



# **25OH-Vitamin D total- RIA-CT**

***KIP1971***



Read entire protocol before use.

## 25OH Vitamin D total -RIA-CT

### I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of 25-hydroxyvitamin D2 and D3 (25-OH-D2 and 25-OH-D3) in serum or heparin plasma.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource 25OH Vitamin D total -RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP 1971 : 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

Vitamin D is the generic term used to designate Vitamin D2 or ergocalciferol and Vitamin D3 or cholecalciferol.

Humans naturally produce Vitamin D3 when the skin is exposed to ultraviolet sun rays.

In the liver mainly, Vitamin D3 is metabolised into 25-Hydroxyvitamin D3 (25 OH D3) which is the main form of Vitamin D circulating in the body.

25 OH D3 is a precursor for other Vitamin D metabolites and has also a limited activity by itself.

The most active derivative is 1,25-Hydroxyvitamin D3, produced in the kidney (or placenta) by 1  $\alpha$  -hydroxylation of 25OHD3.

25OHVitamin D stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus and also bone resorption and mineralisation. 25OH Vitamin D might also be active in other tissues responsible for calcium transport (placenta, kidney, mammary gland...) and endocrine gland (parathyroid glands, beta cells...).

Vitamin D3 and Vitamin D2 are also available by ingestion through food or dietary supplementation.

As Vitamin D2 is metabolised in a similar way to vitamin D3, both contribute to the overall Vitamin D status of an individual.

It is the reason why it is very important to measure both forms of 25 OH Vitamin D equally for a correct diagnosis of Vitamin D deficiency, insufficiency or intoxication.

Vitamin D deficiency is an important risk factor for rickets, osteomalacia, senile osteoporosis, cancer and abnormal pregnancy outcomes.

The measurement of both 25 OH Vitamin D forms is also required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients.

Vitamin D intoxication has been shown to cause kidney and tissue damages.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

At first calibrators, controls and samples (serum or heparin plasma) are pre-treated to release 25OH Vitamin D<sub>2</sub> and 25OH Vitamin D<sub>3</sub> from Vitamin D Binding Protein (DBP). A fixed amount of <sup>125</sup>I labelled 25OH Vitamin D competes with the 25OH Vitamin D<sub>2</sub> and 25OH Vitamin D<sub>3</sub> from treated samples, controls or calibrators, for a fixed amount of a specific monoclonal antibody sites immobilized to the lower and inner surface of plastic tubes. After 2 hours incubation at room temperature on a tube shaker, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed twice and aspirated again. A calibration curve is plotted and the total 25 OH Vitamin D (D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>) concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

| Reagents                                                                                                                                                           | 96 Test Kit      | Colour Code      | Reconstitution                   |                 |                                           |                                                                   |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
|  Tubes coated with Mab anti 25OH Vit D2 and 25OH Vit D3                             | 2 x 48           | green            | <b>Ready</b> for use             |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>Ag</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table><br><sup>125</sup> Iodine labelled 25OH Vit D (HPLC grade).                                  | Ag               | <sup>125</sup> I | 1 vial<br>160 kBq<br>lyophilised | red             | <b>Add</b> 6 ml of Tracer Buffer          |                                                                   |
| Ag                                                                                                                                                                 | <sup>125</sup> I |                  |                                  |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table><br>Calibrator 0: horse serum and phosphate buffer with gentamycin.                                       | CAL              | 0                | 1 vial<br>lyophilised            | yellow          | <b>Add</b> 0.5 ml distilled water         |                                                                   |
| CAL                                                                                                                                                                | 0                |                  |                                  |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table><br>Calibrators 1-5 in horse serum and phosphate buffer with gentamycin (see exact values on vial labels) | CAL              | N                | 5 vials<br>lyophilised           | yellow          | <b>Add</b> 0.5 ml distilled water         |                                                                   |
| CAL                                                                                                                                                                | N                |                  |                                  |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Wash solution (TRIS-HCl)                                                             | WASH             | SOLN             | CONC                             | 1 vial<br>10 ml | brown                                     | <b>Dilute</b> 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer). |
| WASH                                                                                                                                                               | SOLN             | CONC             |                                  |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table><br>Controls N = 2 in human serum with thymol                                                         | CONTROL          | N                | 2 vials<br>lyophilised           | silver          | <b>Add</b> 0.5 ml distilled water         |                                                                   |
| CONTROL                                                                                                                                                            | N                |                  |                                  |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table><br>Tracer Buffer with casein and gentamycin                                                         | TRACER           | BUF              | 1 vial<br>7 ml                   | red             | <b>Ready</b> for use                      |                                                                   |
| TRACER                                                                                                                                                             | BUF              |                  |                                  |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table><br>Pre-treatment Solution with Proclin 300 (0.1 %)                                                    | PRE              | SOLN             | 1 vial<br>lyophilised            | green           | <b>Add</b> 5 ml distilled distilled water |                                                                   |
| PRE                                                                                                                                                                | SOLN             |                  |                                  |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>PRE</td><td>BUF</td></tr></table><br>Pre-treatment Buffer with sodium azide (<0.1%)                                                      | PRE              | BUF              | 1 vial<br>20 ml                  | blue            | <b>Ready</b> for use                      |                                                                   |
| PRE                                                                                                                                                                | BUF              |                  |                                  |                 |                                           |                                                                   |
| <table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SOLN</td></tr></table><br>Dilution Solution with sodium azide (<0.1%)                                                        | DIL              | SOLN             | 1 vial<br>100 ml                 | black           | <b>Ready</b> for use                      |                                                                   |
| DIL                                                                                                                                                                | SOLN             |                  |                                  |                 |                                           |                                                                   |

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

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 50 µl ,100 µl , 200µl , 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)

- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Tube shaker (300 to 700 rpm)
- Glass tubes (12x 75 mm) or polypropylene tubes (for example: Falcon 352063) for pre-treatment step.
- A water bath at 37°C
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system
- Any gamma counter capable of measuring <sup>125</sup>I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators :** Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water
- Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Tracer:** Reconstitute the lyophilized tracer with 6 ml of tracer buffer.
- Pre-treatment Solution :**Reconstitute extemporaneously the lyophilized pre-treatment solution with 5 ml distilled water.
- 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. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at -20°C (with one thawing).
- After its first use, pre-treatment solution is stable 2 months at -20°C(with one thawing)
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Don't use EDTA plasma.**
- 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 = 0.997 Serum, R = 0.91.
- Serum and heparin samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, samples storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

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

B. Procedure

B1 Pre-treatment :

- Label one glass tube or one polypropylene tube for each calibrator, control and sample.
- Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 100 µl of each into the respective tubes.
- Dispense 50 µl of pre-treatment solution into each tube.
- Dispense 200 µl of pre-treatment buffer into each tube.
- Briefly vortex tubes, cover them and incubate 30 minutes at 37°C in a water bath.  
**! Be careful incubation volume must be completely immersed during this step.**  
**! Respect incubation time: 30 - 35 minutes is necessary.**  
**! Respect incubation temperature: 37 - 40 °C is necessary.**
- Dispense 1 ml of Dilution Solution into each tube and vortex briefly.

B2 Incubation :

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
- Dispense 500µl of pre-treated calibrator or control or sample

- Dispense 50 µl of <sup>125</sup>Iodine labelled 25OH Vitamin D into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate for 2 hours at room temperature on a tube shaker (300 to 700 rpm)
- Aspirate the content of each tube (except total counts). Be sure that the tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate. Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate .
- Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

**XI. CALCULATION OF RESULTS**

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

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

- Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B<sub>0</sub>(%)) values for each calibrator point as a function of 25OH vitamin D concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
- Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample (B/B<sub>0</sub> (%)) values, determine the total 25OH vitamin D concentrations of the samples from the calibration curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 25 OH vitamin D (B<sub>0</sub>/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 Vitamin D total |           | cpm   | B/Bo (%) |
|----------------------|-----------|-------|----------|
| Total count          |           | 45756 |          |
| Calibrator           | 0.0 ng/ml | 21958 | 100.0    |
|                      | 2 ng/ml   | 17916 | 81.6     |
|                      | 6 ng/ml   | 14170 | 64.5     |
|                      | 15 ng/ml  | 10710 | 48.8     |
|                      | 55 ng/ml  | 4949  | 22.5     |
|                      | 120 ng/ml | 3161  | 14.4     |

**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 D total concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 0.4ng/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 D <sub>3</sub>                    | 100                  |
| 25OH-Vitamin D <sub>2</sub>                    | 95                   |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>3</sub>  | 4                    |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>2</sub>  | 4                    |
| Vitamin D3                                     | <0.3                 |
| Vitamin D2                                     | <0.3                 |
| 24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>3</sub> | ≥100                 |

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

**C. Precision**

| INTRA-ASSAY |    |                  |          | INTER-ASSAY |    |                  |          |
|-------------|----|------------------|----------|-------------|----|------------------|----------|
| Sample      | N  | <X> ± SD (ng/ml) | C.V. (%) | Sample      | N  | <X> ± SD (ng/ml) | C.V. (%) |
| A           | 23 | 14.7 ± 0.8       | 5.4      | A           | 16 | 13.8 ± 1.3       | 9.4      |
| B           | 23 | 42.4 ± 2         | 4.7      | B           | 16 | 38.5 ± 3.5       | 9.1      |

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

**D. Accuracy**

| RECOVERY TEST                         |              |
|---------------------------------------|--------------|
| Added 25OH-Vit.D <sub>3</sub> (ng/ml) | Recovery (%) |
| 0                                     | 100          |
| 25                                    | 105          |
| 50                                    | 105          |
| 100                                   | 91           |
| Added 25OH-Vit.D <sub>2</sub> (ng/ml) | Recovery (%) |
| 0                                     | 100          |
| 25                                    | 101          |
| 50                                    | 101          |
| 100                                   | 96           |

| DILUTION TEST   |                              |                           |              |
|-----------------|------------------------------|---------------------------|--------------|
| Sample dilution | Theoretical concent. (ng/ml) | Measured concent. (ng/ml) | Recovery (%) |
| 1/1             | 102.8                        | 102.8                     | 100          |
| 1/2             | 51.4                         | 60.1                      | 117          |
| 1/4             | 25.7                         | 25.6                      | 100          |
| 1/8             | 12.9                         | 12.9                      | 100          |
| 1/1             | 80.3                         | 80.3                      | 100          |
| 1/2             | 40.2                         | 42.0                      | 105          |
| 1/4             | 20.1                         | 24.7                      | 123          |
| 1/8             | 10.0                         | 10.9                      | 108          |

**E. Time delay between last calibrator and sample dispensing**

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 10 and 20 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

| TIME DELAY |            |             |             |
|------------|------------|-------------|-------------|
|            | 0' (ng/ml) | 10' (ng/ml) | 20' (ng/ml) |
| Sample 1   | 13.5       | 13.6        | 11.7        |
| Sample 2   | 39.5       | 39.3        | 37.4        |

#### XIV. EXPECTED VALUES

Dietary intake, race, season and age are known to affect the normal levels of 25OH Vitamin 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 12.9 ng/mL, ranging from 6.6 to 24.5 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.

