Pronte per l'uso
TRACER BUF Soluzione etanolica con sodio azide (<0,1%)	1 flacone 7 ml	rosso	Pronte per l'uso
ACETONITRILE Acetonitrile	1 flacone 25 ml	nero	Pronte per l'uso
WASH SOLN CONC Tampone di lavaggio	1 flacone 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
CONTROL N Controlli N. 1 e 2, in siero umano, contenente timolo	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata

Nota: Utilizzare il calibratore N.0 per diluire i campioni con valori superiori a quelli del calibratore maggiore prima della fase di estrazione. Non è disponibile alcun materiale di riferimento internazionale.

VI. REATTIVI NON FORNITI

- Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit:
- Acqua distillata
 - Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl.
 - Agitatore tipo vortex
 - Agitatore magnetico
 - Provette di vetro (12x75 mm) per la fase di estrazione.
 - Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi
 - Dispositivo di aspirazione e lavaggio.
 - Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%).
 - Centrifuga attivata a 800-1500 g

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- I125 25OH-Vit.D₃ :** Ricostituire con 6 ml di tracer buffer.
- Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 1 settimana a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C, per periodi più lunghi, fino a un massimo di 3 mesi.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo il primo utilizzo è necessario congelare il marcato ricostituito, che si manterrà stabile fino alla data di scadenza.
- 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 di plasma eparinizzato a 2-8°C.
- Questo kit è adatto per campioni di siero e di plasma eparinizzato. È stata stabilita una correlazione tra 23 campioni di siero e di plasma eparinizzato ottenuti dagli stessi pazienti: plasma = 0,95 siero + 1,25, R = 0,89.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 48 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Una volta eseguito lo scongelamento, i campioni di siero e di plasma eparinizzato devono essere prima miscelati (vortex) e, poi, centrifugati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

- Avvertenze generali**
Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

Fase di estrazione :

- Etichettare le provette di vetro (12x75 mm) per la fase di estrazione: 6 calibratori, 2 controlli e fino a 40 campioni in duplicato.
- Dispensare 100 µl di ciascun calibratore, controllo o campione nelle rispettive provette.
- Aggiungere 0,5 ml di acetonitrile a ciascuna provetta.
- Miscelare per 7 secondi utilizzando un agitatore vortex.
- Centrifugare per 5 minuti a temperatura ambiente (a 800-1500 g).

Fase di incubazione :

- Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- Aggiungere 100 µl di supernatante ottenuto dalla fase di estrazione nelle rispettive provette. Prima di eseguire l'aggiunta nella provetta, è necessario che i puntali delle pipette siano stati saturati con il rispettivo supernatante.
- Dispensare 400 µl tampone incubazione in ciascuna provetta, tranne in quelle per l'attività totale.
- Aggiungere 50 µl di marcato in ciascun provetta, incluso quelle per l'attività totale.
- Incubare 2 ore a temperatura ambiente sotto agitazione (300-700 rpm).
- Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
- Lavare per due volte le provette utilizzando 2 ml di tampone di lavaggio ed eseguire l'aspirazione. Evitare che si formi schiuma durante l'utilizzo del tampone di lavaggio.
- Dopo il lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.

9. 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 di calibratore 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette dello 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 25OH.D3, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
- 4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati utilizzare la curva a 4 parametri.
- 5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 25OH.D3.
- 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 25OH.D3 in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

25OH-Vit.D3		cpm	B/Bo x 100
Attività totale		40301	-
Calibratore	0 ng/ml	23803	100 %
	3,0 ng/ml	20171	85 %
	9,0 ng/ml	16237	68 %
	20,0 ng/ml	12156	51 %
	65,0 ng/ml	7090	30 %
	130,0 ng/ml	5330	22 %

Nota: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

- A. Sensibilità
- Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di 25OH-Vitamina.D3 con cpm inferiore alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 1,2 ng/ml.

- B. Specificità
- Le percentuali di cross-reattività stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione al 50% sono rispettivamente:

Composto	Cross-Reattività (%)
25OH-Vitamin D3	100
25OH-Vitamin D2	<0,3
1,25(OH)2-Vitamin.D3	89*
1,25(OH)2-Vitamin.D2	<0,01
Vitamin D3	<0,03
Vitamin D2	<0,03
24,25(OH)2-Vitamin.D3	<0,8

* Dal momento che le concentrazioni di 1,25(OH)2-Vit.D3 sono, praticamente, 1000 inferiori rispetto a quelle di 25-OH-Vit.D3, questa cross-reattività non è significativa e non interferisce con questo dosaggio di 25-OH-Vit.D3.

Le prestazioni del saggio non sono influenzate dall'emolisi (analizzati 5 g/L di emoglobina) o dalla bilirubinemia (analizzati 0,25 g/L di bilirubina).

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Campio ne	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Campio ne	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO	
25OH-Vit.D3 aggiunto (ng/ml)	Recupero (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

TEST DI DILUZIONE			
Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)	Recupero (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

- E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione
- Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 15 e 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
campioni 1	9,5	9,2	10,1
campioni 2	36,8	33,9	36,2

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. VALORI ATTESI

È noto che l'apporto dietetico, la razza, la stagione e l'età influiscono sui normali livelli di 25OH.Vit.D3, I valori attesi forniti qui di seguito non devono essere considerati come assoluti. DIASource ha analizzato il siero raccolto da 39 soggetti maschili e 40 soggetti femminili, giudicati sani in base ai valori di Ca, PTH e albumina, provenienti dall'Europa occidentale. L'intervallo di età dei volontari era 17-58 anni. I campioni sono stati raccolti durante i mesi di dicembre 2010 e gennaio 2011. La media per la popolazione (n = 79) è risultata 12,5 ng/mL, varabile da 4,1 a 28,7 ng/ml (basati sui percentili dal 2,5% al 97,5%). Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento in base alla propria popolazione locale.

La letteratura recente suggerisce i seguenti intervalli per la classificazione dello stato di 25-OH-Vitamina D: carenza: 0-10 ng/mL; insufficienza: 10-30 ng/mL; sufficienza: da 30 a 150 ng/mL; tossicità: >150 ng/mL.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro. Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati

da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere 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. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. 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 usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	ATTIVITÀ TOTALE ml	CALIBRATORE ml	CAMPIONI CONTROLLI ml
<u>ESTRAZIONE</u>			
Calibratore	-	0,1	-
Campioni/Controlli	-	-	0,1
Acetonitrile	-	0,5	0,5
Agitatore Vortex Centrifugazione	Agitare per 7 secondi 5 minuti a 800-1500 g		
<u>INCUBAZIONE</u>			
Supernatante di estrazione	-	0,1	0,1
Tampone incubazione	-	0,4	0,4
Marcato	0,05	0,05	0,05
Incubazione	Incubare 2 ore a temperatura ambiente sotto agitazione (300-700 rpm).		
Separazione Tampone di lavaggio	-	aspirare 2,0	
Separazione Tampone di lavaggio	-	aspirare 2,0	
Separazione	-	Aspirare con cautela	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP1961	P.I. numero: 1700543/it	Revisione numero: 110328/1
---	----------------------------	-------------------------------

Data di revisione : 2011-03-28



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro del 25OH-Vit.D3 humano en suero o plasma heparinizado.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT
- B. **Número de Catálogo:** KIP1961 : 96 test
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Para cuestiones técnicas e información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. **Función fisiológica de 25OH-Vit.D₃**

25-Hidroxivitamina D₃ (25OHD₃) es el nombre simple de 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-triene-3β, 25-diol. Este secoesteroide se produce en el hígado por la 25-hidroxilación del colecalciferol o Vitamina D₃. 25OHD₃ es un precursor para otros metabolitos de la Vitamina D y tiene una actividad biológica limitada. El derivado más activo es 1α,25-Hidroxivitamina D₃, producido en el riñón (o la placenta) por la 1α-hidroxilación de 25OHD₃. Este esteroide regulado de manera hormonal estimula la absorción intestinal del calcio y del fósforo. Estimula también la resorción y mineralización ósea e impide así el desarrollo del raquitismo, osteoporosis o de la osteomalacia. Esta hormona Vitamina D también puede ser activa en otros tejidos responsables del transporte del calcio (placenta, riñón, glándula mamaria,...) y en las glándulas endocrinas (células beta, glándulas paratiroides,...). 25-hidroxivitamina D₃ es un precursor principal para los metabolitos.

B. **Mecanismo regulador**

La producción de 25-hidroxivitamina D se produce principalmente en el hígado, aunque otros tejidos (intestino, riñón) pueden efectuar la misma hidroxilación. Aunque puede haber cierta inhibición retroactiva de la 25-hidroxivitamina D en su propia producción, una disponibilidad más alta del sustrato (Vitamina D₃) resulta en una producción más alta de 25-hidroxivitamina D y en concentraciones más altas de 25-hidroxivitamina D en circulación en la sangre.

C. **Aplicaciones clínicas**

Este kit es importante para diagnosticar la deficiencia, insuficiencia o la intoxicación por Vitamina D.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Primero los calibradores, los controles y las muestras (suero o plasma heparinizado) son extraídos con acetonitrilo. Una cantidad fija de 25OH Vitamina D₃ marcada con ¹²⁵I compite con la 25OH Vitamina D₃ de las muestras, los controles o los calibradores extraídos, por una cantidad fija de sitios de anticuerpos, inmovilizados en la superficie inferior interna de tubos de plástico. Después de 2 horas de incubación a T.A., una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de Solución de lavado y se cuentan en un contador de radiaciones gamma.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Cantidad	Código de Color	Reconstitución			
 Tubos recubiertos con anti 25OH-Vitamin.D ₃	2 x 48	rosa	Listo para uso			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> TRAZADOR: 25OH-Vitamina.D ₃ marcado con I125	Ag	¹²⁵ I	1 vial liofilizado 160 kBq	rojo	Reconstituir inmediatamente antes de usar agregando 6 ml del tampón trazador	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador 0: suero de caballo/tampón fosfato con gentamicina	CAL	0	1 vial liofilizado	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores 1-5 en suero de caballo/tampón fosfato con gentamicina (mirar los valores exactos en las etiquetas)	CAL	N	5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampón de incubación con azida sódica (< 0.1%)	INC	BUF	1 vial 45 ml	negro	Listo para uso	
INC	BUF					
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Solución etanólica con azida sódica (< 0,1%)	TRACER	BUF	1 vial 7 ml	rojo	Listo para uso	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table> Acetonitrilo	ACETONITRILE	1 vial 25 ml	negro	Listo para uso		
ACETONITRILE						
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solución de lavado	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles - N = 1 o 2 en suero humano y timol	CONTROL	N	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada	
CONTROL	N					

Nota : Para diluciones de muestras con valores superiores al calibrador más alto antes de la fase de extracción, utilizar el calibrador 0. No existe ninguna preparación de referencia internacional.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

- Agua destilada
- Pipetas de 50 µl, 100µl, 400 µl y 500 µl
- Vortex
- Agitador magnético
- Tubos de vidrio (12x75 mm) para la fase de extracción.
- Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
- Sistema de aspiración (opcional)
- Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)
- Centrifuga funcionando a 800-1500 g

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:** reconstituir los calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C 25OH-Vit.D₃I-¹²⁵ :** reconstituir con 6 ml de tampón trazador.
- D. 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.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o 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.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a -20°C por 3 meses máximo.
- Después del primer uso el trazador reconstituido tiene que ser congelado. Así es estable hasta la fecha de caducidad.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero y plasma heparinizado deben ser guardadas a 2-8°C.
- Este kit es adecuado para muestras de suero y plasma heparinizado. Se ha establecido una correlación entre 23 sueros y plasmas heparinizados de los mismos pacientes: Plasma = 0,95 Suero + 1,25, R = 0,89.
- Si el ensayo no se realiza en 48 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Después de descongelar, las muestras de suero y plasma heparinizado tienen que ser mezcladas (Vortex), después centrifugadas.

X. PROTOCOLO

- A. Notas de manejo**
No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número 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 contaminación cruzada utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión o 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

Fase de extracción:

- Marcar los tubos de vidrio (12x75 mm) para extracción: 6 calibradores, 2 controles y hasta 40 muestras en duplicado.
- Dispensar 100 µl de cada calibrador, control o muestra en sus respectivos tubos.
- Añadir 0,5 ml de acetonitrilo a cada tubo.
- Mezclar durante 7 segundos con un vortex.
- Centrifugar durante 5 minutos a temperatura ambiente (a 800-1500 g).