#### XV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

##### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains <sup>125</sup>I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations.

This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

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

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

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

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

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

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

#### XIV. PRECAUTIONS AND WARNINGS

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.(2004)  
**Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.**  
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.

7. HEANEY R.P. (2010)  
**Defining deficiency of vitamin D .**  
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.
8. HOLICK M.F. (2007)  
**Vitamin D deficiency.**  
N. Engl. J. Med., 357:266-281.
9. TAHA N. M. , VIETH R.(2010)  
**The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .**  
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

#### XV. SUMMARY OF THE PROTOCOL

|                                                                        | TOTAL<br>COUNTS<br>µl                                                                   | CALIBRATORS<br>µl              | SAMPLE (S)<br>CONTROLS<br>µl |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| <b><u>PRE-TREATMENT</u></b><br>(in glass tubes or polypropylene tubes) |                                                                                         |                                |                              |
| Samples, controls, calibrators                                         | -                                                                                       | 100                            | 100                          |
| Pre-treatment solution                                                 | -                                                                                       | 50                             | 50                           |
| Pre-treatment buffer                                                   | -                                                                                       | 200                            | 200                          |
| Incubation:                                                            | Vortex<br>30-35 minutes at 37-40°C in a water bath (incubation volume must be immersed) |                                |                              |
| Dilution Solution                                                      | -                                                                                       | 1000                           | 1000                         |
|                                                                        | Vortex                                                                                  |                                |                              |
| <b><u>INCUBATION</u></b><br>(in coated tubes)                          |                                                                                         |                                |                              |
| Pre-treated Calibrators, samples, controls                             | -                                                                                       | 500                            | 500                          |
| Tracer                                                                 | 50                                                                                      | 50                             | 50                           |
| Incubation                                                             | 120 minutes at RT on a shaker (300 to 700 rpm)                                          |                                |                              |
| Separation<br>Working Wash solution                                    | -                                                                                       | Aspirate<br>2.0 ml             |                              |
| Separation<br>Working Wash solution                                    | -                                                                                       | Aspirate<br>2.0 ml<br>Aspirate |                              |
| Counting                                                               | Count tubes for 60 seconds                                                              |                                |                              |

|                                      |                             |                           |
|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogue Nr :<br>KIP 1971 | P.I. Number :<br>1700528/en | Revision nr :<br>110324/1 |
|--------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|

Revision date : 2011-03-24



Lire entièrement le protocole avant utilisation.

## 25OH Vitamin D total -RIA-CT

### I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 25-hydroxyvitamine D2 et D3 (25-OH-D2 et 25-OH-D3) dans le sérum ou le plasma hépariné.

### II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom du produit:** DIAsource 25OH Vitamin D total -Ria-CT Kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1971 : 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

La vitamine D est le terme générique utilisé pour désigner la vitamine D2, ou ergocalciférol, et la vitamine D3, ou cholécalciférol.

L'homme produit naturellement de la vitamine D lorsque sa peau est exposée aux ultraviolets des rayons solaires.

La vitamine D3 est métabolisée, principalement dans le foie, en 25-hydroxyvitamine D3 (25 OH D3) qui est la forme principale de la vitamine D circulante dans le corps.

La 25 OH D3 est un précurseur d'autres métabolites de la vitamine D et possède en elle-même une activité limitée.

Le dérivé le plus actif est la 1,25-hydroxyvitamine D3 produite par le rein (ou le placenta) par 1 $\alpha$ -hydroxylation de la 25OHD3.

La 25OHvitamine D3 stimule l'absorption intestinale à la fois du calcium et du phosphore ainsi que la résorption et la minéralisation de l'os.

La 25OH vitamine D peut également être active sur d'autres tissus responsables du transport du calcium (placenta, rein, glande mammaire,...) et sur les glandes endocrines (glandes parathyroïdes, cellules bêta,...).

Une autre source de vitamine D3 et de vitamine D2 est l'alimentation ou la prise de suppléments diététiques.

La vitamine D2 étant métabolisée par une voie similaire à la vitamine D3, les deux formes de la vitamine contribuent au statut général en vitamine D d'un individu.

C'est la raison pour laquelle il est très important de doser les deux formes de la 25OH vitamine D pour un faire diagnostic correct de carence, insuffisance ou intoxication en vitamine D.

La carence en vitamine D est un facteur de risque important de rachitisme, ostéomalacie, ostéoporose sénile, cancer et mauvaise évolution de la grossesse.

Le dosage des deux formes de la vitamine D est aussi requis pour déterminer la cause d'une concentration anormale de calcium dans le sérum.

Il a été démontré qu'une intoxication en vitamine D provoque des dommages aux reins et à d'autres tissus.

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Les calibrateurs, contrôles et échantillons (sérum ou plasma hépariné) sont tout d'abord prétraités pour que la protéine de liaison de la vitamine D (DBP) relâche la 25OH vitamine D<sub>2</sub> et la 25OH vitamine D<sub>3</sub>. Une quantité fixe de 25OH vitamine D marquée à l'I<sup>125</sup> entre en compétition avec la 25OH vitamine D<sub>2</sub> et la 25OH vitamine D<sub>3</sub> des échantillons, contrôles et calibrateurs traités pour une quantité fixe de sites d'anticorps monoclonaux spécifiques immobilisés sur la surface interne et le bas de tubes en plastique. Après une incubation de 2 heures à température ambiante sur un agitateur pour tubes, une étape d'aspiration termine la réaction de compétition. Les tubes sont ensuite lavés deux fois et à nouveau aspirés. Une courbe de calibration est tracée et les concentrations en 25OH vitamine D totale (D<sub>2</sub> et D<sub>3</sub>) des échantillons sont déterminées par interpolation de la concentration sur la courbe de calibration.

V. RÉACTIFS FOURNIS

| Réactifs                                                                                                                                                                                        | Quantité         | Code Couleur     | Reconstitution               |                   |                                       |                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
|  Tubes tapissés avec l'anti 25OH-Vitamine D <sub>2</sub> et 25OH-Vitamine D <sub>3</sub> (anticorps monoclonaux) | 2 x 48           | Vert             | <b>Prêt</b> à l'emploi       |                   |                                       |                                                                               |
| <table border="1"><tr><td>Ag</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table><br>25OH Vit D marquée à l'I <sup>125</sup> (de grade HPLC).                                                              | Ag               | <sup>125</sup> I | 1 flacon lyophil.<br>160 kBq | Rouge             | <b>Ajouter</b> 6 ml de tampon traceur |                                                                               |
| Ag                                                                                                                                                                                              | <sup>125</sup> I |                  |                              |                   |                                       |                                                                               |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table><br>Calibrateur 0: sérum de cheval et tampon phosphate avec de la gentamycine                                                          | CAL              | 0                | 1 flacon lyophil.            | Jaune             | <b>Ajouter</b> 0,5 ml d'eau distillée |                                                                               |
| CAL                                                                                                                                                                                             | 0                |                  |                              |                   |                                       |                                                                               |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table><br>Calibrateurs 1-5 dans du sérum de cheval et tampon phosphate avec de la gentamycine (cf. valeurs exactes sur chaque flacon)        | CAL              | N                | 5 flacons lyophil.           | Jaune             | <b>Ajouter</b> 0,5 ml d'eau distillée |                                                                               |
| CAL                                                                                                                                                                                             | N                |                  |                              |                   |                                       |                                                                               |
| <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Solution de Lavage (Tris-HCl)                                                                                     | WASH             | SOLN             | CONC                         | 1 flacon<br>10 ml | Brun                                  | <b>Diluer</b> 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><br>Contrôles - N = 2 dans du sérum humain et thymol                                                                               | CONTROL          | N                | 2 flacons lyophil.           | Argent            | <b>Ajouter</b> 0,5 ml d'eau distillée |                                                                               |
| CONTROL                                                                                                                                                                                         | N                |                  |                              |                   |                                       |                                                                               |
| <table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table><br>Tampon traceur avec de la caséine et de la gentamycine                                                                        | TRACER           | BUF              | 1 flacon<br>7 ml             | Rouge             | <b>Prêt</b> à l'emploi                |                                                                               |
| TRACER                                                                                                                                                                                          | BUF              |                  |                              |                   |                                       |                                                                               |
| <table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table><br>Solution de prétraitement avec du ProClin 300 (0,1 %)                                                                           | PRE              | SOLN             | 1 flacon lyophil.            | Vert              | <b>Ajouter</b> 5 ml d'eau distillée   |                                                                               |
| PRE                                                                                                                                                                                             | SOLN             |                  |                              |                   |                                       |                                                                               |
| <table border="1"><tr><td>PRE</td><td>BUF</td></tr></table><br>Tampon de prétraitement avec de l'azoture de sodium (<0,1%)                                                                      | PRE              | BUF              | 1 flacon<br>20 ml            | Bleu              | <b>Prêt</b> à l'emploi                |                                                                               |
| PRE                                                                                                                                                                                             | BUF              |                  |                              |                   |                                       |                                                                               |
| <table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SOLN</td></tr></table><br>Solution de dilution avec de l'azoture de sodium (<0,1%)                                                                        | DIL              | SOLN             | 1 flacon<br>100 ml           | Noir              | <b>Prêt</b> à l'emploi                |                                                                               |
| DIL                                                                                                                                                                                             | SOLN             |                  |                              |                   |                                       |                                                                               |

**Note :** Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons avec des valeurs au-dessus du calibrateur le plus haut avant l'étape de prétraitement. Des références internationales ne sont pas disponibles.