Fase de Incubación :

- Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los calibradores, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
- Añadir 100 µl del sobrenadante obtenido después de la fase de extracción a los tubos respectivos. Las puntas de las pipetas deben ser saturadas del sobrenadante en cuestión antes de la adición al tubo.
- Dispensar 400 µl del Tampón de Incubación en cada tubo, excepto los de Cuentas Totales.
- Añadir 50 µl del trazador a cada tubo, incluyendo las Cuentas Totales.
- Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, en un agitador (300-700 RPM).
- 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.
- Lavar los tubos 2 veces con 2 ml de Solución de lavado y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
- Después del lavado, dejar los tubos en posición vertical durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
- 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 determinada al punto cero (0) del calibrador de acuerdo con la siguiente formula:
- B/B0 (%) =

Cuentas (Calibrador o muestra)

Cuentas (Calibrador Cero)

x100
3.

Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico o logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada punto del calibrador frente a las concentraciones del 25OH-Vit.D de cada calibrador, rechazando los puntos externos.
4.

Métodos computarizados de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.
5.

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.
6.

El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de 25OH-Vit.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.

25OH-Vit.D ₃		cpm	B/Bo x 100
Cuentas Totales		40301	-
Calibrador	0 ng/ml	23803	100 %
	3,0 ng/ml	20171	85 %
	9,0 ng/ml	16237	68 %
	20,0 ng/ml	12156	51 %
	65,0 ng/ml	7090	30 %
	130,0 ng/ml	5330	22 %

Nota : 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente de 25OH-Vitamin.D₃, dos desviaciones estándares debajo de la media de cuentas cuando el enlace era cero, fue de 1,2 ng/ml.

B. Especificidad

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

Compuesto	Reacción-cruzada (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	<0,01
Vitamin D ₃	<0,03
Vitamin D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	<0,8

* Visto que las concentraciones de 1,25(OH)₂-Vit.D₃ son aproximadamente 1000 veces más bajas que 25-OH-Vit.D₃, esta reacción cruzada es insignificante y no influye en este ensayo de 25-OH-Vit.D₃.

El desempeño no se ve afectado por hemólisis (probado con 5 g/L de hemoglobina) o bilirubinemia (probado con 0,25 g/L bilirubina).

C. Precisión

PRECISION INTRA-ENSAYO				PRECISION INTER-ENSAYO			
Muest ra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Muest ra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	99	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B		13,1 ± 1,0	7,3

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DE RECUPERACIÓN	
25OH-Vit.D añadido (ng/ml)	Recuperado (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

TEST DILUCIÓN			
Dilución de la muestra	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)	Recuperado (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 15 y 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

TIEMPO DE ESPERA			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
Muestra 1	9,5	9,2	10,1
Muestra 2	36,8	33,9	36,2

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, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los duplicados de las muestras se apoyan en las Buenas Prácticas de Laboratorio.

XV. VALORES ESPERADOS

La alimentación, la raza, la estación y la edad pueden influenciar los niveles normales de 25OH.Vit.D₃. Los valores esperados presentados a continuación no deben considerarse como absolutos. DIASource evaluó suero de 39 hombres y 40 mujeres, sanos de acuerdo a valores de Ca, PTH y albúmina., de Europa Occidental. La edad de los voluntarios fluctuó entre los 17 y los 58 años de edad. Las muestras fueron tomadas durante los meses de diciembre del 2010 y enero del 2011. El promedio para la población (n = 79) fue de 12.5 ng/mL, con un rango entre 4,1 al 28,7 ng/mL (basados en los percentiles 2,5 % a 97,5 %). Cada laboratorio debe establecer su propio rango basado en su población local.

Literatura reciente ha sugerido los siguientes rangos para la clasificación del estado de la 25 OH Vitamina D: Deficiencia: 0-10 ng/mL; Insuficiencia: 10-30 ng/mL; Suficiencia: 30 a 150 ng/mL; Toxicidad: >150 ng/mL.

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 o animales.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo para 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 u 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 considerados como potencialmente infecciosos.
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 o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes. Todo el manejo de producto radiactivo se hará en un área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros para recepción y almacenaje de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá separarse para evitar la contaminación cruzada con otros radioisótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser eliminados 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.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1.

ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2.

HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3.

HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4.

DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5.

BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6.

HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (ml)	CALIBRADO RES (ml)	MUESTRA(S) CONTROL(ES) (ml)
<u>EXTRACCIÓN</u>			
Calibradores	-	0,1	-
Muestras, controles	-	-	0,1
Acetonitrilo	-	0,5	0,5
Vortex	Vortex durante 7 segundos		
Centrifugación	5 minutos a 800-1500 g		
<u>INCUBACIÓN</u>			
Sobrenadante de extracción	-	0,1	0,1
Tampón de incubación	-	0,4	0,4
Trazador	0,05	0,05	0,05
Incubación	2 horas a T.A. en un agitador (300-700 RPM).		
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	Aspirar cuidadosamente	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP1961	P.I. Numero : 1700543/es	Revisión nr : 110328/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión : 2011-03-28

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para a determinação quantitativa *in vitro* do 25OH-Vit.D3 no soro humano e no plasma com heparina.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome do proprietário:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Número do catálogo:** KIP1961 : 96 testes
- C. **Produzido por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica, contacte:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

A. **Função fisiológica do 25OH-Vit.D₃**

25-Hidroxivitamina D₃ (25OHD₃) é o nome comum de 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-trieno-3β, 25-diol. Este secosteróide é produzido no fígado por 25-hidroxilação de colecalciferol ou Vitamina D₃. O 25OHD₃ é um precursor para outros metabolitos da Vitamina D e possui apenas uma actividade biológica limitada. O derivado mais activo é a 1α,25-Hidroxivitamina D₃, produzida no rim (ou placenta) por 1α-hidroxilação do 25OHD₃. Este esteróide regulado hormonalmente, estimula a absorção intestinal, tanto de cálcio como de fósforo. Estimula, ainda, a reabsorção e a mineralização óssea, prevenindo, assim, o desenvolvimento de raquitismo, osteoporoses ou osteomalácia. Esta hormona da Vitamina D pode, igualmente, ser activa noutros tecidos responsáveis pelo transporte do cálcio (placenta, rim, glândula mamária...) e nas glândulas endócrinas (células beta, glândulas paratiroídes...). A 25-hidroxivitamina D₃ é o principal precursor dos metabolitos.

B. **Mecanismo regulador**

A produção de 25-hidroxivitamina D ocorre principalmente no fígado, embora outros tecidos (intestino, rim) possam desempenhar a mesma hidroxilação. Embora possa ocorrer alguma retro-inibição da 25-hidroxivitamina D na sua própria produção, uma disponibilidade superior de substrato (Vitamina D₃) resulta numa produção superior de 25-hidroxivitamina D e em concentrações superiores de 25-hidroxivitamina D a circular no sangue.

C. **Aplicações clínicas**

Este ensaio é importante para o diagnóstico da carência, insuficiência ou intoxicação de Vitamina D.

IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Em primeiro lugar, os calibradores, controlos e amostras (soro ou plasma com heparina) são extraídos com acetonitrilo. Uma quantidade fixa de 25OH Vitamina D₃ marcada com ¹²⁵I compete com a 25OH Vitamina D₃ de amostras extraídas, controlos ou calibradores para uma quantidade fixa de paratopos específicos imobilizados na superfície inferior e interna de tubos de plástico. Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, uma operação de aspiração interrompe a reacção de competição. Os tubos são, de seguida, lavados com 2 ml de solução de limpeza e contados num contador gama.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Quantidade	Código de cor	Reconstituição			
 Tubos revestidos com anti 25OH-Vitamina D₃	2 x 48	cor-de-rosa	Pronto para utilizar			
<table><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ¹²⁵I 25OH-Vitamina D₃	Ag	¹²⁵ I	1 recipiente liofilizado 160 kBq	vermelho	Reconstituir extemporaneamente por adição de 6 ml de Tampão Marcador	
Ag	¹²⁵ I					
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrador 0: soro de cavalo/tampão fosfato com gentamicina	CAL	0	1 recipiente liofilizado	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CAL	0					
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibradores 1-5 em soro de cavalo/ tampão fosfato com gentamicina (ver valores exactos nos rótulos dos recipiente)	CAL	N	5 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CAL	N					
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Tampão de incubação com azida de sódio (<0,1%)	INC	BUF	1 recipiente 45 ml	preto	Pronto para utilizar	
INC	BUF					
<table><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Solução etanol com azida de sódio (<0,1%)	TRACER	BUF	1 recipiente 7 ml	vermelho	Pronto para utilizar	
TRACER	BUF					
<table><tr><td>ACETONITRIL</td></tr></table> Acetonitrilo	ACETONITRIL	1 recipiente 25 ml	preto	Pronto para utilizar		
ACETONITRIL						
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solução de lavagem	WASH	SOLN	CONC	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
WASH	SOLN	CONC				
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controlos 1 e 2 em soro humano com timol	CONTROL	N	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada	
CONTROL	N					

Nota: Utilize o Calibrador 0 para a diluição de amostras com valores acima do maior calibrador antes da operação de extracção. Não estão disponíveis materiais de referência internacionais.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

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

- Água destilada
- Pipetas automáticas de: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl.
- Misturador vortex
- Agitador magnético
- Tubos de vidro (12x75 mm) para a operação de extracção.
- Seringa automática de 5 ml (tipo Cornwall) para lavagem
- Dispositivo de aspiração e lavagem.
- Qualquer contador gama com capacidade para medir ¹²⁵I pode ser utilizado (alcance mínimo 70%)
- Centrifugadora a 800-1500 g

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. Calibradores:** Reconstitua os calibradores com 0,5 ml de água destilada.
- B. Controlos:** Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- C. I125 25OH-Vit.D₃:** Reconstitua com 6 ml de Tampão Marcador
- D. 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. Elimine a solução de lavagem não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos ou reconstituídos, todos os componentes dos kits são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que mantidos entre 2 a 8°C.
- Após reconstituição, os calibradores e os controlos são estáveis durante 1 semana, se mantidos entre 2 a 8°C. Em períodos de armazenamento mais longos, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C por no máximo 3 meses.
- O marcador reconstituído tem de ser congelado antes da primeira utilização. A seguir, permanece estável até ao fim do prazo de validade.
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro e amostras de plasma com heparina devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Este kit é adequado para amostras de soro e plasma com heparina. A correlação foi estabelecida entre 23 amostras de soro e plasma com heparina dos mesmos pacientes: Plasma = 0,95 + 1,25 soro, R = 0,89.
- Se a análise não for realizada em 48 h, recomenda-se conservar a -20°C
- Após o descongelamento, as amostras de soro e plasma com heparina devem ser misturadas (Vortex) e, de seguida, centrifugadas.

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 da utilização, 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 reagente e amostra.
Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação.
Prepare uma curva de calibragem para cada análise, não utilize dados de análises prévias.

B. Procedimento

Operação de extracção:

- Rotule os tubos de vidro (12x75 mm) para extracção: 6 calibradores, 2 controlos e até 40 amostras em duplicata.
- Dispense 100 µl de cada calibrador, controlo ou amostra nos respectivos tubos.
- Adicione 0,5 ml de acetonitrilo a cada tubo.
- Misture durante 7 segundos com um vortex.
- Centrifugue durante 5 minutos à temperatura ambiente (a 800-1500 g).

Operação de calibragem:

- Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra e controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
- Adicione 100 µl de sobrenadante obtido após a operação de extracção aos tubos correspondentes. As pontas das pipetas devem estar saturadas com o sobrenadante correspondente antes de adicionar ao tubo.
- Dispense 400 µl de Tampão de Incubação para cada tubo, excepto aqueles para as contagens totais.
- Adicione 50 µl de marcador para cada tubo, incluindo as contagens totais.
- Incube durante 2 h à temperatura ambiente sob agitação (300-700 RPM).
- Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais).
- Lave duas vezes os tubos com 2 ml de Solução de Lavagem e aspire. Evite a formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
- Depois da lavagem, deixe os tubos na vertical durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
- Conte os tubos num contador 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 (%) =

Contagens (Calibrador ou amostra)

Contagens (calibrador Zero)

x100
3.

Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log, trace os valores (B/Bo(%)) para cada ponto de calibragem como uma função da concentração 25OH-Vit.D₃ em cada ponto, rejeitando os resultados aberrantes óbvios.
4.

Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibragem. Se o processamento dos resultados for automático, é recomendável um ajustamento de curvas de função logística de 4 parâmetros.
5.