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl et 1 ml (il est recommandé d'utiliser des pipettes de précision avec des pointes en plastique à usage unique)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique

- Agitateur pour tubes (300 à 700 tpm)
- Tubes en verre (12 x 75 mm) ou en polypropylène (par exemple: Falcon 352063) pour l'étape de prétraitement.
- Un bain-marie à 37°C
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Systèmes d'aspiration et de lavage.
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'<sup>125</sup>I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- 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. Traceur :** Reconstituer le traceur lyophilisé avec 6 ml de tampon traceur.
- D. Solution de prétraitement:** Reconstituer en extemporané la solution de prétraitement lyophilisée avec 5 ml d'eau distillée.
- E. 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 RÉACTIFS

- 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. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après sa première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration s'il est conservé dans le flacon d'origine bien fermé à -20°C (avec une décongélation).
- Après sa première utilisation, la solution de prétraitement est stable pendant 2 mois à -20°C (avec une décongélation).
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON

- **Ne pas utiliser de plasma sur EDTA.**
- 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 = 0,997 sérum, R = 0,91.
- Les échantillons de sérum et de plasma héparinés doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPÉRATOIRE

- 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**

**B1 Prétraitement :**

- Étiqueter un tube en verre ou en polypropylène pour chacun des calibrateurs, contrôles et échantillons.
- Agiter brièvement au vortex les calibrateurs, contrôles et échantillons et distribuer 100 µl de chacun dans leur tube respectif.
- Distribuer 50 µl de solution de prétraitement dans chacun des tubes.
- Distribuer 200 µl de tampon de prétraitement dans chacun des tubes.
- Agiter brièvement au vortex les tubes, les couvrir et incubé 30 minutes à 37°C au bain-marie.  
**! Attention, le volume à incubé doit être complètement immergé pendant cette étape.**

- ! Respecter le temps d'incubation: 30 à 35 minutes sont nécessaires.**  
**! Respecter la température d'incubation: 37 à 40 °C sont nécessaires.**
- Distribuer 1 ml de solution de dilution dans chacun des tubes et agiter brièvement au vortex.

**B2 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.
- Distribuer 500 µl de calibrateur ou de contrôle ou d'échantillon prétraités.
- Ajouter 50 µl de 25OH vitamine D marquée à l'I<sup>125</sup> à chaque tube, ceux pour la détermination de l'activité totale inclus.
- Agiter manuellement et doucement le porte-tubes pour libérer toutes les bulles d'air emprisonnées.
- Incuber pendant 2 heures à température ambiante sur un agitateur pour tubes (300 à 700 tpm).
- Aspirer le contenu de chaque tube (sauf ceux pour la détermination de l'activité totale). S'assurer que la pointe de la pipette atteint le fond du tube tapissé afin de retirer tout le liquide.
- Laver les tubes avec 2 ml de Solution de lavage (sauf ceux pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- Laver les tubes avec 2 ml de solution de lavage (sauf ceux pour la détermination de l'activité totale) et aspirer.
- Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
- Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

**XI. CALCUL DES RÉSULTATS**

- Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
- 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 :

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

- 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 vitamine D, écarter les valeurs aberrantes.
- 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.
- L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B0(%)) détermine les concentrations en 25OH vitamine D totale à partir de la courbe d'étalonnage.
- Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 25OH vitamine D non marquée (B0/T) doit être vérifié.

**XII. DONNÉES 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 Vitamin D total |           | cpm   | B/Bo (%) |
|----------------------|-----------|-------|----------|
| Activité totale      |           | 45756 |          |
| Calibrateur          | 0,0 ng/ml | 21958 | 100,0    |
|                      | 2 ng/ml   | 17916 | 81,6     |
|                      | 6 ng/ml   | 14170 | 64,5     |
|                      | 15 ng/ml  | 10710 | 48,8     |
|                      | 55 ng/ml  | 4949  | 22,5     |
|                      | 120 ng/ml | 3161  | 14,4     |

**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 de 25OH-Vitamine D totale située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 0,4 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-Vitamin D <sub>3</sub>                    | 100                    |
| 25OH-Vitamin D <sub>2</sub>                    | 95                     |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>3</sub>  | 4                      |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>2</sub>  | 4                      |
| Vitamin D3                                     | <0,3                   |
| Vitamin D2                                     | <0,3                   |
| 24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>3</sub> | ≥100                   |

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

**C. Précision**

| INTRA-ESSAI      |    |                     |             | INTER-ESSAI      |    |                     |             |
|------------------|----|---------------------|-------------|------------------|----|---------------------|-------------|
| Echantil-<br>lon | N  | <X> ± SD<br>(ng/ml) | C.V.<br>(%) | Echantil-<br>lon | N  | <X> ± SD<br>(ng/ml) | C.V.<br>(%) |
| A                | 23 | 14,7 ± 0,8          | 5,4         | A                | 16 | 13,8 ± 1,3          | 9,4         |
| B                | 23 | 42,4 ± 2            | 4,7         | B                | 16 | 38,5 ± 3,5          | 9,1         |

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

**D. Exactitude**

| TEST DE RECUPERATION                    |                     |
|-----------------------------------------|---------------------|
| 25OH-Vit.D <sub>3</sub> ajoutée (ng/ml) | Récupération<br>(%) |
| 0                                       | 100                 |
| 25                                      | 105                 |
| 50                                      | 105                 |
| 100                                     | 91                  |
| 25OH-Vit.D <sub>2</sub> ajoutée (ng/ml) | Récupération<br>(%) |
| 0                                       | 100                 |
| 25                                      | 101                 |
| 50                                      | 101                 |
| 100                                     | 96                  |

| TEST DE DILUTION |                               |                                 |                     |
|------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Dilution         | Concent. théorique<br>(ng/ml) | Concent.<br>mesurée.<br>(ng/ml) | Récupération<br>(%) |
| 1/1              | 102,8                         | 102,8                           | 100                 |
| 1/2              | 51,4                          | 60,1                            | 117                 |
| 1/4              | 25,7                          | 25,6                            | 100                 |
| 1/8              | 12,9                          | 12,9                            | 100                 |
| 1/1              | 80,3                          | 80,3                            | 100                 |
| 1/2              | 40,2                          | 42,0                            | 105                 |
| 1/4              | 20,1                          | 24,7                            | 123                 |
| 1/8              | 10,0                          | 10,9                            | 108                 |

**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 10 ou 20 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

| DELAI         |            |             |             |
|---------------|------------|-------------|-------------|
|               | 0' (ng/ml) | 10' (ng/ml) | 20' (ng/ml) |
| échantillon 1 | 13,5       | 13,6        | 11,7        |
| échantillon 2 | 39,5       | 39,3        | 37,4        |

**XV. VALEURS ATTENDUES**

L'alimentation, la race, la saison et l'âge ont une influence sur les taux de 25OH.Vitamin D<sub>3</sub>. 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 12,9 ng/mL, la fourchette allant de 6,6 à 24,5 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. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.  
Cette trousse contient de l'<sup>125</sup>I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV).  
Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.  
Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.  
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.  
Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne 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.

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.(2004)

Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.  
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.

7. HEANEY R.P. (2010)  
**Defining deficiency of vitamin D .**  
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.

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

9. TAHA N. M. , VIETH R.(2010)  
**The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .**  
Clinical Laboratory International, November 2010, vol.34 : 28-30

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

|                                                                       | ACTIVITÉ<br>TOTALE<br>µl                                                                  | CALIBRA-<br>TEURS<br>µl | ÉCHANTIL-<br>LON(S)<br>CONTROLE(S)<br>µl |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|
| <b>PRÉTRAITEMENT</b><br>(dans des tubes en verre ou en polypropylène) |                                                                                           |                         |                                          |
| Calibrateurs, Échantillons, Contrôles                                 | -                                                                                         | 100                     | 100                                      |
| Solution de prétraitement                                             | -                                                                                         | 50                      | 50                                       |
| Tampon de prétraitement                                               | -                                                                                         | 200                     | 200                                      |
| Incubation                                                            | Vortex<br>30 à 35 minutes à 37-40°C au bain-marie (le volume à incuber doit être immergé) |                         |                                          |
| Solution de dilution                                                  | -                                                                                         | 1000                    | 1000                                     |
|                                                                       | Vortex                                                                                    |                         |                                          |
| <b>INCUBATION</b><br>(dans les tubes tapissés)                        |                                                                                           |                         |                                          |
| Calibrateurs, Échantillons, Contrôles prétraités                      | -                                                                                         | 500                     | 500                                      |
| Traceur                                                               | 50                                                                                        | 50                      | 50                                       |
| Incubation                                                            | 2 heures à température ambiante en agitant (300 à 700 TPM).                               |                         |                                          |
| Séparation<br>Solution de lavage de travail                           | -<br>-                                                                                    |                         | aspirer<br>2,0                           |
| Séparation<br>Solution de lavage de travail                           | -<br>-                                                                                    |                         | aspirer<br>2,0                           |
| Séparation                                                            | -                                                                                         |                         | aspirer                                  |
| Comptage                                                              | Temps de comptage des tubes: 60 secondes                                                  |                         |                                          |

|                                            |                               |                                  |
|--------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Numéro de catalogue DIAsource :<br>KIP1971 | Numéro de P.I.:<br>1700528/fr | Numéro de révision :<br>110324/1 |
|--------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|



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

## 25OH Vitamin D total -RIA-CT

### **I. USO DEL KIT**

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro della 25-idrossivitamina D2 e D3 (25-OH-D2 e 25-OH-D3) nel siero o nel plasma eparinizzato.

### **II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE**

- A. Nome commerciale:** DIAsource 25OH Vitamin D total -Ria-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1971 : 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**

Con il termine "Vitamina D" si intendono genericamente la Vitamina D2, o ergocalciferolo, e la Vitamina D3, o colecalciferolo.

L'esposizione della cute ai raggi ultravioletti induce naturalmente la sintesi di Vitamina D3 da parte dell'organismo umano.

La Vitamina D3 viene metabolizzata, principalmente nel fegato, a 25-idrossivitamina D3 (25-OH-D3), la principale forma di Vitamina D circolante nell'organismo.

La 25-OH-D3 è un precursore di altri metaboliti della Vitamina D, oltre ad avere essa stessa un'attività limitata.

Il suo derivato più attivo è la 1,25-idrossivitamina D3, prodotta dal rene (o dalla placenta) in seguito a idrossilazione della 25-OH-D3 in posizione 1 $\alpha$ .

La 25-OH-Vitamina D stimola l'assorbimento intestinale sia del calcio che del fosforo, oltre al riassorbimento e alla mineralizzazione delle ossa.

La 25-OH-Vitamina D può anche essere attiva in altri tessuti responsabili del trasporto del calcio (placenta, rene, ghiandola mammaria, ecc.) e nelle ghiandole endocrine (paratiroidi, beta cellule, ecc.).

Le Vitamine D3 e D2 sono assimilabili anche da fonti alimentari e dalla supplementazione con integratori alimentari.

Poiché la Vitamina D2 è metabolizzata in modo simile alla Vitamina D3, entrambe queste vitamine contribuiscono allo stato complessivo di Vitamina D nell'organismo umano.

Questo è il motivo per cui è molto importante misurare ugualmente entrambe le forme di 25-OH-Vitamina D per effettuare una corretta diagnosi di carenza, insufficienza o intossicazione da Vitamina D.

La carenza di Vitamina D è un importante fattore di rischio per rachitismo, osteomalacia, osteoporosi senile, cancro ed esiti sfavorevoli di una gravidanza.