Por interpolação dos valores das amostras (B/Bo(%)), determine as concentrações de 25OH-Vit.D₃ das amostras da curva de referência.
6.

Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de 25OH-Vit.D₃ (B0/T) sem rótulo deve ser verificada.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes servem apenas de exemplo e nunca devem ser utilizados em detrimento dos dados reais da curva de calibragem.

25OH-Vit.D ₃		Cpm	B/Bo x 100
Contagem Total		40301	-
Calibrador	0 ng/ml	23803	100 %
	3,0 ng/ml	20171	85 %
	9,0 ng/ml	16237	68 %
	20,0 ng/ml	12156	51 %
	65,0 ng/ml	7090	30 %
	130,0 ng/ml	5330	22 %

Nota: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

- A.

Limite de detecção

Foram analisados vinte calibradores zero, juntamente com um conjunto de outros calibradores. O limite de detecção, definido como a concentração aparente de 25OH-Vit.D₃ dois desvios padrão abaixo da média de contagem com zero ligações, foi de 1,2 ng/ml.
- B.

Especificidade

A percentagem de reacções cruzadas estimada por comparação com o rendimento da concentração com inibição de 50 % é, respectivamente, de:

Composto	Reacção cruzada (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₂	<0,01
Vitamin D3	<0,03
Vitamin D2	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	<0,8

* Como as concentrações de 1,25(OH)₂-Vit.D₃ são praticamente 1000 vezes inferiores às de 25-OH-Vit.D₃, esta reactividade cruzada é insignificante e não interfere neste ensaio de 25-OH-Vit.D₃.

O desempenho do ensaio não é afetado pela hemólise (5 g / L de hemoglobina testado) ou bilirrubinemia (0,25 g / L de bilirrubina testado).

C. Precisão

INTRA-ENSAIO				INTER-ENSAIO			
Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	C.V. (%)	Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Sensibilidade

TESTE DE RECUPERAÇÃO	
25OH-Vit.D ₃ adicionada (ng/ml)	Recuperação (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

TESTE DE DILUIÇÃO			
Diluição	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida. (ng/ml)	Recuperação (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

- E.

Atraso de tempo entre o último calibrador e a dispensa da amostra

Conforme demonstrado a seguir, os resultados das análises continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 15 e 30 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

ATRASO DE TEMPO			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
Amostra 1	9,5	9,2	10,1
Amostra 2	36,8	33,9	36,2

XIV. CONTROLO INTERNO DE QUALIDADE

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados 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 duas vezes.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplos das amostras devem basear-se nas Boas Práticas de Laboratório.

XV. Valores esperados

O estado alimentar, a raça, a estação e a idade afectam reconhecidamente os níveis normais de 25OH.Vit.D₃. Os valores esperados, a seguir não devem ser considerados como absolutos. DIASource fontes séricas avaliadas coletadas de 39 homens e 40 mulheres, saudáveis, de acordo com os valores de PTH, cálcio e albumina, da Europa Ocidental. A idade dos voluntários caiu dentro da faixa de 17-58 anos. Amostras foram coletadas durante os meses de dezembro de 2010 e janeiro de 2011. A média da população (n = 79) foi de 12,5 ng / mL, variando 4,1-28,7 ng / ml (com base em percentuais de 2,5% para 97,5%). Cada laboratório deve estabelecer seus próprios limites com base na sua população local.

A literatura recente tem sugerido os seguintes limites para a classificação de 25 OHVitamina D: Carência: 0-10 ng / mL; Insuficiência: 10-30 ng / mL; Normal: 30 a 150 ng / mL; Toxicidade:> 150 ng / mL.

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 administrado em seres humanos ou em animais.

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 qualquer 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 são provenientes 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 o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Durante a operação de lavagem, enxagúe com uma quantidade abundante de água corrente para evitar acumulações de azida.

Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não utilize as pipetas com o auxílio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas. 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 eliminado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. O cumprimento das regras básicas da radiossegurança fornece a protecção adequada.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS ml	CALIBRAD ORES ml	AMOSTRA(S) CONTROLO(S) ml
<u>EXTRACÇÃO</u> Calibradores Amostras/Controlos Acetonitrilo	- - -	0,1 - 0,5	- 0,1 0,5
Vortex Centrifugação	Vortex durante 7 segundos 5 minutos a 800 - 1500 g		
<u>INCUBACÃO</u> Sobrenadante de extracção Tampão de Incubação Marcador	- - 0,05	0,1 0,4 0,05	0,1 0,4 0,05
Incubação	2 horas à temperatura ambiente sob agitação (300-700 RPM).		
Separação Solução de lavagem Separação Solução de lavagem Separação	- - - -	aspirar 2.0 aspirar 2.0 Aspirar cuidadosamente	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

Nº do catálogo DIASource: KIP1961	Nº de P.I: 1700543/pt	Nº de revisão: 110328/1
--------------------------------------	--------------------------	----------------------------

Data da revisão : 2011-03-28

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την in vitro ποσοτική μέτρηση της 25OH-Vit.D3 σε ανθρώπινο ορό ή ηπαρινισμένο πλάσμα.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ 25OH-Vit.D3-Ria-CT της DIASource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP1961 : 96 εξετάσεις
- Γ. **Κατασκευάζεται από την:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)67 88.99.99 Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

A. Φυσιολογική λειτουργία της 25OH-Vit.D₃

25-υδροξυβιταμίνη D₃ (25OHD₃) είναι το κοινό όνομα της 9, 10-σεκοχολεστα-5, 7, 10(19)-τριενο-3β, 25-διόλης. Αυτό το στεκοστεροειδές παράγεται στο ήπαρ από 25-υδροξυλίωση της χοληκαλσιφερόλης ή της βιταμίνης D₃. Η 25OHD₃ είναι πρόδρομος για άλλους μεταβολίτες της βιταμίνης D και από μόνη της έχει περιορισμένη βιολογική δράση. Το πιο δραστικό παράγωγο είναι η 1α,25-υδροξυβιταμίνη D₃, που παράγεται στο νεφρό (ή τον πλακούντα) με 1α-υδροξυλίωση της 25OHD₃. Αυτό το ορμονικά ρυθμισμένο στεροειδές 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, οστεοπόρωσης ή οστεομαλακίας. Αυτή η ορμόνη της βιταμίνης D θα μπορούσε επίσης να είναι δραστική σε άλλους ιστούς υπεύθυνους για τη μεταφορά του ασβεστίου (πλακούντας, νεφρός, θηλαστικός αδένας, ...) και ενδοκρινείς αδένες (β-κύτταρα, παραθυρεοειδείς αδένες, ...). Η 25-υδροξυβιταμίνη D₃ είναι ένας κύριος πρόδρομος για τους μεταβολίτες.

B. Ρυθμιστικός μηχανισμός

Η παραγωγή της 25-υδροξυβιταμίνης D λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ παρότι και άλλοι ιστοί (έντερο, νεφρός) θα μπορούσαν επίσης να εκτελούν την ίδια υδροξυλίωση. Παρότι θα μπορούσε να υπάρχει κάποια αναδραστική αναστολή της 25-υδροξυβιταμίνης D στην ίδια την παραγωγή της, υψηλότερη διαθεσιμότητα του υποστρώματος (βιταμίνη D₃) έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη παραγωγή 25-υδροξυβιταμίνης D και υψηλότερες συγκεντρώσεις κυκλοφορούσας 25-υδροξυβιταμίνης D στο αίμα.

Γ. Κλινικές εφαρμογές

Ο προσδιορισμός αυτός είναι σημαντικός για τη διάγνωση έλλειψης, ανεπάρκειας ή δηλητηρίασης από βιταμίνη D.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Κατ' αρχήν, βαθμονομητές, υλικά ελέγχου και δείγματα (ορός ή ηπαρινισμένο πλάσμα) υποβάλλονται σε εκχύλιση με ακετονιτρίλιο. Μια σταθερή ποσότητα 25OH βιταμίνης D₃ σημασμένης με ¹²⁵I ανταγωνίζεται με την 25OH βιταμίνη D₃ είτε από τα εκχυλισμένα δείγματα, είτε από τα υλικά ελέγχου ή τους βαθμονομητές για σταθερή ποσότητα θέσεων ειδικών αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια πλαστικών σωληναρίων. Μετά από επώαση 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου, η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με 2 ml διαλύματος πλύσης και μετρώνται σε έναν απεριθμητή ακτίνων γ.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Ποσότητα	Χρωματι κός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι- 25OH-βιταμίνη.D₃	2 x 48	ροζ	Έτοιμο για χρήση
Ag ¹²⁵I I¹²⁵ 25OH-βιταμίνη.D₃	1 φιαλίδιο λυοφιλ. 160 kBq	κόκκινο	Ανασυστήστε αμέσως πριν τη χρήση, προσθέτοντας 6 ml του ρυθμιστικού διαλύματος
CAL 0 Βαθμονομητής 0: ορός αλόγου/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με γενταμικίνη	1 φιαλίδιο λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
CAL N ορός αλόγου/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με γενταμικίνη (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων)	5 φιαλίδια λυοφιλ.	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού
INC BUF Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης με αζίδιο του νατρίου <0,1%)	1 φιαλίδιο 45 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
TRACER BUF Αιθανολικό διάλυμα με αζίδιο του νατρίου <0,1%)	1 φιαλίδιο 7 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση
ACETONITRILE Ακετονιτρίλιο	1 φιαλίδιο 25 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Υλικά ελέγχου 1 2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλ.	ασημί	Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε βαθμονομητή 0 για την αραιώση δειγμάτων με τιμές πάνω από αυτήν του υψηλότερου βαθμονομητή πριν από το βήμα εκχύλισης. Δεν υπάρχει διαθέσιμο διεθνές υλικό αναφοράς.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl, 100 μl, 400 μl, 500 μl.
3. Αναμεικτής στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Υάλινα σωληνάρια (12x75 mm) για το βήμα της εκχύλισης.
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Συσκευή αναρρόφησης και πλύσης.
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απεριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).
9. Συσκευή φυγοκέντρισης στα 800-1500 g

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. **Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. **Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. **I¹²⁵ 25OH-Vit.D₃** : Ανασυστήστε με 6 ml του ρυθμιστικού διαλύματος.
- 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.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, τα υλικά ελέγχου παραμένουν σταθερά για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα και να διατηρούνται στους – 20° C για έως και 3 μήνες το ανώτερο.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Ο ανασυσταθείς ιχνηθέτης πρέπει να καταψύχεται μετά την πρώτη χρήση. Στη συνέχεια, είναι σταθερός μέχρι την ημερομηνία λήξης.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού και ηπαρινισμένου πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Αυτό το κιτ ενδείκνυται για δείγματα ορού και ηπαρινισμένου πλάσματος. Έχει καθιερωθεί συσχέτιση μεταξύ 23 δειγμάτων ορού και ηπαρινισμένου πλάσματος από τους ίδιους ασθενείς: πλάσμα = 0,95 + 1,25 ορού, R = 0,89.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 48 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Μετά την απόψυξη, τα δείγματα ορού και ηπαρινισμένου πλάσματος πρέπει να αναμειγνύονται (με στροβιλισμό) και στη συνέχεια να υποβάλλονται σε φυγοκέντριση.

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. Αναμείξτε 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

Βήμα εκχύλισης:

1. Σημάνετε τα υάλινα σωληνάρια (12x75 mm) για την εκχύλιση: 6 βαθμονομητές, 2 υλικά ελέγχου και έως 40 δείγματα εις διπλούν.
2. Διανείμετε 100 μl από κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου ή δείγμα στα αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Προσθέστε σε κάθε σωληνάριο 0,5 ml ακετονιτρίλιου.
4. Αναμείξτε επί 7 δευτερόλεπτα χρησιμοποιώντας αναμεικτή στροβιλισμού.
5. Φυγοκεντρίστε επί 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (στα 800-1500 g).

Βήμα επώασης:

1. Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
2. Προσθέστε 100 μl του υπερκειμένου που ελήφθη μετά το βήμα εκχύλισης στα αντίστοιχα σωληνάρια. Τα ρύγγη των πιπετών πρέπει να διαβρέχονται με το αντίστοιχο υπερκείμενο πριν την προσθήκη στο σωληνάριο.
3. Διανείμετε 400 μl από το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης σε κάθε σωληνάριο, εκτός από εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις.

4. Προσθέστε 50 μl από τον ιχνηθέτη σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις.
6. Επωάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (300-700 σ.α.λ.).
7. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
8. Πλύνετε δύο φορές τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφήστε. Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης.
9. Μετά την πλύση, αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
10. Υποβάλλετε σε μέτρηση τα σωληνάρια σε απεριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

$$B0 \times 100 = \frac{\text{ΜετρήσειV (ΒαgμονομητήV ήδείγμα)}}{\text{ΜετρήσειV (Μhdenikόν βαgμονομητήV)}} \times 100$$

3. Με χρήση ημιλογαριθμικού ή logit-log χαρτιού γραφήματος 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0 x 100) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 25OH.D₃ για κάθε σημείο βαθμονομητή και 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 παρεμβολή των τιμών των δειγμάτων (B/B0 x 100), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις 25OH.D₃ των δειγμάτων από την καμπύλη αναφοράς.
6. Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης 25OH.D₃ (B0/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

25OH-Vit.D ₃		cpm	B/B ₀ x 100
Συνολική μέτρηση		40301	-
Βαθμονομητής	0 ng/ml	23803	100 %
	3,0 ng/ml	20171	85 %
	9,0 ng/ml	16237	68 %
	20,0 ng/ml	12156	51 %
	65,0 ng/ml	7090	30 %
	130,0 ng/ml	5330	22 %

Σημείωση: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. Όριο ανίχνευσης

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση 25OH-βιταμίνης D₃ δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 1,2 ng/ml.
- B. Ειδικότητα

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

Ένωση	Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (%)
25OH- βιταμίνη D ₃	100
25OH- βιταμίνη D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ - βιταμίνη.D ₃	89*
1,25(OH) ₂ - βιταμίνη.D ₂	<0,01
βιταμίνη D3	<0,03
βιταμίνη D2	<0,03
24,25(OH) ₂ - βιταμίνη.D ₃	<0,8

* Επειδή οι συγκεντρώσεις της 1,25(OH)₂-Vit.D₃ είναι σχεδόν 1000 φορές χαμηλότερες από την 25-OH-Vit.D₃, αυτή η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα

είναι άνευ σημασίας και δεν επιδρά σ' αυτόν τον προσδιορισμό της 25-OH-Vit.D₃.

Η απόδοση του προσδιορισμού δεν επηρεάζεται από την αιμόλυση (ελέγχθηκε με 5 g/L αιμοσφαιρίνης) ή χολερυθριναιμία (ελέγχθηκε με 0,25 g/L χολερυθρίνης).

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Δείγμα	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Δείγμα	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

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

Δ. Ορθότητα

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ	
Προσθεθείσα 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Αραίωση δείγματος	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

- E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 15 και 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
δείγμα 1	9,5	9,2	10,1
δείγμα 2	36,8	33,9	36,2

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για το υλικό ελέγχου 1 ή/και το υλικό 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, τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα. Μην καταψύχετε-αποψύχετε περισσότερο από δύο φορές.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ANAMENOMENES TIMES

Η διατροφή, η φυλή, η εποχή και η ηλικία είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα φυσιολογικά επίπεδα της 25OH.Vit.D₃. Οι αναμενόμενες τιμές που αναφέρονται παρακάτω δεν θα πρέπει να θεωρούνται απόλυτες. Η DIAsource αξιολόγησε τους ορούς που συλλέχθηκαν από 39 άνδρες και 40 γυναίκες, υγιείς ως προς τις τιμές Ca, PTH και λευκοματίνης, από τη Δυτική Ευρώπη. Το ηλικιακό εύρος των εθελοντών ήταν 17 - 58 έτη. Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των μηνών Δεκέμβριος 2010 και Ιανουάριος 2011. Ο μέσος όρος του πληθυσμού (n = 79) ήταν 12,5 ng/mL, με εύρος μεταξύ 4,1 και 28,7 ng/ml (με βάση τις εκατοστιαίες αναλογίες 2,5 % έως 97,5 %). Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώνει το δικό του εύρος με βάση τον εκάστοτε τοπικό πληθυσμό.

Η πρόσφατη βιβλιογραφία συνιστά τα ακόλουθα εύρη για την ταξινόμηση της κατάστασης της 25 OH βιταμίνης D: Έλλειψη: 0-10 ng/mL, Ανεπάρκεια: 10-30 ng/mL, Επάρκεια: 30 έως 150 ng/mL, Τοξίνωση: >150 ng/mL.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια
Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.
Το κιτ αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (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.
Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ 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 δυνητικών μολυσματικά.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίζει 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 συσσώρευσης 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 αναλώσιμα γάντια. 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 ραδιοϊσότοπων.
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.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ml	ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ ml	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΥΛΙΚΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ml
ΕΚΧΥΛΙΣΗ Βαθμονομητές Δείγματα/Υλικά ελέγχου Ακετονιτρίλιο	- - -	0,1 - 0,5	- 0,1 0,5
Στροβιλισμός Φυγοκέντριση	Στροβιλίστε για 7 δευτερόλεπτα 5 λεπτά στα 800-1500 g		
ΕΠΩΑΣΗ Υπερκειμένο εκχύλισης Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης Ιχνηθέτης	- - 0,05	0,1 0,4 0,05	0,1 0,4 0,05
Επώαση	2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (300-700 σ.α.λ.).		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης Διαχωρισμός	- - - - -	αναρρόφηση 2,0 αναρρόφηση 2,0 προσεκτική αναρρόφηση	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP1961	Αριθμός P.I.: 1700543/el	Αρ. αναθεώρησης: 110328/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro poziomu 25OH-witaminy D₃ w ludzkiej surowicy i heparynizowanym osoczu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa:** DIAsource 25OH-VIT.D3-RIA-CT
- B. Numer katalogowy:** KIP1961 : 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)67 88.99.99

Fax: +32 (0)67 88.99.96

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Właściwości fizjologiczne 25OH-witaminy D₃

Witamina D₃ jest potoczną nazwą cholekalcyferolu zawierającego grupę OH w pozycji 25 (25OHD₃). Ten sekosteroid jest wytwarzany w wątrobie poprzez hydroksylację w pozycji 25. cholekalcyferolu (witaminy D₃). 25OHD₃ jest prekursorem innych metabolitów witaminy D, a sama w sobie przejawia niewielką aktywność biologiczną. Najbardziej aktywną pochodną jest 1 α ,25-hydroksyvitamina D₃ wytwarzana w nerkach (lub w łożysku) w wyniku hydroksylacji 25OHD₃ w pozycji 1 α . Ten steroid, którego produkcja jest regulowana hormonalnie, nasila przyswajanie zarówno wapnia, jak i fosforu. Stymuluje również resorpcję kości oraz mineralizację, dzięki czemu zapobiega rozwojowi krzywicy, osteoporozy lub osteomalacji. Witamina D jako hormon może również wykazywać aktywność w innych tkankach odpowiedzialnych za transport wapnia (łożysko, nerki, gruczoł sutkowy i inne) oraz w gruczołach endokrynowych (komórki beta trzustki, przystarczycy i inne). 25-hydroksyvitamina D₃ jest głównym prekursorem metabolitów.

B. Mechanizm regulacyjny

Do wytwarzania 25-hydroksyvitaminy D dochodzi głównie w wątrobie, chociaż inne tkanki (jelito, nerki) mogą wykonywać taką samą hydroksylację. Chociaż może dojść do własnego hamowania zwrotnego 25-hydroksyvitaminy D w wyniku własnej produkcji, większa dostępność substratu (witaminy D₃) prowadzi do zwiększenia produkcji 25-hydroksyvitaminy D i wyższych stężeń 25-hydroksyvitaminy D we krwi.

C. Zastosowania kliniczne

To oznaczenie odgrywa rolę w rozpoznawaniu braku, niedoboru lub zatrucia witaminą D.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Przy wykorzystaniu pierwszych kalibratorów materiały kontrolne i próbki (surowicy lub heparynizowanego osocza) są ekstrahowane z acetonitrem. Ustalona ilość 25OH-witaminy D₃ oznakowanej ¹²⁵I współzawodniczy z 25OH-witaminą D₃ pochodzącą z ekstrahowanych próbek, kontroli lub kalibratorów o ustaloną liczbę miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na dolnej lub wewnętrznej powierzchni plastikowych próbek. Po dwugodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, w wyniku aspiracji dochodzi do zatrzymania reakcji kompetytywnej. Następnie próbówki są płukane przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego i zliczane w liczniku gamma.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja
Próbówki opłaskzczone anty-25OH-VIT.D3	2 x 48	różowy	Gotowe do zastosowania
Ag ¹²⁵I ¹²⁵I 25OH-Vit.D₃	1 fiolka materiał liofiliz. 160 kBq	czerwony	Rekonstruować doraźnie dodając 6 buforu znacznika
CAL 0 Kalibrator 0: surowica końska/bufor fosforanowy z gentamycyną	1 fiolka materiał liofilizowany	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
CAL N Kalibratory - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) surowica końska/bufor fosforanowy z gentamycyną	5 fiolek materiał liofilizowany	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
INC BUF Bufor inkubacyjny z zawartością azydku sodowego (<0,1%)	1 fiolka 45 ml	czarny	Gotowy do zastosowania
TRACER BUF Roztwór etanolowy z zawartością azydku sodowego (<0,1%)	1 fiolka 7 ml	czerwony	Gotowy do zastosowania
ACETONITRILE Acetonitril	1 fiolka 25 ml	czarny	Gotowy do zastosowania
WASH SOLN CONC Roztwór płuczący (TRIS HCl)	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne)
CONTROL N Kontrolne - N = od 1 do 2 w surowicy ludzkiej z tymolem	2 fiolek materiał liofilizowany	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej

Uwaga: W przypadku wartości powyżej najwyższego kalibratora, do rozcieńczania próbek należy wykorzystać Kalibrator 0 przed procesem ekstrakcji. Nie jest dostępny żaden międzynarodowy materiał referencyjny.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

- Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:
- Woda destylowana
 - Pipety do dozowania: 50 µl, 100 µl, 400 µl i 500 µl
 - Mieszadło wirowe
 - Mieszadło magnetyczne
 - Próbówki szklane (12x75 mm) do procesu ekstrakcji.
 - Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
 - Układ do aspiracji (opcjonalnie)
 - Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%)
 - Wirówka działająca przy 800-1500 g

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Rekonstruować kalibratory przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- B. Kontrolne:** Kontrolne należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- C. I¹²⁵ 25OH-Vit.D₃:** Rekonstruować przy pomocy 6 ml buforu znacznika.
- D. Roboczy roztwór płuczający:** 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 płuczający należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji, kalibratory i kontrole zachowują stabilność przez jeden tydzień w temperaturze od 2 do 8°C. W razie konieczności dłuższego przechowywania należy przechowywać niewielkie objętości materiałów w temperaturze -20°C przez maksymalnie 3 miesiące.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Rekonstruowany wskaźnik powinien być zamrożony po pierwszym wykorzystaniu. Wówczas zachowuje stabilność do daty ważności.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy i heparynizowanego osocza muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Zestaw ten jest odpowiedni w przypadku próbek surowicy i heparynizowanego osocza. Określona została korelacja pomiędzy 23 próbkami surowicy i heparynizowanego osocza od tych samych pacjentów: osocze = 0,95 surowica + 1,25, R = 0,89.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 48 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Po rozmrożeniu próbki surowicy i heparynizowanego osocza powinny być wymieszane (mieszadło wirowe), a następnie odwirowane.

X. PROCEDURA

- A. Uwagi dotyczące obsługi**
Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie podanej 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

- Proces ekstrakcji:**
- Oznaczyć podwójnie próbówki szklane (12x75 mm) do ekstrakcji: 6 kalibratorów, 2 kontrole i do 40 próbek.
 - Dozować 100 µl każdego kalibratora, kontroli lub próbki do odpowiednich próbek.
 - Dodać 0,5 ml acetonitrilu do każdej próbówki.
 - Mieszać przez 7 sekund przy pomocy mieszadła wirowego.
 - Wirować przez 5 minut w temperaturze pokojowej (800-1500 g).

Inkubacja:

- Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaskzczone próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe próbówki.
- Dodać 100 µl supernatantu uzyskanego po ekstrakcji do odpowiednich próbek. Końcówki pipet powinny być wysyczone odpowiednim supernatantem przed dozowaniem do próbek.
- Dozować 400 µl buforu inkubacyjnego do każdej próbówki, z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania.
- Do każdej próbówki, w tym do próbek nieopłaskzczonych do całkowitego zliczania, dodać po 50 µl 25OH-VIT.D3 oznakowanego jodem¹²⁵.