La misurazione di entrambe le forme di 25-OH-Vitamina D è indispensabile anche quando è necessario determinare la causa di un'anomala concentrazione sierica di calcio in un paziente.

È stato dimostrato che l'intossicazione da Vitamina D causa danni renali e tissutali.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Inizialmente calibratori, controlli e campioni (siero o plasma eparinizzato) vengono pre-trattati affinché la 25-OH-Vitamina D<sub>2</sub> e la 25-OH-Vitamina D<sub>3</sub> vengano rilasciate dalla proteina di legame della Vitamina D (DBP). Una quantità fissa di 25-OH-Vitamina D marcata con <sup>125</sup>I compete con le 25-OH Vitamine D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub> presenti nei campioni, controlli e calibratori trattati, per il legame a un numero definito di siti rappresentati da anticorpi monoclonali specifici immobilizzati sulla superficie inferiore e interna delle provette di plastica. Dopo 2 ore di incubazione a temperature ambiente in un agitatore per provette, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione. Le provette vengono quindi lavate due volte e nuovamente sottoposte ad aspirazione. Si costruisce poi una curva di calibrazione e si calcolano le concentrazioni totali delle 25-OH-Vitamine D (D<sub>2</sub> e D<sub>3</sub>) mediante interpolazione della dose sulla curva di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

| Reattivi                                                                                                                                                                                                         | Quantità                          | Codice colore | Volume di ricostituzione                                        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------------|
| <div> Provette sensibilizzate con anticorpo monoclonale anti 25OH-Vitamina.D<sub>2</sub> e anti 25OH-Vitamina.D<sub>3</sub></div> | 2 x 48                            | verde         | Pronte per l'uso                                                |
| <div><div>Ag<div><sup>125</sup>I</div></div>25-OH-Vit D marcata con <sup>125</sup>Iodio (qualità per HPLC).</div>                                                                                                | 1 flacone liofilizzati<br>160 kBq | rosso         | Aggiungere 6 ml di tampone per il marcato                       |
| <div><div>CAL0</div>Calibratore 0: siero di cavallo e tampone fosfato con gentamicina</div>                                                                                                                      | 1 flacone liofilizzati            | giallo        | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata                           |
| <div><div>CALN</div>Calibratori 1-5 in siero di cavallo e tampone fosfato con gentamicina (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi)</div>                            | 5 flaconi liofilizzati            | giallo        | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata                           |
| <div><div>WASH</div><div>SOLN</div><div>CONC</div>Tampone di lavaggio (Tris – HCl)</div>                                                                                                                         | 1 flacone<br>10 ml                | bruno         | Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico |
| <div><div>CONTROL</div><div>N</div>Controlli N. 1 e 2, in siero umano, contenente timolo</div>                                                                                                                   | 2 flaconi liofilizzati            | argento       | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata                           |
| <div><div>TRACER</div><div>BUF</div>Tampone per il marcato con caseina e gentamicina</div>                                                                                                                       | 1 flacone<br>7 ml                 | rosso         | Pronto per l'uso                                                |
| <div><div>PRE</div><div>SOLN</div>Soluzione di pre-trattamento con Proclin 300 (0,1%)</div>                                                                                                                      | 1 flacone liofilizzati            | verde         | Aggiungere 5 ml di acqua distillata                             |
| <div><div>PRE</div><div>BUF</div>Tampone di pre-trattamento con sodio azide (&lt;0,1%)</div>                                                                                                                     | 1 flacone<br>20 ml                | blu           | Pronto per l'uso                                                |
| <div><div>DIL</div><div>SOLN</div>Soluzione di diluizione con sodio azide (&lt;0,1%)</div>                                                                                                                       | 1 flacone<br>100 ml               | nero          | Pronto per l'uso                                                |

**Nota:** Utilizzare il calibratore 0 per diluire i campioni con valori superiori a quelli del calibratore maggiore prima della fase di pre-trattamento. 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:

1. Acqua distillata

2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl e 1 ml (si raccomanda l'uso di pipette accurate con puntali di plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex
4. Agitatore magnetico
5. Agitatore per provette (da 300 a 700 rpm)
6. Provette di vetro (12 x 75 mm) o di polipropilene (ad es.: Falcon 352063) per la fase di pre-trattamento.
7. Un bagno termostato a 37 °C
8. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi
9. Dispositivo di aspirazione e lavaggio.
10. Contatore gamma con finestra per <sup>125</sup>I (efficienza minima 70%).

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. Marcato :** Ricostituire il marcato liofilizzato con 6 ml di tampone per il marcato.
- D. Soluzione di pre-trattamento:** la soluzione di pretrattamento va ricostituita al momento con 5 ml di acqua distillata.
- E. 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. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- 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, il marcato è stabile fino alla data di scadenza, se mantenuto a -20 °C nel suo flacone originale ben chiuso (un solo scongelamento).
- Dopo il primo utilizzo, la soluzione di pre-trattamento è stabile per 2 mesi a -20 °C (un solo scongelamento).
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- **Non usare plasma con EDTA.**
- 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 = 0,997 siero, R = 0,91.
- Conservare i campioni di siero e di plasma eparinizzato a 2-8 °C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a –20 °C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo

X. METODO DEL DOSAGGIO

- A. 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

B1 Pre-trattamento :

1. Etichettare una provetta di vetro o di polipropilene per ciascun calibratore, controllo e campione.
2. Vortexare brevemente calibratori, controlli e campioni e distribuire 100 µl di ognuno di essi nella rispettiva provetta.
3. Distribuire 50 µl di soluzione di pre-trattamento in ogni provetta.
4. Distribuire 200 µl di tampone di pre-trattamento in ogni provetta.
5. Vortexare brevemente le provette, coprirle e incubare per 30 minuti a 37 °C nel bagno termostato.

- ! Attenzione: durante questa fase il volume di incubazione deve risultare completamente immerso nel bagno.**  
**! Rispettare il tempo di incubazione: sono necessari 30 - 35 minuti.**  
**! Rispettare la temperatura di incubazione: sono necessari 37 - 40 °C.**
6. Distribuire 1 ml di Soluzione di diluizione in ogni provetta e vortexare brevemente.

**B2 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.
- Distribuire 500 µl di calibratore o controllo o campione pretrattati.
- Aggiungere 50 µl di 25-OH-vitamina D marcata con <sup>125</sup>Iodio in ciascuna provetta, incluse quelle per l'attività totale.
- Agitare a mano delicatamente il portaprovette per far fuoriuscire tutte le bolle d'aria intrappolate.
- 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. Assicurarsi che la punta dell'aspiratore raggiunga il fondo della provetta sensibilizzata per rimuovere tutto il liquido.
- Lavare le provette utilizzando 2 ml di tampone di lavaggio (tranne quelle per l'attività totale) ed eseguire l'aspirazione. Evitare che si formi schiuma durante l'utilizzo del tampone di lavaggio.
- Lavare ancora le provette con 2 ml di soluzione di lavaggio (eccetto quelle per le conte totali) e aspirare.
- Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

**XI. CALCOLO DEI RISULTATI**

- Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
- 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).

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

- 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 25-OH-Vitamina D, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
- È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati utilizzare la curva a 4 parametri.
- Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 25-OH-Vitamina D totale.
- Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T della 25-OH-Vitamina D.

**XII. CARATTERISTICHE TIPICHE**

I dati sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

| 25-OH-Vitamina D totale |           | cpm   | B/Bo (%) |
|-------------------------|-----------|-------|----------|
| Attività totale         |           | 45756 |          |
| Calibratore             | 0,0 ng/ml | 21958 | 100,0    |
|                         | 2 ng/ml   | 17916 | 81,6     |
|                         | 6 ng/ml   | 14170 | 64,5     |
|                         | 15 ng/ml  | 10710 | 48,8     |
|                         | 55 ng/ml  | 4949  | 22,5     |
|                         | 120 ng/ml | 3161  | 14,4     |

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 25-OH-Vitamina D totale con cpm inferiori alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 0,4 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 D <sub>3</sub>                    | 100                  |
| 25OH-Vitamin D <sub>2</sub>                    | 95                   |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>3</sub>  | 4                    |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>2</sub>  | 4                    |
| Vitamin D <sub>3</sub>                         | <0,3                 |
| Vitamin D <sub>2</sub>                         | <0,3                 |
| 24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>3</sub> | ≥100                 |

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

**C. Precisione**

| INTRA SAGGIO |    |                     |             | INTER SAGGIO |    |                     |             |
|--------------|----|---------------------|-------------|--------------|----|---------------------|-------------|
| Campio<br>ne | N  | <X> ± SD<br>(ng/ml) | C.V.<br>(%) | Campio<br>ne | N  | <X> ± SD<br>(ng/ml) | C.V.<br>(%) |
| A            | 23 | 14,7 ± 0,8          | 5,4         | A            | 16 | 13,8 ± 1,3          | 9,4         |
| B            | 23 | 42,4 ± 2            | 4,7         | B            | 16 | 38,5 ± 3,5          | 9,1         |

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

**D. Accuratezza**

| TEST DI RECUPERO                            |                 |
|---------------------------------------------|-----------------|
| 25OH-Vit.D <sub>3</sub> aggiunta<br>(ng/ml) | Recupero<br>(%) |
| 0                                           | 100             |
| 25                                          | 105             |
| 50                                          | 105             |
| 100                                         | 91              |
| 25OH-Vit.D <sub>2</sub> aggiunta<br>(ng/ml) | Recupero<br>(%) |
| 0                                           | 100             |
| 25                                          | 101             |
| 50                                          | 101             |
| 100                                         | 96              |

| TEST DI DILUZIONE |                                      |                                       |                 |
|-------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------|
| Diluizione        | Concentrazione<br>teorica<br>(ng/ml) | Concentrazione<br>misurata<br>(ng/ml) | Recupero<br>(%) |
| 1/1               | 102,8                                | 102,8                                 | 100             |
| 1/2               | 51,4                                 | 60,1                                  | 117             |
| 1/4               | 25,7                                 | 25,6                                  | 100             |
| 1/8               | 12,9                                 | 12,9                                  | 100             |
| 1/1               | 80,3                                 | 80,3                                  | 100             |
| 1/2               | 40,2                                 | 42,0                                  | 105             |
| 1/4               | 20,1                                 | 24,7                                  | 123             |
| 1/8               | 10,0                                 | 10,9                                  | 108             |

**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 10 e 20 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

| TEMPO TRASCORSO |            |             |             |
|-----------------|------------|-------------|-------------|
|                 | 0' (ng/ml) | 10' (ng/ml) | 20' (ng/ml) |
| campioni 1      | 13,5       | 13,6        | 11,7        |
| campioni 2      | 39,5       | 39,3        | 37,4        |

XV. VALORI ATTESI

È noto che l’apporto dietetico, la razza, la stagione e l’età influiscono sui normali livelli di 25OH.Vitamin.D<sub>3</sub>, 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 12,9 ng/mL, variabile da 6,6 a 24,5 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 <sup>125</sup>I (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.  
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. 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.