- 5. Inkubować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, nieprzerwanie mieszając (300-700 RPM).
- 6. Aspirować zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania).
- 7. Przepłukać probówki dwukrotnie przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego i aspirować. W trakcie dodawania roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
- 8. Po płukaniu należy pozostawić probówki w pozycji ku górze przez dwie minuty, a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
- 9. 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:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń(dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń(dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

- 3. Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B0(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia 25OH-VIT.D3 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 25OH-VIT.D3 w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
- 6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego 25OH-VIT.D3 (B0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

25OH-Vit.D ₃		cpm	B/Bo x 100
Zliczanie całkowite		40301	-
Kalibrator	0 ng/ml	23803	100 %
	3,0 ng/ml	20171	85 %
	9,0 ng/ml	16237	68 %
	20,0 ng/ml	12156	51 %
	65,0 ng/ml	7090	30 %
	130,0 ng/ml	5330	22 %

Uwaga: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyleń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 1,2 ng/ml.

B. Swoistość

Odsetki reaktywności krzyżowej uzyskane przez porównanie stężenia uzyskującego 50% hamowanie są następujące:

Składnik	Reaktywność krzyżowa (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₂	<0,01
Vitamin D3	<0,03
Vitamin D2	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	<0,8

* Ponieważ stężenia 1,25(OH)₂-witaminy D₃ są praktycznie 1000 razy niższe w porównaniu do 25-OH-witaminy D₃, ta reaktywność krzyżowa jest nieznacząca i nie interferuje w tym oznaczeniu 25-OH-witaminy D₃.

Na charakterystykę kliniczną testu nie ma wpływu hemoliza (zbadano dla 5 g/l hemoglobiny) ani bilirubinemia (zbadano dla 0,25 g/l bilirubiny).

C. Precyzja

PRECYZJA W SERII

PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Surowi ca	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowi ca	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	9 9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B		13,1 ± 1,0	7,3

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU	
dodano 25OH-VIT.D3 (ng/ml)	Odzysk (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

BADANIE ROZCIĘNCZENIA			
Rozcieńczeni e	Stęż. teoretyczne (ng/ml)	Stęż. zmierzone (ng/ml)	Odzysk (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych probówek minęło 15 - 30 minut.

OPÓŹNIENIE			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
S 1	9,5	9,2	10,1
S 2	36,8	33,9	36,2

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 próbki 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. WARTOŚCI OCZEKIWANE

Zawartość składników pokarmowych, rasa, pora roku i wiek wpływają na normalne poziomy 25OH-witaminy D₃.

Przedstawionych tu wartości oczekiwanych nie należy traktować jako wartości absolutnych. DIAsource oceniło próbki surowicy pobrane od 39 mężczyzn i 40 kobiet zamieszkałych w zachodniej Europie, zdrowych pod kątem oznaczeń Ca, PTH i albumin. Wiek ochotników mieścił się w zakresie 17 - 58 lat. Próbkę pobierano w okresie grudnia 2010 i stycznia 2011. Średnia dla populacji wyniosła (n = 79) 12,5 ng/ml dla zakresu od 4,1 do 28,7 ng/ml. (od 2,5 % do 97,5 % percentyla).

Każde laboratorium powinno opracować własne wartości na podstawie lokalnej populacji klinicznej.

W aktualnej literaturze sugerowane są następujące zakresy klasyfikacji statusu witaminy D 25 OH: brak: 0-10 ng/ml; niedobór: 10-30 ng/ml; poziom wystarczający: 30 do 150 ng/ml; toksyczność: >150 ng/ml.

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 anty-HCV, anty-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. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ µl	KALIBRATORY µl	PRÓBK KONTROLE µl
<u>EKSTRAKCJA</u> Kalibratory Próbki/Kontrole Acetonitril	- - -	100 - 500	- 100 500
Mieszadło wirowe Wirowanie	Wirować przez 7 sekund 5 minut przy 800-1500 g		
<u>INKUBACJA</u> Supernatant w ekstrakcji Bufor inkubacyjny Znacznik izotopowy	- - 50	100 400 50	100 400 50
Inkubacja	2 godziny w temperaturze pokojowej nieprzerwanie mieszając (300-700 RPM).		
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie	-	Aspiracja 2,0 ml Aspiracja 2,0 ml Ostrożna aspiracja	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIAsource KIP 1961	Numer P.I. 1700543/pl	Nr aktualizacji : 110328/1
-------------------------------------	--------------------------	-------------------------------

Data wydania : 2011-03-28



Прочетете целия протокол преди употреба

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. УПОТРЕБА

Радиоимунно изследване (RIA) за количествено измерване *in vitro* на съдържанието на човешки 25OH-Вит.D3 в серум и хепаринова плазма.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource 25OH-VIT.D3-RIA-CT Kit
- B. Каталоген номер: KIP1961: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue De l'Industrie 8 B-1400 Nivelles, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)67 88.99.99 Факс: +32 (0)67 88.99.96

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Физиологична функция на 25OH-Витамин D₃

25-хидроксивитамин D₃ (25OHD₃) е разговорното кратко название на 9, 10-секохолеста-5, 7, 10(19)-триен-3бета, 25-диол. Този секостероид се произвежда в черния дроб чрез 25-хидроксилация на холекалциферола или Витамин D₃. 25OHD₃ е прекурсор на други метаболити на Витамин D и притежава само ограничена биологична активност. Най-активният дериват е 1 α ,25- хидроксивитамин D₃, произвеждан в бъбреците (или плацентата) чрез 1 α -хидроксилация на 25OHD₃. Този хормонално регулиран стероид стимулира чревната абсорбция на калция и фосфора. Той също така стимулира минералната резорбция и минерализацията на костите, като по този начин препятства развитието на рахит, остеопороза или остеомаляция. Този Витамин D хормон може да бъде активен и в други тъкани, осъществяващи пренасянето на калций (плацента, бъбреци, млечна жлеза и т.н.), и в ендокринните жлези (бета клетки, паратиреоидните жлези и т.н.). 25- хидроксивитамин D₃ е основният прекурсор за получаване на метаболитите от групата на вит. D.

B. Регулаторен механизъм

25-хидроксивитамин D се произвежда главно в черния дроб, въпреки че същата хидроксилация може да се извършва и в други тъкани (черва, бъбреци). Въпреки че може да има някаква степен на регулиране чрез обратна връзка по отношение стимулиране или инхибиране производството на 25-хидроксивитамин D, по-голямото количество субстрат (Витамин D₃) води до по-голямо количество на произвеждания 25-хидроксивитамин D, както и до по-големи концентрации на циркулиращия в кръвта 25-хидроксивитамин D.

B. Клинични приложения

Това изследване е от съществено значение при диагностиката на дефицит, недостатъчност или интоксикация с Витамин D.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

Първо се екстрахират с помощта на ацетонитрил калибратори, контроли и проби (серумни или от хепаринова плазма).
Определено количество натоварен с ¹²⁵I 25ОН Витамин D₃, се конкурира с 25ОН Витамин D₃ от екстрахираните проби, контроли или калибратори за определено количество центрове на специфични антитела, имобилизирани на долната и вътрешната повърхност на пластмасовите епруветки.
След двучасова инкубация при стайна температура конкурентната реакция приключва с аспирация. След това епруветките се промиват с 2 ml измиващ разтвор и се извършва броене с помощта на гама брояч.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти		Количество 96 теста	Цветен код	Приготвяне			
 Епруветки, покрити с анти-25ОН-Витамин.D₃		2 x 48	розов	Готов за употреба			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> Натоварен с I¹²⁵ 25ОН-Витамин.D₃		Ag	¹²⁵ I	1 флакон Лиофилизиран 160 kBq	червен	Реконституирайте екстемпорално чрез добавяне на 6 ml от от трейсърния буфер	
Ag	¹²⁵ I						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Калибратор 0: конски серум/фосфатен буфер с гентамицин		CAL	0	1 флакон Лиофилизиран	жълт	Добавете 0,5 ml дестилирана вода	
CAL	0						
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Калибратор - N = 1 до 5 в конски серум/фосфатен буфер с гентамицин (виж точните стойности на етикета на флаконите)		CAL	N	5 флакона лиофилизирани	жълт	Добавете 0,5 ml дестилирана вода	
CAL	N						
<table border="1"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Инкубационен буфер с натриев азид (< 0,1%)		INC	BUF	1 флакон 45 ml	черен	Готов за употреба	
INC	BUF						
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Етанолов разтвор с натриев азид (< 0,1%)		TRACER	BUF	1 флакон 7 ml	червен	Готов за употреба	
TRACER	BUF						
<table border="1"><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table> Ацетонитрил		ACETONITRILE	1 флакон 25 ml	черен	Готов за употреба		
ACETONITRILE							
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Измиващ разтвор (TRIS-HCl)		WASH	SOLN	CONC	1 флакон 10 ml	кафяв	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
WASH	SOLN	CONC					
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Контроли 1 и 2 в човешки серум с тимол		CONTROL	N	2 флакона лиофилизирани	сребърен	Добавете 0,5 ml дестилирана вода	
CONTROL	N						

Забележка: За разреждане на пробите със стойности над най-високите стойности на калибратора преди екстракцията използвайте калибратор 0. Няма наличен материал за международни референции.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

- Дестилирана вода
- Пипети от: 50 µl, 100 µl, 400 µl и 500 µl
- Завихрящ смесител
- Магнитен сепаратор
- Съгледени епруветки (12x75 mm) за етапа екстракция.
- 5 ml автоматична спринцовка (тип Corgwall) за измиване
- Аспирационна система (по избор).
- Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ¹²⁵I (минимален капацитет от 70%)
- Центрофуга, работеща с 800-1500 g

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- A. Калибратори** : Реконституирайте калибраторите с 0,5 ml дестилирана вода.
- Б. Контроли: Реконституирайте** контролите с 0,5 ml дестилирана вода.
- В. ¹²⁵I 25ОН-Вит.D₃** : Реконституирайте с 6 ml от трейсърния буфер.
- Г. Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 7 дни при температури 2-8°C. За по-дълги срокове на съхранение, се определя кратно и се съхранява при температура -20 °C за максимум 3 месеца.
- Пряко приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- Реконституираният трейсър трябва да бъде замразен след първата употреба. След това той остава стабилен до изтичане на срока на годност.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът и хепариновата плазма трябва да се съхраняват при температури 2-8°C.
- Този кит е подходящ за серумни проби и проби от хепаринова плазма. Установена е корелация между 23 серумни проби и проби от хепаринова плазма от някои пациенти: плазма = 0,95 серум + 1,25, R = 0,89.
- Ако тестът не се направи в рамките на 48 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- След размразяване серумните проби и пробите от хепаринова плазма трябва да се смесят (в завихрящия смесител), след което да се центрофугират.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки
Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

Етап екстракция:

- Съгледени епруветки с етикет (12x75 mm) за екстракция: 6 калибратора, 2 контроли и до 40 проби, съответно по 2 броя.
- Разпределете 100 µl от всеки калибратор, контрола или проба в съответните епруветки.
- Към всяка епруветка добавете 0,5 ml ацетонитрил.
- Смесете в продължение на 7 секунди в завихрящ смесител.
- Центрофугируйте в продължение на 5 минути на стайна температура (при 800-1500 g).

Етап инкубация:

- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- Добавете 100 µl от получения супернатант след етапа екстракция в съответните епруветки. Накрайниците на пипетите трябва да се на-киснат със съответния супернатант преди добавяне към епруветката.
- Разпределете 400 µl инкубационен буфер във всяка епруветка, с из-ключение на тези, предвидени за определяне на общия брой импулси.