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.(2004)  
**Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.**  
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.

7. HEANEY R.P. (2010)  
**Defining deficiency of vitamin D .**  
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.

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

9. TAHA N. M. , VIETH R.(2010)  
**The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .**  
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

|                                                                                         | ATTIVIT<br>À<br>TOTALE<br>µl                                                                                         | CALIBRATO<br>RE<br>µl                          | CAMPIONI<br>CONTROLLI<br>µl |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|
| <b><u>PRE-TRATTAMENTO</u></b><br>(in provette di vetro o di polipropilene)              |                                                                                                                      |                                                |                             |
| Calibratore, Campioni,<br>Controlli                                                     | -                                                                                                                    | 100                                            | 100                         |
| Soluzione di pre-<br>trattamento                                                        | -                                                                                                                    | 50                                             | 50                          |
| Tampone di pre-<br>trattamento                                                          | -                                                                                                                    | 200                                            | 200                         |
| Incubazione                                                                             | Agitare (Vortex)<br>30-35 minuti a 37-40 °C in bagno termostato (il<br>volume di incubazione deve risultare immerso) |                                                |                             |
| Soluzione di diluizione                                                                 | -                                                                                                                    | 1000                                           | 1000                        |
|                                                                                         | Agitare (Vortex)                                                                                                     |                                                |                             |
| <b><u>INCUBAZIONE</u></b><br>(in provette sensibilizzate)                               |                                                                                                                      |                                                |                             |
| Calibratore, Campioni,<br>Controlli pretrattati                                         | -                                                                                                                    | 500                                            | 500                         |
| Marcato                                                                                 | 50                                                                                                                   | 50                                             | 50                          |
| Incubazione                                                                             | Incubare 2 ore a temperatura ambiente sotto agitazione<br>(300-700 rpm).                                             |                                                |                             |
| Separazione<br>Tampone di lavaggio<br>Separazione<br>Tampone di lavaggio<br>Separazione | -<br>-<br>-<br>-<br>-                                                                                                | aspirare<br>2,0<br>aspirare<br>2,0<br>aspirare |                             |
| Conteggio                                                                               | Contare le provette per 1 minuto                                                                                     |                                                |                             |

|                                                 |                            |                               |
|-------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Numero di catalogo di<br>DIASource :<br>KIP1971 | P.I. numero:<br>1700528/it | Revisione numero:<br>110324/1 |
|-------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

## 25OH Vitamin D total -RIA-CT

### **I. INSTRUCCIONES DE USO**

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de la 25-hidroxivitamina D2 y D3 (25-OH-D2 y 25-OH-D3) en suero o plasma heparinizado.

### **II. INFORMACIÓN GENERAL**

- A. Nombre:** DIAsource 25OH- Vitamin D total -Ria-CT
- B. Número de Catálogo:** KIP1971 : 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**

Vitamina D es el término genérico usado para designar a la vitamina D2 o ergocalciferol y la Vitamina D3 o colecalciferol.

Los humanos producen vitamina D3 en forma natural cuando la piel está expuesta a los rayos ultravioleta del sol.

La vitamina D3 es metabolizada principalmente en el hígado produciendo 25-Hidroxivitamina D3 (25 OH D3) que es la forma principal de vitamina D circulando en el organismo.

25 OH D3 es la precursora para otros metabolitos de la vitamina D y tiene una actividad limitada por si sola.

El derivado más activo es la 1,25-Hidroxivitamina D3, producida en el riñón (o placenta) por la 1 $\alpha$ -hidroxilación de 25OHD3.

La 25OHVitamina D estimula la absorción intestinal del calcio y el fósforo y también la reabsorción y mineralización ósea.

La 25OH Vitamina D también puede estar activa en otros tejidos siendo responsable del transporte de calcio (placenta, riñón, glándula mamaria...) y glándula endocrina (glándula paratiroides, células beta...).

La Vitamina D3 y Vitamina D2 también están disponibles por ingestión a través de los alimentos o suplementos dietéticos.

Como la Vitamina D2 se metaboliza en forma similar a la vitamina D3, ambas contribuyen al estado general de la Vitamina D de un individuo.

Por esta razón es muy importante medir ambos tipos de 25 OH Vitamina D de la misma forma para un diagnóstico correcto de deficiencia, insuficiencia o intoxicación.

La deficiencia de vitamina D es un factor de riesgo importante en raquitismo, osteomalacia, osteoporosis senil, cáncer y el resultado del embarazo.

La medición de ambos tipos de 25 OH Vitaminas D también es necesario para determinar la causa de concentraciones anormales de calcio en el suero de pacientes.

Se ha demostrado que la intoxicación con Vitamina D puede causar daño en el riñón y tejidos.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Al comienzo los calibradores, controles y muestras (suero o plasma heparinizado) son pretratados para liberar 25OH Vitamina D<sub>2</sub> y 25OH Vitamina D<sub>3</sub> de la Proteína de Unión a Vitamina D (DBP). Una cantidad fija de 25OH Vitamin D marcado con <sup>125</sup>I compite con la 25OH Vitamina D<sub>2</sub> y la 25OH Vitamina D<sub>3</sub> de las muestras, controles o calibradores tratados, por una cantidad fija de sitios para un anticuerpo monoclonal específico, inmovilizados en la superficie interna e inferior de los tubos plásticos. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente en un agitador de tubos, una etapa de aspiración termina la reacción de competencia. Luego los tubos se lavan dos veces y se aspiran nuevamente. Se dibuja una curva de calibración y el total de las concentraciones de las 25 OH Vitaminas D (D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>) de las muestras se determinan por interpolación de dosis usando la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

| Reactivos                                                                                                                                                                                       | Cantidad         | Código de Color  | Reconstitución                |                 |                                 |                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|  Tubos recubiertos con anti 25OH-Vitamin.D <sub>2</sub> y 25OH-Vitamin.D <sub>3</sub> (anticuerpos monoclonales) | 2 x 48           | verde            | Listo para uso                |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>Ag</td><td><sup>125</sup>I</td></tr></table><br>25OH Vitamina D marcado con <sup>125</sup> Yodo (grado HPLC).                                                         | Ag               | <sup>125</sup> I | 1 vial liofilizado<br>160 kBq | rojo            | Añadir 6 ml del tampón trazador |                                                              |
| Ag                                                                                                                                                                                              | <sup>125</sup> I |                  |                               |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table><br>Calibrador 0: suero de caballo y 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><br>Calibradores 1-5 en suero de caballo y 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>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table><br>Solución de lavado (Tris – HCl)                                                                                   | WASH             | SOLN             | CONC                          | 1 vial<br>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><br>Controles - N = 2 en suero humano y timol                                                                                      | CONTROL          | N                | 2 viales liofilizados         | plateado        | Añadir 0,5 ml de agua destilada |                                                              |
| CONTROL                                                                                                                                                                                         | N                |                  |                               |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table><br>Tampón trazador con caseína y gentamicina                                                                                     | TRACER           | BUF              | 1 vial<br>7 ml                | rojo            | Listo para uso                  |                                                              |
| TRACER                                                                                                                                                                                          | BUF              |                  |                               |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table><br>Solución para pretratamiento con Proclina 300 (0.1 %)                                                                           | PRE              | SOLN             | 1 vial liofilizado            | verde           | Añadir 5 ml de agua destilada   |                                                              |
| PRE                                                                                                                                                                                             | SOLN             |                  |                               |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>PRE</td><td>BUF</td></tr></table><br>Tampón para pretratamiento con azida de sodio (<0.1%)                                                                            | PRE              | BUF              | 1 vial<br>20 ml               | azul            | Listo para uso                  |                                                              |
| PRE                                                                                                                                                                                             | BUF              |                  |                               |                 |                                 |                                                              |
| <table border="1"><tr><td>DIL</td><td>SOLN</td></tr></table><br>Solución de Dilución con azida de sodio (<0.1%)                                                                                 | DIL              | SOLN             | 1 vial<br>100 ml              | negro           | Listo para uso                  |                                                              |
| DIL                                                                                                                                                                                             | SOLN             |                  |                               |                 |                                 |                                                              |

**Nota :** Para diluciones de muestras con valores superiores al calibrador más alto antes de la etapa de pretratamiento, 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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 µl, 100µl, 200 µl, 500 µl y 1 ml (se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas plásticas)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos (300 a 700 rpm)

6. Tubos de vidrio (12 x 75 mm) o tubos de polipropileno (por ejemplo: Falcon 352063) para la etapa de pretratamiento.
7. Un baño maría a 37°C
8. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
9. Sistema de aspiración (opcional)
10. Contador de radiaciones gamma para medir I<sup>125</sup> (mínima eficiencia 70%)

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. Trazador :** reconstituir el trazador liofilizado con 6 ml de tampón trazador.
- D. Solución de pretratamiento:** Reconstituir inmediatamente antes de usar la solución de pretratamiento liofilizada con 5 ml de agua destilada.
- E. 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, alícuotar y guardar a -20°C por 3 meses máximo. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se mantiene en el vial original bien tapado a -20°C (descongelado una vez).
- Después del primer uso, la solución de pretratamiento es estable por 2 meses a -20°C (descongelado una vez)
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- **No use plasma con EDTA.**
- 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 = 0,997 Suero, R = 0,91.
- Las muestras de suero y de plasma heparinizado deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 horas, almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

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**
- B1 Pretratamiento :**

1. Marque un tubo de vidrio o polipropileno para cada calibrador, control y muestra.
  2. Brevemente agite en un vortex los calibradores, controles y muestras y dispense 100 µl de cada uno en los tubos respectivos.
  3. Dispense 50 µl de solución de pretratamiento en cada tubo.
  4. Dispense 200 µl de tampón de pretratamiento en cada tubo.
  5. Brevemente agite en un vortex los tubos, cúbralos e incube 30 minutos a 37°C en baño maría.
- ! Atención el volumen a incubar debe quedar completamente sumergido durante esta etapa.**
- ! Respete el tiempo de incubación: 30 - 35 minutos son necesarios.**
- ! Respete la temperatura de incubación: 37 - 40 °C son necesarios.**

- Dispense 1 ml Solución de Dilución en cada tubo y agite brevemente en un vortex

**B2 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.
- Dispensar 500µl de muestras o calibradores o controles pretratados.
- Añadir 50 µl de 25OH Vitamina D marcado con <sup>125</sup>Yodo a cada tubo, incluyendo las Cuentas Totales.
- Agitar la gradilla con tubos suavemente con la mano para liberar las burbujas de aire atrapadas.
- 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 con 2 ml de Solución de lavado (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
- Lavar los tubos nuevamente con 2 ml de Solución de lavado (excepto los de cuentas totales) y aspirar.
- 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**