4. Добавете 50 µl трейсър към всяка епруветка, включително към тези, предвидени за определяне на общия брой импулси.
5. Инкубирайте в продължение на два часа при стайна температура и при разбъркване (300-700 оборота/минута).
6. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (с изключение на тези, предвидени за определяне на общия брой импулси).
7. Промийте епруветките двукратно с 2 ml измиваш разтвор и аспирирайте. Избягвайте разпенването при добавяне на измивашия разтвор.
8. След измиване оставете епруветките в изправено положение за около две минути и аспирирайте останалите капки течност.
9. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
2. Изчислете свързващата радиоактивност като процент от свързването, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула :
3. Използвайки 3 циклична семи-логаритмична или logit-log графична хартия, нанесете (B/B0(%)) стойностите за всяка калибрационна точка като функция на 25ОН.D3 концентрацията на всяка калибрационна точка. Отхвърлете очевидните отклонения..

$$B/B0 \text{ (\%)} = \frac{\text{брой (Калибратор и проба)}}{\text{брой (Нулев Калибратор)}} \times 100$$

4. Компютърно асистираните методи също могат да бъдат използвани, за да се построи калибрационната крива. Ако се използва автоматичен метод на обработка на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
5. Чрез интерполация на (B/B0 (%)) стойностите от пробата се определят 25ОН.D3 концентрациите на пробите от калибрационната крива.
6. Процентът на общото проследяващо вещество, свързано при липса на ненатоварен 25ОН.D3 (B0/T), трябва да се провери за всяко изследване.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

25ОН-Vit.D ₃		срп	B/Bo x 100
Калибратор	Общ брой	40301	-
	0 ng/ml	23803	100 %
	3,0 ng/ml	20171	85 %
	9,0 ng/ml	16237	68 %
	20,0 ng/ml	12156	51 %
	65,0 ng/ml	7090	30 %
	130,0 ng/ml	5330	22 %

Забележка: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 1,2 ng/ml.

Б. Специфичност

Процентите на свързване, определени чрез сравнение на концентрацията, водеща до 50 % инхибиране, са съответно:

Съединение	Кръстосана реактивност (%)
25ОН- Витамин D ₃	100
25ОН- Витамин D ₂	<0,3
1,25(ОН) ₂ - Витамин.D ₃	89*
1,25(ОН) ₂ - Витамин.D ₂	<0,01
Витамин D ₃	<0,03
Витамин D ₂	<0,03
24,25(ОН) ₂ - Витамин.D ₃	<0,8

* Тъй като концентрациите на 1,25(ОН)₂-Вит.D₃ са практически 1000 пъти по-ниски от тези на 25-ОН-Вит.D₃, тази кръстосана реактивност е

незначителна и не оказва влияние върху резултатите от това изследване на 25-ОН-Вит.D₃.

Осъществяването на изпитването не се влияе от хемолиза (тестувано с 5 g/L хемоглобин) или билирубинемия (тестувано с 0,25 g/L билирубин).

В. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО				МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО			
Серум	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Серум	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

Г. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ	
добавен 25ОН-Vit.D ₃ (ng/ml)	Възстановен (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ			
Разреждане	Теоретична концентрация (ng/ml)	Измерена концентрация (ng/ml)	Възстановен (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

Д. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 15 и 30 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

Закъснение			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
пробата 1	9,5	9,2	10,1
пробата 2	36,8	33,9	36,2

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XV. ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

Известно е, че нормалните нива на 25ОН.Вит.D₃ се влияят от хранителния режим, спортуването, годишния сезон и възрастта. Дадените по-долу очаквани стойности не трябва да се разглеждат като абсолютни. DIsource извърши оценка на серум, взет от 39 мъже и 40 жени, здрави по отношение на стойностите на Са, РТН и албумин, от Западна Европа. Възрастта на доброволците попада в границите 17 - 58 години. Пробите са взети в периода декември 2010 г. и януари 2011 г. Средната стойност за популацията (n = 79) беше 12,5 ng/mL, в интервала от 4,1 до 28,7 ng/ml (на базата на 2,5 % до 97,5 %-ни персентили).

Всяка лаборатория трябва да определи своя собствен интервал, валиден за съответното местно население.

Според последните литературни данни се предполагат следните интервали за класификацията на статуса на 25 ОН витамин D: дефицит: 0-10 ng/mL; недостатъчност: 10-30 ng/mL; достатъчно количество: 30 до 150 ng/mL; токсичност: >150 ng/mL.

XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35,5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.

Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ ml	КАЛИБРАТОРИ ml	ПРОБА (II) КОНТРОЛИ ml
<u>ЕКСТРАКЦИЯ</u>			
Калибратори	-	0,1	-
Проби, контроли	-	-	0,1
Ацетонитрил	-	0,5	0,5
Завихрящ смесител Центрофуга	Оставете в завихрящ смесител за 7 секунди 5 минути при 800-1500 g		
<u>ИНКУБАЦИЯ</u>			
Екстрахиран супернатант	-	0,1	0,1
Инкубационен буфер	-	0,4	0,4
Трейсър	0,05	0,05	0,05
Инкубация	2 часа на стайна температура при разбъркване (300-700 оборота/минута).		
Сепарация	-	аспирирайте	
Измиващ разтвор	-	2,0	
Сепарация	-	аспирирайте	
Измиващ разтвор	-	2,0	
Сепарация	-	Аспирирайте внимателно	
Броење	Отчетете епруветките за 60 секунди		

DIASource каталог номер: KIP1961	P.I. номер: 1700543/bu	Номер на ревизия: 110328/1
-------------------------------------	---------------------------	-------------------------------

Дата на ревизия: 2011-03-28



Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

Immunradiometriás eljárás humán szérum és heparinplazma 25OH-D₃-vitamin-tartalmának in vitro mennyiségi meghatározására.

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

- A. **Bejegyzett név:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Reagenskészlet
- B. **Katalógusszám:** KIP1961 : 96 vizsgálat
- C. **Gyártó :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:

Tel : +32 (0)67 88.99.99

Fax : +32 (0)67 88.99.96

III. KLINIKAI HÁTTÉR

A. A 25OH-D₃ élettani szerepe

A 25-hidroxi-D₃-vitamin (25OH-D₃) a 9,10-seco-5,7,10 (19)-kolesztatrién-3β,25-diol hétköznapi neve. Ez a secoszteroid a májban keletkezik a kolekalciferol, más néven D₃ vitamin 25-hidroxilációja során. A 25OH-D₃ más D-vitamin anyagcseretermékek előanyagaként szolgál, saját biológiai aktivitása csekély. Legaktívabb származéka az 1α,25-dihidroxi-D₃ vitamin, amit a vesék (és a méhlepény) termelnek a 25OH-D₃ 1α-hidroxilációjával. Ez a hormonális szabályozás alatt álló szteroid serkenti a kalcium és a foszfor felszívódását a tápcsatornából. Fokozza a csontok reszorpcióját és mineralizációját is, ezáltal pedig megakadályozza angolkór kialakulását, valamint a csontlágylást és a csonttritkulást. Aktív ez a hormon hatású D-vitamin más, a kalcium szállításáért felelős szövetekben (méhlepény, vesék, tejmirigyek, stb.), és endokrin mirigyekben (béta-sejtek, mellékpajzsmirigyek, stb.) is. Ezekben a szövetekben is a 25-hidroxi-D₃ vitamin szolgál az anyagcseretermékek egyik fő előanyagaként.

B. Szabályozó folyamatok

A 25OH-D₃ jelentős részben a májban termelődik, azonban más szövetekben (bélcsatorna, vese) is zajlik hasonló hidroxiláció. Bár lehet, hogy a 25OH-D₃ bizonyos mértékben negatív visszacsatolással hat saját termelődésére, a nagy mennyiségben rendelkezésre álló szubsztrát (D₃-vitamin) fokozza a 25OH-D₃-termelést és növeli a vérben keringő 25OH-D₃ szintjét.

C. Klinikai felhasználás

A vizsgálat D-vitamin hiány, illetve túladagolás diagnosztizálása szempontjából fontos.

IV. A MÓDSZER ELVE

Először a kalibrátorokat, kontrollokat és a mintákat (vérsavó vagy heparin vérplazma) acetonitrilrel kell kezelni. Ismert mennyiségű ¹²⁵I-dal jelölt 25OH-D3 verseng a mintában, kontrollokbán vagy a kalibrátorokban található 25OH-D3-mal a csövek alsó részének belső felületére rögzített ismert mennyiségű specifikus ellenanyag kötőhelyeiért. A csöveket két órán át szobahőmérsékleten kell inkubálni, majd a folyadékot el kell távolítani. Ekkor a kompetitív reakció leáll. A csöveket ezután át kell mosni 2 ml hígított mosóoldattal. Végül a radioaktivitás gamma-sugármérővel mérhető.

V. A REAGENSKÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség 96 mintához	Szín	Feloldás
25-hidroxi-D₃-vitaminnal borított csövek	2 x 48	rózsaszín	Használatra kész
Ag ¹²⁵I ¹²⁵I-dal jelölt 25-hidroxi-D₃-vitamin (tracer)	1 ampulla liofilizált 240 kBq	piros	Ideiglenesen oldja fel, 6 ml nyomjelzőizotóp-hígító puffer hozzáadásával
CAL 0 Nulla kalibrátor: lószérum/gentamicines foszfátpuffer	1 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet
CAL N Kalibrátorok (1 – 5): lószérum/gentamicines foszfátpuffer (a pontos értékeket l. az ampullák címkéin)	5 ampulla liofilizált	sárga	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet
INC BUF Inkubációs puffer nátrium-aziddal (<0,1%)	1 ampulla 45 ml	fekete	Használatra kész
TRACER BUF Etanolos oldat, nátrium-aziddal (<0,1%)	1 ampulla 7 ml	piros	Használatra kész
ACETONITRIL Acetonitril	1 ampulla 25 ml	fekete	Használatra kész
WASH SOLN CONC Mosóoldat	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa 70 x desztillált vízzel (használjon mágneses keverőt).
CONTROL N A kontroll 1. és 2. gentamicin tartalmú timolban	2 ampulla liofilizált	ezüst	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet

Megjegyzés : A legnagyobb kalibrátornál magasabb 25OH-D3-koncentrációjú mintákat az acetonitriles kezelés előtt hígítsa a nulla kalibrátorral. Nem áll rendelkezésre nemzetközi referencia anyag.

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

A következő eszközöket a készlet nem tartalmazza, de szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:

- 1. Desztillált víz
- 2. Pipetták: 50 µl, 100 µl, 400 µl és 500 µl beméréséhez.
- 3. Vortex
- 4. Mágneses keverő
- 5. Üveg kémcsövek (12x75 mm) az acetonitriles kivonáshoz.
- 6. 5 ml automata fecskendő (Cornwall) a mosáshoz
- 7. Vízlégszivattyú és mosókészülék
- 8. Bármely, ¹²⁵I mérésére alkalmas gamma-sugármérő (minimális hozam 70%).
- 9. Centrifuga (800-1500 g)

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- A. **Kalibrátorok** : Oldja fel a kalibrátorokat 0,5 ml desztillált vízben
- B. **Kontrollok** Oldja fel a kontrollokat 0,5 ml desztillált vízben.
- C. **¹²⁵I-25OH-D3**: Oldja fel 6 ml nyomjelzőizotóp-hígító pufferben.
- D. **Hígított mosóoldat**: Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (70x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagensek 2-8°C-on tárolva a címken feltüntetett időpontig eltarthatók.
- Újraoldás után a kalibrátorok és kontrollok egy hétig stabilak +2 °C és +8 °C között. Ha tovább tárolandó, akkor szét kell osztani, majd legfeljebb 3 hónapig -20 °C-on kell tárolni.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- A feloldott tracert az első használat után fagyassza le. Ezután a lejárati idejéig eltartható.
- A reagensek fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megromlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- A szérum- és heparinplazmamintákat +2 °C és +8 °C közötti hőmérsékleten kell tárolni.
- Ez a kit mind szérum-, mind heparinplazmaminták esetében alkalmazható. A korreláció kialakítására az ugyanazoktól a betegektől származó 23 szérum- és heparinplazmaminta között került sor: plazma = 0,95 szérum + 1,25, R = 0,89.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 48 órán belül, ajánlott a mintákat -20°C-on tárolni.
- A vérsavó vagy heparin vérplazma mintákat felolvasztás után keverje meg (vortex), majd centrifugálja le.

X. ELJÁRÁS

A. Tudnivalók

Ne használja a reagenseket a lejárati idejükön túl. Ne keverjen össze eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat. Használat előtt várja meg, amíg a reagensek szobahőmérsékletre melegednek. A reagenseket és a mintákat homogenizálja alaposan óvatos mozgatással vagy keveréssel. Minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszennyeződését. Nagypontosságú pipetták, vagy automata pipettázó készülék használata javítja a vizsgálat pontosságát. Tartsa be a megadott inkubációs időket. Minden vizsgálathoz készítsen új kalibrációs görbét, ne használja korábbi mérések adatait.