- Calcular la media de los duplicados.
- Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión determinada al punto cero (0) del calibrador de acuerdo con la siguiente formula:

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador o muestra)}}{\text{Cuentas ( Calibrador Cero )}} \times 100$$

- Utilizando papel 3 ciclo semilogaritmico o logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada punto del calibrador frente a las concentraciones de la 25OH vitamina D de cada calibrador, rechazando los puntos externos.
- 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”.
- Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones totales de la 25OH vitamina D desde la curva de calibración.
- El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de la 25OH vitamina 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 Vitamin D total |           | cpm   | B/Bo (%) |
|----------------------|-----------|-------|----------|
| Cuentas Totales      |           | 45756 |          |
| Calibrador           | 0,0 ng/ml | 21958 | 100,0    |
|                      | 2 ng/ml   | 17916 | 81,6     |
|                      | 6 ng/ml   | 14170 | 64,5     |
|                      | 15 ng/ml  | 10710 | 48,8     |
|                      | 55 ng/ml  | 4949  | 22,5     |
|                      | 120 ng/ml | 3161  | 14,4     |

**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 total de 25OH-Vitamina D, dos desviaciones estándares debajo de la media de cuentas cuando el enlace era cero, fue de 0,4 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 <sub>3</sub>                    | 100                  |
| 25OH-Vitamin D <sub>2</sub>                    | 95                   |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>3</sub>  | 4                    |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>2</sub>  | 4                    |
| Vitamin D3                                     | <0,3                 |
| Vitamin D2                                     | <0,3                 |
| 24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D <sub>3</sub> | ≥100                 |

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

**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                      | 23 | 14,7 ± 0,8       | 5,4    | A                      | 16 | 13,8 ± 1,3       | 9,4    |
| B                      | 23 | 42,4 ± 2         | 4,7    | B                      | 16 | 38,5 ± 3,5       | 9,1    |

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

**D. Exactitud**

| TEST DE RECUPERACIÓN                    |                |
|-----------------------------------------|----------------|
| 25OH-Vit.D <sub>3</sub> añadido (ng/ml) | Recuperado (%) |
| 0                                       | 100            |
| 25                                      | 105            |
| 50                                      | 105            |
| 100                                     | 91             |
| 25OH-Vit.D <sub>2</sub> añadido (ng/ml) | Recuperado (%) |
| 0                                       | 100            |
| 25                                      | 101            |
| 50                                      | 101            |
| 100                                     | 96             |

| TEST DILUCIÓN          |                          |                         |                |
|------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------|
| Dilución de la muestra | Concent. Teórica (ng/ml) | Concent. Medida (ng/ml) | Recuperado (%) |
| 1/1                    | 102,8                    | 102,8                   | 100            |
| 1/2                    | 51,4                     | 60,1                    | 117            |
| 1/4                    | 25,7                     | 25,6                    | 100            |
| 1/8                    | 12,9                     | 12,9                    | 100            |
| 1/1                    | 80,3                     | 80,3                    | 100            |
| 1/2                    | 40,2                     | 42,0                    | 105            |
| 1/4                    | 20,1                     | 24,7                    | 123            |
| 1/8                    | 10,0                     | 10,9                    | 108            |

**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 10 y 20 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

| TIEMPO DE ESPERA |            |             |             |
|------------------|------------|-------------|-------------|
|                  | 0' (ng/ml) | 10' (ng/ml) | 20' (ng/ml) |
| Muestra 1        | 13,5       | 13,6        | 11,7        |
| Muestra 2        | 39,5       | 39,3        | 37,4        |

XIV. VALORES ESPERADOS

La alimentación, la raza, la estación y la edad pueden influenciar los niveles normales de 25OH.Vitamin.D<sub>3</sub>. 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 12.9 ng/mL, con un rango entre 6,6 al 24,5 ng/mL (basado 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.

XV. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad  
Para uso solo en diagnóstico in vitro.  
Este kit contiene I<sup>125</sup> (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.  
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.  
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.

XVI. 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.(2004)  
**Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.**  
Am. J. Clin. Nutr., 80:16788S-1688S.

7. HEANEY R.P. (2010)  
**Defining deficiency of vitamin D .**  
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.

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

9. TAHA N. M. , VIETH R.(2010)  
**The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .**  
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

XVII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

|                                                               | CUENTAS<br>TOTALES<br>(µl)                                                                     | CALIBRADO<br>RES<br>(µl) | MUESTRA(S)<br>CONTROL(ES)<br>(µl) |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <b>PRETRATAMIENTO</b><br>(en tubos de vidrio o polipropileno) |                                                                                                |                          |                                   |
| Calibradores, Muestras, controles                             | -                                                                                              | 100                      | 100                               |
| Solución para pretratamiento                                  | -                                                                                              | 50                       | 50                                |
| Tampón para pretratamiento                                    | -                                                                                              | 200                      | 200                               |
| Incubación                                                    | Vortex<br>30-35 minutos a 37-40°C en un baño maría (el volumen a incubar debe estar sumergido) |                          |                                   |
| Solución de Dilución                                          | -                                                                                              | 1000                     | 1000                              |
|                                                               | Vortex                                                                                         |                          |                                   |
| <b>INCUBACIÓN</b><br>(en tubos recubiertos)                   |                                                                                                |                          |                                   |
| Calibradores, Muestras, controles pretratados                 | -                                                                                              | 500                      | 500                               |
| Trazador                                                      | 50                                                                                             | 50                       | 50                                |
| Incubación                                                    | 2 horas a temperatura ambiente en un agitador (300-700 RPM).                                   |                          |                                   |
| Separación<br>Solución de Lavado de Trabajo                   | -<br>-                                                                                         |                          | aspirar<br>2,0                    |
| Separación<br>Solución de Lavado de Trabajo                   | -<br>-                                                                                         |                          | aspirar<br>2,0                    |
| Separación                                                    | -                                                                                              |                          | aspirar                           |
| Contaje                                                       | Contar los tubos durante 60 segundos                                                           |                          |                                   |

|                                    |                             |                           |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| DIAsource Catalogo Nr :<br>KIP1971 | P.I. Numero :<br>1700528/es | Revisión nr :<br>110324/1 |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|



Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

## 25OH Vitamin D total -RIA-CT

### I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την in vitro ποσοτική μέτρηση της 25-υδροξυβιταμίνης D2 και D3 (25-OH-D2 και 25-OH-D3 ) σε ορό ή ηπαρινισμένο πλάσμα.

### II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

A. Εμπορική ονομασία: Kit 25OH-Vitamin D total -Ria-CT της DAsource

B. Αριθμός καταλόγου: KIP1971 : 96 εξετάσεις

Γ. Κατασκευάζεται από την: DAsource 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

Βιταμίνη D είναι η κοινή ονομασία για την βιταμίνη D2 ή εργοκαλσιφερόλη και τη βιταμίνη D3 ή χοληκαλσιφερόλη.

Ο άνθρωπος οργανισμός παράγει φυσιολογικά βιταμίνη D3 όταν το δέρμα εκτίθεται σε υπεριώδη ηλιακή ακτινοβολία.

Η βιταμίνη D3 μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ σε 25-υδροξυβιταμίνη D3 (25 OH D3), που αποτελεί την κύρια κυκλοφορούσα μορφή βιταμίνης D στο σώμα.

Η 25 OH D3 αποτελεί πρόδρομη ουσία για άλλους μεταβολίτες βιταμίνης D και διαθέτει επίσης περιορισμένη ενεργότητα.

Το πιο δραστικό παράγωγο είναι η 1,25-υδροξυβιταμίνη D3, η οποία παράγεται στους νεφρούς (ή τον πλακούντα) μέσω 1 α -υδροξυλίωσης της 25OHD3.

Η 25OH-βιταμίνη D διεγείρει την εντερική απορρόφηση τόσο του ασβεστίου όσο και του φωσφόρου αλλά και την οστική απορρόφηση και την εναπόθεση αλάτων σε αυτά.

Η 25OH βιταμίνη D ενδεχομένως είναι επίσης ενεργή σε άλλους ιστούς που είναι επιφορτισμένοι με την μεταφορά του ασβεστίου (πλακούντας, νεφροί, μαζικοί αδένες...) και ενδοκρινείς αδένες (παραθυρεοειδείς αδένες, κύτταρα β...).

Η βιταμίνη D3 και η βιταμίνη D2 είναι επίσης διαθέσιμες μέσω πρόσληψης με την τροφή ή διατροφικών συμπληρωμάτων. Η βιταμίνη D2 μεταβολίζεται με παρόμοιο τρόπο όπως η βιταμίνη D3 και επομένως και οι δύο συνεισφέρουν στα επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό.

Γι' αυτόν ακριβώς το λόγο είναι ιδιαίτερα σημαντική η μέτρηση και των δύο μορφών της 25 OH βιταμίνης D για την ορθή διάγνωση της έλλειψης, ανεπάρκειας ή τοξίνωσης από βιταμίνη D.

Η έλλειψη βιταμίνης D αποτελεί σημαντικό παράγοντα κινδύνου για τη ραχίτιδα, την οστεομαλακία, την οστεοπόρωση του γήρατος, τον καρκίνο και την έκβαση της κύησης.

Η μέτρηση και των δύο μορφών της 25 OH βιταμίνης D απαιτείται επίσης για τον καθορισμό της αιτίας παθολογικών συγκεντρώσεων ασβεστίου στον ορό ασθενών.

Έχει φανεί πως η τοξίνωση από βιταμίνη D οδηγεί σε νεφρικές και ιστικές βλάβες.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Καταρχήν υποβάλλονται σε προκαταρκτική επεξεργασία οι βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα δείγματα (ορός ή ηπαρινισμένο πλάσμα) για την απελευθέρωση 25OH βιταμίνης D<sub>2</sub> και 25OH βιταμίνης D<sub>3</sub> από την δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D (DBP). Μία συγκεκριμένη ποσότητα σημασμένης με <sup>125</sup>I, 25OH βιταμίνης D ανταγωνίζεται τη 25OH βιταμίνη D<sub>2</sub> και τη 25OH βιταμίνη D<sub>3</sub> από δείγματα, υλικά ελέγχου και βαθμονομητές που έχουν υποβληθεί σε επεξεργασία για συγκεκριμένη ποσότητα θέσεων ενός ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος που έχουν καθηλωθεί στην κατώτερη και έσω επιφάνεια πλαστικών σωληναρίων. Έπειτα από επώαση 2 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα σωληναρίων, ένα βήμα αναρρόφησης τερματίζει την αντίδραση ανταγωνισμού. Κατόπιν τα σωληνάρια υποβάλλονται δύο φορές σε πλύση και αναρροφώνται ξανά. Σχεδιάζεται μία καμπύλη βαθμονόμησης και οι συνολικές συγκεντρώσεις 25 OH βιταμίνης D (D<sub>2</sub> και D<sub>3</sub>) των δειγμάτων προσδιορίζονται με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης .

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

| Αντιδραστήρια                                                                                                                                                                              | Ποσότητα                   | Χρωματικός κωδικός | Ανασύσταση                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| <div> Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι- 25OH-βιταμίνη.D<sub>2</sub> and αντι-25OH-βιταμίνη.D<sub>3</sub></div> | 2 x 48                     | πράσινο            | Έτοιμο για χρήση                                                         |
| <div><div><div>Ag</div><div><sup>125</sup>I</div></div><div>Σημασμένη με <sup>125</sup>ιώδιο 25OH βιτ. D (βαθμού HPLC).</div></div>                                                        | 1 φιαλίδιο λυοφιλ. 160 kBq | κόκκινο            | Προσθέστε 6 ml του ρυθμιστικού διαλύματος                                |
| <div><div><div>CAL</div><div>0</div></div><div>Βαθμονομητής 0: ορός αλόγου/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με γενταμικίνη</div></div>                                                        | 1 φιαλίδιο λυοφιλ.         | κίτρινο            | Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού                                      |
| <div><div><div>CAL</div><div>N</div></div><div>ορός αλόγου/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με γενταμικίνη (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων)</div></div>                 | 5 φιαλίδια λυοφιλ.         | κίτρινο            | Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού                                      |
| <div><div><div>WASH</div><div>SOLN</div><div>CONC</div></div><div>Διάλυμα πλύσης (Tris – HCl)</div></div>                                                                                  | 1 φιαλίδιο 10 ml           | καφέ               | Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα). |
| <div><div><div>CONTROL</div><div>N</div></div><div>Υλικά ελέγχου 1-2 σε ανθρώπινο ορό με θυμόλη</div></div>                                                                                | 2 φιαλίδια λυοφιλ.         | ασημί              | Προσθέστε 0,5 ml απεσταγμένου νερού                                      |
| <div><div><div>TRACER</div><div>BUF</div></div><div>Ρυθμιστικό διάλυμα ιχνηθέτη με κασεΐνη και γενταμικίνη</div></div>                                                                     | 1 φιαλίδιο 7 ml            | κόκκινο            | Έτοιμο για χρήση                                                         |
| <div><div><div>PRE</div><div>SOLN</div></div><div>Διάλυμα προκαταρκτικής επεξεργασίας με προκλίνη 300 (0,1 %)</div></div>                                                                  | 1 φιαλίδιο λυοφιλ.         | πράσινο            | Προσθέστε 5 ml απεσταγμένου νερού                                        |
| <div><div><div>PRE</div><div>BUF</div></div><div>Ρυθμιστικό διάλυμα προκατ. επεξεργασίας με αζίδιο του νατρίου (&lt;0,1%)</div></div>                                                      | 1 φιαλίδιο 20 ml           | μπλε               | Έτοιμο για χρήση                                                         |
| <div><div><div>DIL</div><div>SOLN</div></div><div>Διάλυμα αραιώσης με αζίδιο του νατρίου (&lt;0,1%)</div></div>                                                                            | 1 φιαλίδιο 100 ml          | μαύρο              | Έτοιμο για χρήση                                                         |

**Σημείωση:** Χρησιμοποιήστε τον Βαθμονομητή 0 για την αραιώση δειγμάτων με τιμές άνω του υψηλότερου βαθμονομητή, πριν από το βήμα προκαταρκτικής επεξεργασίας. Δεν υπάρχει διαθέσιμο διεθνές υλικό αναφοράς.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 50 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl και 1ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)

- Αναμεικτής στροβιλισμού
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αναδευτήρας σωληναρίων (300 έως 700 σ.α.λ.)
- Γυάλινα σωληνάρια (12 x 75 mm) ή σωληνάρια πολυπροπυλενίου (π.χ.: Falcon 352063) για το βήμα προκαταρκτικής επεξεργασίας.
- Λουτρό νερού στους 37°C
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- Συσκευή αναρρόφησης και πλύσης.
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απαριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του <sup>125</sup>I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Ιχνηθέτης:** Ανασυστήστε τον λυοφιλοποιημένο ιχνηθέτη με 6 ml του ρυθμιστικού διαλύματος ιχνηθέτη.
- Διάλυμα προκαταρκτικής επεξεργασίας:** Αμέσως πριν από τη χρήση, ανασυστήστε το λυφιλοποιημένο διάλυμα προκαταρκτικής επεξεργασίας με 5 ml απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκου 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. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη του χρήση, ο ιχνηθέτης είναι σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εάν διατηρείται στο αρχικό, καλά κλεισμένο φιαλίδιο στους -20°C (με μία απόψυξη).
- Μετά την πρώτη του χρήση, το διάλυμα προκαταρκτικής επεξεργασίας είναι σταθερό για 2 μήνες στους -20°C(με μία απόψυξη)
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Μην χρησιμοποιήσετε πλάσμα EDTA.**
- 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 = 0,997 ορού, R = 0,91.
- Τα δείγματα ορού και ηπαρινισμένου πλάσματος πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- 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

B1 Προκαταρκτική επεξεργασία:

- Επισημάνετε ένα γυάλινο σωληνάριο ή ένα σωληνάριο πολυπροπυλενίου για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου και δείγμα.
- Αναδεύστε σύντομα τους βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα δείγματα σε αναδευτήρα vortex, και διανείμετε 100 µl από το καθένα στα αντίστοιχα σωληνάρια.

3.

Διανείμετε 50 μl του διαλύματος προκ. επεξεργασίας σε κάθε σωληνάριο.
4.

Διανείμετε 200 μl του ρυθμιστικού διαλύματος προκαταρκτικής επεξεργασίας σε κάθε σωληνάριο.
5.

Αναδεύστε σύντομα τα σωληνάρια σε αναδευτήρα vortex, καλύψτε τα και επωάστε για 30 λεπτά στους 37°C σε λουτρό νερού.
- !

Προσέξτε ώστε ο όγκος επώασης να έχει εμβαπτιστεί πλήρως κατά τη διάρκεια αυτού του βήματος.

!

Τηρήστε τη διάρκεια επώασης: απαιτούνται 30 - 35 λεπτά.

!

Τηρήστε τη θερμοκρασία επώασης: απαιτούνται 37 - 40 °C.
6.

Διανείμετε 1 ml του διαλύματος αραίωσης σε κάθε σωληνάριο και αναδεύστε σύντομα με αναδευτήρα.

**B2 Επώαση :**

1.

Σημάνετε τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα, υλικό ελέγχου. Για τον προσδιορισμό των συνολικών μετρήσεων, σημάνετε 2 φυσιολογικά σωληνάρια.
2.

Διανείμετε 500 μl βαθμονομητή ή υλικού ελέγχου ή δείγματος που έχει υποβληθεί σε προκαταρκτική επεξεργασία.
3.

Διανείμετε 50 μl της σημασμένης με <sup>125</sup>ιώδιο 25OH βιταμίνης D σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανομένων των μη επιστρωμένων σωληναρίων για τις συνολικές μετρήσεις.
4.

Αναδεύστε ήπια τη θήκη σωληναρίων με το χέρι, για να ελευθερωθούν τυχόν φυσαλίδες αέρα.
5.

Επωάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (300-700 σ.α.λ.).
6.

Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις συνολικές μετρήσεις). Διασφαλίστε πως το άκρο του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα στον επιστρωμένου σωληναρίου, ώστε να αφαιρεθεί όλο το υγρό.
7.

Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (εκτός των συνολικών μετρήσεων) και αναρροφήστε. Αποφύγετε τη δημιουργία αφρού κατά την προσθήκη του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8.

Πλύνετε ξανά τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης (εκτός των συνολικών μετρήσεων) και αναρροφήστε.
9.

Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν κατακόρυφα για δύο λεπτά και αναρροφήστε την υπολειπόμενη σταγόνα υγρού.
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:

B/B0(%) =  $\frac{Metri\acute{\sigma}seiV(Baqmonomht\acute{\iota}V\acute{\iota}deigma)}{Metri\acute{\sigma}seiV(Mhdenik\acute{o}Vbaqmonomht\acute{\iota}V)} \times 100$

3.

Με χρήση ημιλογαριθμικού ή logit-log χαρτιού γραφήματος 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0 (%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 25OH βιταμίνης D 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. Με παρεμβολή των τιμών των δειγμάτων (B/B0 (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις της συνολικής 25OH βιταμίνης D 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 βιταμίνης D (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 Vitamin D total |           | cpm   | B/Bo (%) |
|----------------------|-----------|-------|----------|
| Συνολική μέτρηση     |           | 45756 |          |
| Βαθμονομητής         | 0,0 ng/ml | 21958 | 100,0    |
|                      | 2 ng/ml   | 17916 | 81,6     |
|                      | 6 ng/ml   | 14170 | 64,5     |
|                      | 15 ng/ml  | 10710 | 48,8     |
|                      | 55 ng/ml  | 4949  | 22,5     |
|                      | 120 ng/ml | 3161  | 14,4     |

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 της συνολικής 25OH-βιταμίνης D<sub>3</sub> δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμηση, ήταν 0,4 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 <sub>3</sub>                    | 100                                 |
| 25OH- βιταμίνη D <sub>2</sub>                    | 95                                  |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> - βιταμίνη.D <sub>3</sub>  | 4                                   |
| 1,25(OH) <sub>2</sub> - βιταμίνη.D <sub>2</sub>  | 4                                   |
| βιταμίνη D3                                      | <0,3                                |
| βιταμίνη D2                                      | <0,3                                |
| 24,25(OH) <sub>2</sub> - βιταμίνη.D <sub>3</sub> | ≥100                                |

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

**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                         | 23 | 14,7 ± 0,8         | 5,4      | A                                 | 16 | 13,8 ± 1,3         | 9,4      |
| B                         | 23 | 42,4 ± 2           | 4,7      | B                                 | 16 | 38,5 ± 3,5         | 9,1      |

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

**Δ. Ορθότητα**

| ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ                           |              |
|---------------------------------------------|--------------|
| Προσθεθείσα 25OH-Vit.D <sub>3</sub> (ng/ml) | Ανάκτηση (%) |
| 0                                           | 100          |
| 25                                          | 105          |
| 50                                          | 105          |
| 100                                         | 91           |
| Προσθεθείσα 25OH-Vit.D <sub>2</sub> (ng/ml) | Ανάκτηση (%) |
| 0                                           | 100          |
| 25                                          | 101          |
| 50                                          | 101          |
| 100                                         | 96           |

| ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ  |                               |                                |              |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------|
| Αραίωση δείγματος | Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml) | Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml) | Ανάκτηση (%) |
| 1/1               | 102,8                         | 102,8                          | 100          |
| 1/2               | 51,4                          | 60,1                           | 117          |
| 1/4               | 25,7                          | 25,6                           | 100          |
| 1/8               | 12,9                          | 12,9                           | 100          |
| 1/1               | 80,3                          | 80,3                           | 100          |
| 1/2               | 40,2                          | 42,0                           | 105          |
| 1/4               | 20,1                          | 24,7                           | 123          |
| 1/8               | 10,0                          | 10,9                           | 108          |

**Ε. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δειγματος**

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 10 και 20 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

| ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ |            |             |             |
|--------------|------------|-------------|-------------|
|              | 0' (ng/ml) | 10' (ng/ml) | 20' (ng/ml) |
| δείγμα 1     | 13,5       | 13,6        | 11,7        |
| δείγμα 2     | 39,5       | 39,3        | 37,4        |

#### XIV. ANAMENOMENES TIMES

Η διατροφή, η φυλή, η εποχή και η ηλικία είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα φυσιολογικά επίπεδα της 25OH.Vit.D<sub>3</sub>. 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 12,9 ng/mL, με εύρος μεταξύ 6,6 και 24,5 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.