B. A vizsgálat menete

Kivonás

- 1. Feliratozzon 12x75 mm-es üveg kémcsöveket a kivonási lépéshez 6 kalibrátor, 2 kontroll és legfeljebb 40 minta számára, duplikátban.
- 2. Mérjen 100 µl-t a kalibrátorokból, kontrollokból és mintákból a megfelelő csövekbe.
- 3. Mérjen minden csöbe 0,5 ml acetonitrilt.
- 4. Keverje a csövek tartalmát vortex segítségével 7 másodpercig.
- 5. Centrifugálja a csöveket 5 percig szobahőmérsékleten 800-1500 g-vel.

Inkubációs lépés

- 1. Feliratozzon 2-2 reagenssel borított csövet a kalibrátorok, a minták és a kontrollok számára. A teljes radioaktivitás méréséhez használjon 2 reagens nélküli csövet (totálok).
- 2. Mérjen 100 µl-t a kivonás során keletkezett felülúszóából a megfelelő csövekbe. Bemérés előtt szívja tele a pipettahegyet az adott felülúszóval.
- 3. Mérjen 400 µl inkubációs puffert a csövekbe (a totálokat kivéve).
- 4. Mérjen 50 µl tracert minden csöbe (a totálokba is).
- 5. Inkubálja a csöveket szobahőmérsékleten 2 órán át, (300 - 700 fordulat/percen történő) keverés mellett.
- 6. Szívja le a csövek tartalmát (kivéve a totálokat).
- 7. Mossa a csöveket kétszer 2 ml hígított mosóoldattal, majd távolítsa el a folyadékot. Vigyázzon, hogy a mosóoldat beméréskor ne habosodjon.
- 8. Az mosás után hagyja állni a csöveket 2 percig, majd távolítsa el a megmaradt folyadékcseppet.
- 9. Mérje a radioaktivitást gamma-sugármérővel 60 másodpercig.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

- 1. Számolja ki a párhuzamos mérések átlagát.
- 2. Számítsa ki a megkötött radioaktivitás százalékos értékét a nulla kalibrátorra kapott eredmény felhasználásával az alábbi képlet alapján:

$$B/B_0 \% = [\text{kontroll vagy minta cpm} / B_0 \text{ (nulla kalibrátor) cpm}] \times 100$$

- 3. Féllogaritmikus vagy logit-log milliméterpapíron ábrázolja a kalibrátorok B/B0(%) értékeit a hozzájuk tartozó 25OH-D3 koncentrációk függvényében. Hagyja figyelmen kívül a nyilvánvalóan kieső értékeket.
- 4. Számítógép segítségével is felrajzolható a kalibrációs görbe. Ez esetben használjon 4-paraméteres logisztikus görbeillesztést.
- 5. A kalibrációs görbe alapján határozza meg a minták 25OH-D3-koncentrációját B/B0(%) értékek interpolációjával.
- 6. Minden vizsgálat során határozza meg a jelöletlen 25OH-D3 nélkül bekötődő tracer százalékos mennyiségét (B0/T).

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK tot hier

A következő adatok csak példaként szolgálnak, soha ne használja őket a valós idejű kalibráció helyett.

25OH-Vit.D3	cpm	B/Bo x 100
Teljes radioaktivitás	40301	-
Kalibrátor		
0 ng/ml	23803	100 %
3,0 ng/ml	20171	85 %
9,0 ng/ml	16237	68 %
20,0 ng/ml	12156	51 %
65,0 ng/ml	7090	30 %
130,0 ng/ml	5330	22 %

Megjegyzés: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLÁTAI

A. A kimutathatóság alsó határa

Hús nulla kalibrátort vizsgáltak meg más kalibrátorokkal együtt. A kimutathatóság alsó határa 1,2 ng/ml-nek bizonyult, ami a nulla kalibrátor cpm értékeinek átlagából számolható ki a standard deviáció kétszeresének levonásával.

B. Specificitás

A keresztreakció százalékos értékei különböző vegyületek 50%-os gátlást okozó koncentrációi alapján számolva:

Vegyület	Keresztreaktivitás (%)
25OH- D3-vitamin	100
25OH- D2-vitamin	<0.3
1,25(OH)2-D3-vitamin	89*
1,25(OH)2-D2-vitamin	<0.01
D3-vitamin	<0.03
D2-vitamin	<0.03
24,25(OH)2- D3-vitamin	<0.8

* Mivel a 1,25(OH)2-D3-vitamin koncentrációja tulajdonképpen 1000-szer alacsonyabb, mint a 25OH-D3-é, a keresztreaktivitás nem jelentős, és nem befolyásolja a 25OH-D3-vizsgálat eredményét.

A vizsgálat teljesítményét nem befolyásolja a hemolízis (5 g/l hemoglobin bevizsgálása mellett), illetve a bilirubinaemia (0,25 g/l bilirubin bevizsgálása mellett).

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI				VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI			
Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,3	A	99	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,8	B		13,1 ± 1,0	7,3

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

D. Pontosság

VISSZANYERÉS	
Hozzáadott 25OH-D3 (ng/ml)	Visszanyerés (%)
0	100
15	109
40	97
60	106

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT			
Hígítás	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)	Visszanyerés (%)
1/1	42,5	42,5	100
1/2	21,3	20,9	98,4
1/4	10,6	11,2	105,3
1/8	5,3	5,7	107,0
1/16	2,7	2,6	98,8
1/32	1,3	1,3	98,0

E. Az utolsó kalibrátor és a minták bemérése között eltelt idő

Ahogy ezt az alábbi adatok is mutatják, a vizsgálat eredményeit nem befolyásolja, ha egy minta bemérése akár 15 - 30 perccel az utolsó kalibrátor után történik.

ELTELT IDŐ			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
1. minta	9,5	9,2	10,1
2. minta	36,8	33,9	36,2

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a kontroll 1-re és/vagy 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkéin feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem használhatók fel, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savópoolt, amit azután szétszotva, lefagyasztva kell tárolni.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practises) alapján kell meghatározni.

XV. VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

A táplálkozási szokások, a rassz, az évszakok és az életkor is befolyásolják a 25-hidroxi-D3-vitamin szintjét.

A továbbiakban közölt várható értékeket nem kell abszolút értékeknek tekinteni. A DIAsource kiértékelte a 39 férfitől és 40 nőtől vett mintát, akik a Ca-, PTH-, illetve albuminértékeik szerint egészségesek, és akik Nyugat-Európából származnak. Az önkéntesen résztvevők kora a 17 és 58 év közötti tartományba esett. A mintákat 2010 decembere és 2011 januárja között gyűjtötték. Az egész populáció esetében az átlag (n = 79) 12,5 ng/ml volt, a tratomány pedig 4,1-től 28,7 ng/ml-ig terjedt (a 2,5%-tól 97,5%-ig terjedő értékek alapján). Minden laboratórium alakítsa ki saját tartományát, a helyi populáció alapján.

Az újabb szakirodalom a következő tartományokat javasolja a 25 OH D-vitamin szempontjából állapot besorolására: Vitaminhiány: 0-10 ng/ml; vitaminhiány: 10-30 ng/ml; elegendő vitaminn mennyiség: 30-150 ng/ml; vitamintoxicitás: >150 ng/ml.

XVI. MUNKAÉVELEM

Biztonsági előírások

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra. A kit röntgen (28 keV) és gamma (35,5 keV) sugárzó ¹²⁵I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagensek alkalmazása embereken és állatokon is minden körülmények között tilos. A készlet emberi vérből készült reagenseit európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-

1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitist, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden savó-, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagensek olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagenst potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelni.

Vigyázzon, hogy a reagensek bőre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensekben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. A csövek mosásakor nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki ezeket az anyagokat, hogy megelőzze az azid felgyülemlését.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt. Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhettek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárfertőzéstől.

XVII. IRODALOM

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

6. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

	Totálok ml	Kalibrátorok ml	Minták, kontrollok ml
KIVONÁS			
Kalibrátorok	-	0,1	-
Minták, kontrollok	-	-	0,1
Acetonitril	-	0,5	0,5
Vortex Centrifugálás	Keverje 7 másodperig 5 percig 800-1500 g-vel		
INKUBÁCIÓ			
Felülúszó	-	0,1	0,1
Inkubációs puffer	-	0,4	0,4
Tracer	0,05	0,05	0,05
Inkubáció	2 órán át szobahőmérsékleten, (300 - 700 fordulat/percen történő) keverés mellett.		
Folyadék eltávolítása	Leszívás		
Mosóoldat	2.0		
Folyadék eltávolítása	Leszívás		
Mosóoldat	2.0		
Folyadék eltávolítása	Óvatos leszívás		
Mérés	Radioaktivitás mérése 60 másodpercig		

DIAsource Katalógusszám : KIP1961	P.I. Szám : 1700543/hu	Verziószám : 110328/1
--------------------------------------	---------------------------	--------------------------

Frissítés időpontja : 2011-03-28

	<u>Used symbols</u>	<u>Symboles utilisés</u>
	Consult instructions for use	Consulter les instructions d'utilisation
	Storage temperature	Température de conservation
	Use by	Utiliser jusque
	Batch code	Numéro de lot
	Catalogue number	Référence de catalogue
	Control	Contrôle
	In vitro diagnostic medical device	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Manufacturer	Fabricant
	Contains sufficient for <n> tests	Contenu suffisant pour <n> tests
	Wash solution concentrated	Solution de lavage concentrée
	Zero calibrator	Calibrateur zéro
	Calibrator #	Calibrateur #
	Control #	Contrôle #
	Tracer	Traceur
	Tracer	Traceur
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tracer concentrated	Traceur concentré
	Tubes	Tubes
	Incubation buffer	Tampon d'incubation
	Acetonitrile	Acétonitrile
	Serum	Sérum
	Specimen diluent	Diluant du spécimen
	Dilution buffer	Tampon de dilution
	Antiserum	Antisérum
	Immunoabsorbent	Immunoabsorbant
	Calibrator diluent	Diluant de calibrateur
	Reconstitution solution	Solution de reconstitution
	Polyethylene glycol	Glycol Polyéthylène
	Extraction solution	Solution d'extraction
	Elution solution	Solution d'élution
	Bond Elut Silica cartridges	Cartouches Bond Elut Silica
	Pre-treatment solution	Solution de pré-traitement
	Neutralization solution	Solution de neutralisation
	Tracer buffer	Tampon traceur
	Microtiterplate	Microplaque de titration
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate	HRP Conjugué
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	HRP Conjugate concentrate	HRP Conjugué concentré
	Conjugate buffer	Tampon conjugué
	Chromogenic TMB concentrate	Chromogène TMB concentré
	Chromogenic TMB solution	Solution chromogène TMB
	Substrate buffer	Tampon substrat
	Stop solution	Solution d'arrêt
	Incubation serum	Sérum d'incubation
	Buffer	Tampon
	AP Conjugate	AP Conjugué
	Substrate PNPP	Tampon PNPP
	Biotin conjugate concentrate	Biotine conjugué concentré
	Avidine HRP concentrate	Avidine HRP concentré
	Assay buffer	Tampon de test
	Biotin conjugate	Biotine conjugué
	Specific Antibody	Anticorps spécifique
	Streptavidin HRP concentrate	Concentré streptavidine HRP
	Non-specific binding	Liant non spécifique
	2nd Antibody	Second anticorps
	Acidification Buffer	Tampon d'acidification