#### XV. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

##### Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro. Το kit αυτό περιέχει το <sup>125</sup> I (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. 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. Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας. Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά. Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσωρεύσης 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.

#### XVI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 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.(2004)  
**Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.**  
Am. J. Clin. Nutr., 80:16788S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010)  
**Defining deficiency of vitamin D .**  
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.
- HOLICK M.F. (2007)  
**Vitamin D deficiency.**  
N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M. , VIETH R.(2010)  
**The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .**  
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

#### XVII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

|                                                                                                                                                                                                      | ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ<br>ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ<br>μl                                                                              | ΒΑΘΜΟΝ<br>ΟΜΗΤΕΣ<br>μl                               | ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ)<br>ΥΛΙΚΑ<br>ΕΛΕΓΧΟΥ μl |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| ΠΡ. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ<br>(σε γυάλινα σωληνάρια ή<br>σωλην. πολυπροπυλενίου)<br>Βαθμονομητές, Δείγματα,<br>Υλικά ελέγχου<br>Διάλυμα προκαταρκτικής<br>επεξεργασίας<br>Ρυθμ. διάλυμα προκατ.<br>επεξεργασίας | -<br><br>-<br>-                                                                                           | 100<br><br>50<br>200                                 | 100<br><br>50<br>200              |
| Επώαση                                                                                                                                                                                               | Ανάδευση (vortex)<br>30-35 λεπτά στους 37-40°C σε λουτρό νερού (ο όγκος<br>επώασης πρέπει να εμβαπτιστεί) |                                                      |                                   |
| Διάλυμα αραίωσης                                                                                                                                                                                     | -                                                                                                         | 1000                                                 | 1000                              |
|                                                                                                                                                                                                      | Ανάδευση (vortex)                                                                                         |                                                      |                                   |
| ΕΠΩΑΣΗ<br>(σε επιστρωμένα<br>σωληνάρια)<br>Υποβληθέντα σε προκατ.<br>επεξεργασία Δείγματα,<br>Υλικά ελέγχου<br>Ιχνηθέτης                                                                             | -<br><br>50                                                                                               | 500<br><br>50                                        | 500<br><br>50                     |
| Επώαση                                                                                                                                                                                               | 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση (300-<br>700 σ.α.λ.).                                         |                                                      |                                   |
| Διαχωρισμός<br>Διάλυμα πλύσης εργασίας<br>Διαχωρισμός<br>Διάλυμα πλύσης εργασίας<br>Séparation                                                                                                       | -<br>-<br>-<br>-                                                                                          | αναρρόφηση<br>2,0<br>αναρρόφηση<br>2,0<br>αναρρόφηση |                                   |
| Μέτρηση                                                                                                                                                                                              | Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα                                                                    |                                                      |                                   |

|                                     |                             |                              |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Αρ. καταλόγου DIAsource:<br>KIP1971 | Αριθμός P.I.:<br>1700528/el | Αρ. αναθεώρησης:<br>110324/1 |
|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|

|                 | <b><u>Used symbols</u></b>         |
|-----------------|------------------------------------|
|                 | Consult instructions for use       |
|                 | Storage temperature                |
|                 | Use by                             |
| <b>LOT</b>      | Batch code                         |
| <b>REF</b>      | Catalogue number                   |
| <b>CONTROL</b>  | Control                            |
| <b>IVD</b>      | In vitro diagnostic medical device |
|                 | Manufacturer                       |
|                 | Contains sufficient for <n> tests  |
| WASH SOLN CONC  | Wash solution concentrated         |
| CAL 0           | Zero calibrator                    |
| CAL N           | Calibrator #                       |
| CONTROL N       | Control #                          |
| Ag 1251         | Tracer                             |
| Ab 1251         | Tracer                             |
| Ag 1251 CONC    | Tracer concentrated                |
| Ab 1251 CONC    | Tracer concentrated                |
|                 | Tubes                              |
| INC BUF         | Incubation buffer                  |
| ACETONITRILE    | Acetonitrile                       |
| SERUM           | Serum                              |
| DIL SPE         | Specimen diluent                   |
| DIL BUF         | Dilution buffer                    |
| ANTISERUM       | Antiserum                          |
| IMMUNOADSORBENT | Immunoabsorbent                    |
| DIL CAL         | Calibrator diluent                 |
| REC SOLN        | Reconstitution solution            |
| PEG             | Polyethylene glycol                |
| EXTR SOLN       | Extraction solution                |
| ELU SOLN        | Elution solution                   |
| GEL             | Bond Elut Silica cartridges        |
| PRE SOLN        | Pre-treatment solution             |
| NEUTR SOLN      | Neutralization solution            |
| TRACEUR BUF     | Tracer buffer                      |
|                 | Microtiterplate                    |
| Ab HRP          | HRP Conjugate                      |
| Ag HRP          | HRP Conjugate                      |
| Ab HRP CONC     | HRP Conjugate concentrate          |
| Ag HRP CONC     | HRP Conjugate concentrate          |
| CONJ BUF        | Conjugate buffer                   |
| CHROM TMB CONC  | Chromogenic TMB concentrate        |
| CHROM TMB       | Chromogenic TMB solution           |
| SUB BUF         | Substrate buffer                   |
| STOP SOLN       | Stop solution                      |
| INC SER         | Incubation serum                   |
| BUF             | Buffer                             |
| Ab AP           | AP Conjugate                       |
| SUB PNPP        | Substrate PNPP                     |
| BIOT CONJ CONC  | Biotin conjugate concentrate       |
| AVID HRP CONC   | Avidine HRP concentrate            |
| ASS BUF         | Assay buffer                       |
| Ab BIOT         | Biotin conjugate                   |
| Ab              | Specific Antibody                  |
| SAV HRP CONC    | Streptavidin HRP concentrate       |
| NSB             | Non-specific binding               |
| 2nd Ab          | 2nd Antibody                       |
| ACID BUF        | Acidification Buffer               |
| DIST            | Distributor                        |

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

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

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

|                 |                                                  |
|-----------------|--------------------------------------------------|
|                 | <b><u>Επεξήγηση συμβόλων</u></b>                 |
|                 | Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης                |
|                 | Θερμοκρασία αποθήκευσης                          |
|                 | Ημερομηνία λήξης                                 |
| <b>LOT</b>      | Αριθμός παρτίδας                                 |
| <b>REF</b>      | Αριθμός καταλόγου                                |
| <b>CONTROL</b>  | Πρότυπο ελέγχου                                  |
| <b>I V D</b>    | In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν     |
|                 | Κατασκευαστής                                    |
|                 | Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις            |
| WASH SOLN CONC  | Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης                    |
| CAL 0           | Μηδενικός βαθμονομητής                           |
| CAL N           | Βαθμονομητής #                                   |
| CONTROL N       | Ορός ελέγχου #                                   |
| Ag 125I         | Ιχνηθέτης                                        |
| Ab 125I         | Ιχνηθέτης                                        |
| Ag 125I CONC    | Χρωμογόνος Ιχνηθέτης                             |
| Ab 125I CONC    | Χρωμογόνος Ιχνηθέτης                             |
|                 | Σώληνάρια                                        |
| INC BUF         | Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης                       |
| ACETONITRILE    | Ακετονιτρίλιο                                    |
| SERUM           | Ορός                                             |
| DIL SPE         | Διάλυμα αραίωσης δειγμάτων                       |
| DIL BUF         | Ρυθμιστικό διάλυμα αραίωσης                      |
| ANTISERUM       | Αντιορός                                         |
| IMMUNOADSORBENT | Ανοσοπροσροφητικό                                |
| DIL CAL         | Αραιωτικό βαθμονομητών                           |
| REC SOLN        | Διάλυμα ανασύστασης                              |
| PEG             | Πολυαιθυλενογλυκόλη                              |
| EXTR SOLN       | Διάλυμα εκχύλισης                                |
| ELU SOLN        | Διάλυμα έκλουσης                                 |
| GEL             | Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut                      |
| PRE SOLN        | Διάλυμα προεπεξεργασίας                          |
| NEUTR SOLN      | Διάλυμα εξουδετέρωσης                            |
| TRACEUR BUF     | Ρυθμιστικό διάλυμα                               |
|                 | Πλάκα μικροτιτλοδότησης                          |
| Ab HRP          | HRP Σύζευγμα                                     |
| Ag HRP          | HRP Σύζευγμα                                     |
| Ab HRP CONC     | Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα                          |
| Ag HRP CONC     | Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα                          |
| CONJ BUF        | Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος                   |
| CHROM TMB CONC  | Χρωμογόνος TMB                                   |
| CHROM TMB       | Διάλυμα χρωμογόνου TMB                           |
| SUB BUF         | Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος                  |
| STOP SOLN       | Ανασχετικό αντιδραστήριο                         |
| INC SER         | Ορός επώασης                                     |
| BUF             | Ρυθμιστικό διάλυμα                               |
| Ab AP           | AP Σύζευγμα                                      |
| SUB PNPP        | PNPP υποστρώματος                                |
| BIOT CONJ CONC  | Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη |
| AVID HRP CONC   | Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP                |
| ASS BUF         | Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού                 |
| Ab BIOT         | αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη              |
| Ab              | Ειδικό Αντίσωμα                                  |
| SAV HRP CONC    | Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεξευγμένη με HRP   |
| NSB             | μη-ειδική δέσμευση                               |
| 2nd Ab          | 2ο Αντίσωμα                                      |
| ACID BUF        | Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο                         |