	<u>Gebruikte symbolen</u>	<u>Gebrauchte Symbolen</u>
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing	Gebrauchsanweisung beachten
	Bewaartemperatuur	Lagern bei
	Houdbaar tot	Verwendbar bis
	Lotnummer	Chargenbezeichnung
	Catalogusnummer	Bestellnummer
	Controle	Kontrolle
	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek	In Vitro Diagnostikum
	Fabrikant	Hersteller
	Inhoud voldoende voor <n> testen	Ausreichend für <n> Ansätze
	Wasoplossing, geconcentreerd	Waschlösung-Konzentrat
	Nulkalibrator	Null kalibrator
	Kalibrator #	Kalibrator #
	Controle #	Kontrolle #
	Tracer	Tracer
	Tracer	Tracer
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Tracer geconcentreerd	Tracer Konzentrat
	Buisjes	Röhrchen
	Incubatiebuffer	Inkubationspuffer
	Acetonitrile	Azetonitril
	Serum	Humanserum
	Specimen diluent	Probenverdünner
	Verdunningsbuffer	Verdünnungspuffer
	Antiserum	Antiserum
	Immunoabsorbent	Immunadsorbens
	Kalibratorverdunner	Kalibratorverdünnung
	Reconstitutieoplossing	Rekonstitutionslösung
	Polyethyleen glycol	Polyethylenglykol
	Extractieoplossing	Extraktionslösung
	Elutieoplossing	Eluierungslösung
	Bond Elut Silica kolom	Bond Elut Silikakartuschen
	Pre-behandelingsoplossing	Vorbehandlungslösung
	Neutralisatieoplossing	Neutralisierungslösung
	Tracerbuffer	Tracer-Puffer
	Microtiterplaat	Mikrotiterplatte
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat	HRP Konjugat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	HRP Conjuaat geconcentreerd	HRP Konjugat Konzentrat
	Conjuaat buffer	Konjugatpuffer
	Chromogene TMB geconcentreerd	Chromogenes TMB Konzentrat
	Chromogene Oplossing TMB	Farblösung TMB
	Substraatbuffer	Substratpuffer
	Stopoplossing	Stopplösung
	Incubatieserum	Inkubationsserum
	Buffer	Puffer
	AP Conjuaat	AP Konjugat
	Substraat PNPP	Substrat PNPP
	Geconcentreerd Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat-Konzentrat
	Geconcentreerd Avidine-HRP conjuaat	Avidin-HRP-Konzentrat
	Assay buffer	Assaypuffer
	Biotine conjuaat	Biotin-Konjugat
	Specifiek antilichaam	Spezifischer Antikörper
	Streptavidine-HRP concentraat	HRP Streptavidinkonzentrat
	Aspecifieke binding	Unspezifische Bindung
	2de antilichaam	Sekundärer Antikörper
	Verzuringbuffer	Ansäuerungspuffer

	<u>Simboli utilizzati</u>	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultare le istruzioni per l'uso	Consultar las instrucciones de uso
	Limitazioni di temperatura	Limitación de temperatura
	Utilizzare entro	Fecha de caducidad
	Numero di lotto	Código de lote
	Numero di catalogo	Número de catálogo
	Controllo	Control
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabbricante	Fabricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos
	Tampone di lavaggio concentrato	Solución de lavado concentrada
	Calibratore zero	Calibrador cero
	Standard #	Calibrador #
	Controllo #	Control #
	Marcato	Trazador
	Marcato	Trazador
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Marcato concentrato	Trazador concentrada
	Provette	Tubos
	Tampone incubazione	Tampón de incubación
	Acetonitrile	Acetonitrilo
	Siero	Suero
	Diluente campione	Diluyente de Muestra
	Tampone diluizione	Tampón de dilución
	Antisiero	Antisuero
	Immunoassorbente	Inmunoadsorbente
	Diluente calibratore	Diluyente de calibrador
	Soluzione di ricostituzione	Solución de Reconstitución
	Polietilenglicole	Glicol Polietileno
	Soluzione di estrazione	Solución de extracción
	Soluzione di eluizione	Solución de elución
	Cartucce di silice bond elut	Cartuchos Bond Elut Silica
	Soluzione di pretrattamento	Solución de Pre-tratamiento
	Soluzione di neutralizzazione	Solución de Neutralización
	Tracer Buffer	Tampón de trazador
	Piastra di microtitolazione	Placa de microvaloración
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato	HRP Conjugado
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	HRP Coniugato concentrato	HRP Conjugado concentrada
	Buffer coniugato	Tampón de Conjugado
	Cromogena TMB concentrato	Cromógena TMB concentrada
	Soluzione cromogena TMB	Solución Cromógena TMB
	Tampone substrato	Tampón de sustrato
	Soluzione di arresto	Solución de Parada
	Incubazione con siero	Suero de Incubación
	Buffer	Tampón
	AP Coniugato	AP Conjugado
	Substrato PNPP	Sustrato PNPP
	Concentrato coniugato con biotina	Concentrado de conjugado de biotina
	Concentrato avidina HRP	Concentrado avidina-HRP
	Soluzione tampone per test	Tampón de ensayo
	Coniugato con biotina	Conjugado de biotina
	Anticorpo Specifico	Anticuerpo específico
	Streptavidina-HRP concentrata	Estreptavidina-HRP Concentrado
	Legame non-specifico	Unión no específica
	2° Anticorpo	Segundo anticuerpo
	Tampone Acidificante	Tampón de Acidificación

	<u>Símbolos utilizados</u>	<u>Använda symboler</u>
	Consulte instruções de utilização	Läs instruktionerna före användning
	Temperatura de conservação	Förvaringstemperatur
	Utilizar antes de	Används av
	Código de lote	Lotnummer
	Número de catálogo	Katalognummer
	Controlo	Kontroll
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro	In vitro diagnostiskt kit
	Fabricante	Tillverkare
	Conteúdo suficiente para <n> testes	Innehållet räcker till <n> prover
	Solução de lavagem concentrada	Tvättlösning, koncentrerad
	Calibrador zero	Nollkalibrerare
	Calibrador #	Kalibrator #
	Controlo #	Kontroll #
	Marcador	Radioisotop, antigen
	Marcador	Radioisotop, antikropp
	Marcador concentrada	Radioisotop, antigen koncentrerad
	Marcador concentrada	Radioisotop, antikropp koncentrerad
	Tubos	Rör
	Tampão de incubação	Inkuberingsbuffert
	Acetonitrilo	Acetonitril
	Soro	Serum
	Diluidor de espécimes	Spädningsbuffert för prover
	Tampão de diluição	Spädningsbuffert
	Anti-soro	Antiserum
	Imunoadsorvente	Immunoadsorberare
	Diluyente do calibrador	Kalibratordiluent
	Solução de Reconstituição	Rekonstitutionslösning
	Polietileno-glicol	Polyetylglykol
	Solução de Extração	Extraktionslösning
	Solução de Eluição	Elueringslösning
	Cartuchos de sílica Bond Elut	Silikonpatroner för elueringsbindning
	Solução de pré-tratamento	Förbehandlingslösning
	Solução de neutralização	Neutraliseringslösning
	Tampão Marcador	Tracerbuffert
	Placa de micro titulação	Microtiterplatta
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação	HRP-konjugat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	HRP Conjugação concentrada	HRP-konjugat-koncentrat
	Conjuge o tampão	Konjugatbuffert
	Cromogénica TMB concentrada	Kromogeniskt TMB-koncentrat
	Solução Cromogénica TMB	Kromogenisk TMB-lösning
	Tampão de substrato	Substratbuffert
	Solução de Paragem	Stoplösning
	Soro de incubação	Inkubationsserum
	Tampão	Buffert
	AP Conjugação	AP-konjugat
	Substrato PNPP	Substrat-PNPP
	Concentrado conjugado de biotina	Biotinkonjugat koncentrat
	Concentrado HRP de avidina	Avidin HRP-koncentrat
	Tampão de ensaio	Provbuffert
	Conjugado de biotina	Biotinkonjugat
	Anticorpo específico	-
	Estreptavidina HRP concentrado	-
	Ligações não específicas	-
	Anticorpo secundário	-
	Tampão de acidificação	-

	<u>Επεξήγηση συμβόλων</u>	<u>Anvendte symboler</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης	Læs brugsvejledningen
	Θερμοκρασία αποθήκευσης	Opbevaringstemperatur
	Ημερομηνία λήξης	Anvend inden
	Αριθμός παρτίδας	Batchkode
	Αριθμός καταλόγου	Katalognummer
	Πρότυπο ελέγχου	Kontrol
	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν	Medicinsk udstyr til in vitro-diagnosticering
	Κατασκευαστής	Fabrikant
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις	Indeholder nok til <n> test
	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης	Koncentreret vaskeopløsning
	Μηδενικός βαθμονομητής	Nul-kalibrator
	Βαθμονομητής #	Kalibrator nr.
	Ορός ελέγχου #	Kontrol nr.
	Ιχνηθέτης	Markør
	Ιχνηθέτης	Markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης	Koncentreret markør
	Σωληνάρια	Tuber
	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης	Inkubationsbuffer
	Ακετονιτρίλιο	Acetonitril
	Ορός	Serum
	Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων	Prøvediluent
	Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης	Fortyndingsbuffer
	Αντιορός	Antiserum
	Ανοσοπροσροφητικό	Immonoadsorbent
	Αραιωτικό βαθμονομητών	Kalibratordiluent
	Διάλυμα ανασύστασης	Rekonstitueringsopløsning
	Πολυαιθυλενογλυκόλη	Polyetylenglykol
	Διάλυμα εκχύλισης	Ekstraktionsopløsning
	Διάλυμα έκλουσης	Elueringsopløsning
	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	Patroner med bindingselueringssilica
	Διάλυμα προεπεξεργασίας	Forbehandlingsopløsning
	Διάλυμα εξουδετέρωσης	Neutraliseringsopløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Markørbuffer
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης	Mikrotiterplade
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα	HRP-konjugat-koncentreret
	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος	Konjugatbuffer
	Χρωμογόνος TMB	Kromogen TMB-koncentreret
	Διάλυμα χρωμογόνου TMB	Kromogen TMB-opløsning
	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος	Substratbuffer
	Ανασχετικό αντιδραστήριο	Stopopløsning
	Ορός επώασης	Inkubationsserum
	Ρυθμιστικό διάλυμα	Buffer
	AP Σύζευγμα	AP-konjugat
	PNPP υποστρώματος	Substrat PNPP
	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat koncentrat
	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP	Avidin HRP koncentrat
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	Prøvebuffer
	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη	Biotin konjugat
	Ειδικό Αντίσωμα	-
	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP	-
	μη-ειδική δέσμευση	-
	2ο Αντίσωμα	-
	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο	-

	<u>Stosowane symbole</u>	<u>Használt szimbólumok</u>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją	Olvassa el a használati útmutatót
	Temperatura przechowywania	Tárolási hőmérséklet
	Zużyć przed	Lejáratí idő
	Kod serii	Gyártási kód
	Numer katalogowy	Katalógus szám
	Kontrola	Kontrol
	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro	In vitro diagnosztikai eszköz
	Producent	Gyártó
	Zawartość wystarczająca do <n> testów	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
	Roztwór płuczący stężony	Mosó folyadék koncentrátum
	Kalibrator zerowy	Zero kalibrátor
	Kalibrator nr	Kalibrátor #
	Kontrola nr	Kontrol #
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy	Nyomjelző izotóp
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Znacznik izotopowy stężony	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Probówki	Csővek
	Wymagana inkubacja buforu	Inkubáló puffer
	Acetonitryl	Acetonitril
	Surowica	Szérum
	Rozcieńczalnik próbki	Mintahígító
	Bufor do rozcieńczania	Hígító puffer
	Antysurowica	Antiszérum
	Immunoabsorbent	Immunadszorbens
	Rozcieńczalnik kalibratora	Kalibrátor hígító
	Roztwór do rozcieńczania	Mintaelőkészítő oldat
	Glikol poli(oksy)etylenowy	Polietilén glikol
	Roztwór ekstrakcyjny	Extrakciós oldat
	Roztwór elucyjny	Eluáló oldat
	Kolumny krzemionkowe Bond Elut	Bond Elut Silica szilikagél patronok
	Roztwór do przygotowania wstępnego	Előkezelő oldat
	Roztwór neutralizujący	Semlegesítő oldat
	Bufor znacznika	Nyomjelző izotóp hígító puffer
	mikro płytki	Mikrotiter lemez
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koniugat peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej	HRP konjugátum koncentrátum
	Bufor do koniugacji	Konjugátum puffer
	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB koncentrátum
	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)	Kromogén TMB oldat
	Bufor substratu	Szubsztrát puffer
	Roztwór zatrzymujący reakcję	Stop oldat
	Wymagana inkubacja surowicy	Inkubációs szérum
	Bufor	Puffer
	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)	AP konjugátum
	p-nitrofenylofosforan substratowy	Szubsztrát PNPP
	Koncentrat koniugatu biotyny	Biotin konjugátum koncentrátum
	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną	Avidin HRP koncentrátum
	Bufor do oznaczania	Vizsgálati puffer
	Koniugatu biotyny	Biotin konjugátum
	Przeciwciało swoiste	Specifikus ellenanyag
	Koncentrat streptawidyny HRP	Sztreptawidin HRP koncentrátum
	Wiązanie nieswoiste	Nem-specifikus kötődés
	Drugie przeciwciało	Másodlagos ellenanyag
	Bufor zakwaszający	Savas puffer

	<u>Използвани символи</u>
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсър
Ab 125I	Трейсър
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
	Микротитърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично антитяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ антитяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер