



VASOPRESSIN-RIA

KIPERB319



VASOPRESSIN-RIA

en

KIPERB319

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 INTENDED USE

The DIAsource vasopressin-ria kit contains reagents and instructions for the quantitative measurement of vasopressin in plasma or urine. After solid phase extraction (SPE) or ethanol extraction the plasma vasopressin concentrations are measured by radioimmunoassay (RIA). Urine vasopressin concentrations can be measured directly.
For professional use within a laboratory.

2 CLINICAL APPLICATION

Vasopressin, or Antidiuretic Hormone (ADH) is a cyclic nanopeptide with a molecular weight of 1083. Its structure is very similar to that of oxytocin, differing in only two amino acids. Endogenous ADH has antidiuretic and pressor activity, both approaching 400 units per mg, with an antidiuretic-to-vasopressin ratio of 1, and a biphasic plasma half-life of 2.5 and 14.5 minutes. ADH is synthesized in the hypothalamic supraoptic nucleus and paraventricular nucleus of primates and transported via axonal flow to the posterior pituitary for storage and eventual release. The clinical application of a vasopressin radioimmunoassay is in diabetes insipidus, psychogenic water intoxication, hyponatraemia, stress conditions, ADH as a neurotransmitter and hypertension studies. ADH values can be influenced by cigarettes, tea, coffee, alcohol and some drugs.

3 PRINCIPLE OF TEST

After solid phase extraction (SPE) or ethanol extraction of the plasma samples, vasopressin is assayed by a competitive radioimmunoassay. Urinary vasopressin can be measured directly. This assay uses a rabbit anti-vasopressin antiserum and a radioiodinated vasopressin [¹²⁵I] tracer. Bound and free phases are separated by a second antibody bound to solid phase particles, followed by a centrifugation step. The radioactivity in the bound fractions is measured and a typical calibration curve can be generated. The values of the extracted samples are corrected for extraction recovery.

4 PRECAUTIONS

Materials derived from human blood and used in the preparation of this kit were tested and found negative for hepatitis B surface antigen (HBsAg), antibodies to HCV and for antibodies to HIV-1 and HIV-2. However, handle all components as a possible source of infection.

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

The radioactive material included may be received, acquired, possessed and used only by physicians, clinical laboratories or hospitals for in-vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulation of each country.

Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection.

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where radioactive materials are used.
- Do not pipette radioactive solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all radioactive materials by using protective articles such as lab coats and disposable gloves.
- All radiological work should be done in a designated area.
- Radioactive materials should be stored in original containers in a designated area.
- Laboratory equipment and glassware, which are subject to contamination, should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes.
- Any radioactive spills should be taken care of immediately in accordance with established procedures.
- All radioactive materials must be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies jurisdiction over the laboratory.

The reagents in this kit contain sodium azide (0.05%). Contact with copper or lead drain pipes may result in the cumulative formation of highly explosive azide deposits. On disposal of the reagents in the sewerage, always flush with copious amounts of water, which prevents metallic azide formation. Plumbing suspected of being contaminated with these explosive deposits should be rinsed thoroughly with 10% sodium hydroxide solution.

5 SPECIMEN COLLECTION

Careful standardization of the patient preparation and sampling conditions is recommended.

5.1 Vasopressin in plasma

- Draw blood from fasting patient into a chilled tube, containing EDTA or Heparin.
- Centrifuge at 4° C to separate the plasma.
- Freeze the sample in plastic tubes at -20° C until assayed.

NOTE: Vasopressin (ADH) in plasma is stable at -20° C only for 4 weeks, or stable up to 3 months after addition of 500 KIU Trasylol (Bayer) per mL blood; after extraction.

5.2 Vasopressin in urine

Vasopressin can be determined directly, in unextracted human urine.

- Collect 24 hours urine sample.
- Register urine volume.
- Measure urinary osmolarity.
- If the sample is not assayed immediately, keep an aliquot at -20° C.
- Measure urine samples undiluted and in dilutions of 1:2, 1:4 or higher.

6 MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED

- Pipettes (100 µL, 200 µL, 300 µL, 1.00 mL, 2.00 mL, 5.00 mL)
- Repeating dispensers (100 µL, 200 µL)
- Measuring cylinder 25 mL
- Polystyrene RIA tubes (12 x 75 mm)
- Ethanol absolute (99%)
- Vortex
- Centrifuge
- Icebath
- Vac-concentrator
- Nitrogen gas
- Polystyrene or glass tubes for extraction (16 x 100 mm)
- Sep-pak C18 (Waters Ass Inc. art. 051910)
- Acetic acid 4%
- Methanol absolute (99%)
- 1N HCl
- Gamma counter

7 QUALITY CONTROL

Controls should be carried out in each assay run. Two controls are included in the kit, the value (without extraction procedure) is indicated on the Quality Control sheet and on the label of the vials. Use also controls as recommended by the control plasma manufacturer and in accordance with reference laboratories practice to monitor the accuracy and precision of reagents and techniques. Each laboratory should establish its own extraction recovery under their own experimental conditions.

8 SHELF LIFE AND STORAGE

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified.

Upon receipt of the kit, all reagents should be stored at 2-8° C.

The reconstituted reagents should be stored according to table on section 10.

The reconstituted reagents are stable according to table on section 10, but no longer than to the expiry date.

9 COMPONENTS

Contents of the Kit

- | | | | | | |
|----|------|---|---------|--|---|
| 1. | REAG | A | Ab | 1 vial, lyophilized anti-vasopressin (Rabbit) for 100 tubes.
Colour : yellow. | |
| 2. | REAG | B | Aq | ¹²⁵ I | 1 vial, 28 KBq or 0.75 µCi. Lyophilized. Specific activity : 62-77 MBq/nmol
(1700-2100 µCi/nmol).
Colour : blue. |
| 3. | REAG | C | DASP | 1 vial, goat anti-rabbit IgG's bound to solid phase.
11 mL suspension. | |
| 4. | REAG | D | ASSAY | BUF | 2 vials, 0.05 M phosphate buffer with 0.25 % HSA, 0.25 % EDTA disodium salt,
0.05 % NaN ₃ , 500 KIU Trasylol/mL. 2 x 50 mL (liquid) |
| 5. | REAG | E | CAL | 1 vial, 5.00 mL vasopressin calibrator, 60 pmol/L. Lyophilized in assay buffer. | |
| 6. | REAG | F | Control | 1 vial, 2.00 mL lyophilized vasopressin control, low level. | |
| 7. | REAG | G | Control | 1 vial, 2.00 mL lyophilized vasopressin control, high level. | |

10 PREPARATION OF REAGENTS

Item	Reconstitute each vial with		Stable at	Special remarks
Anti-vasopressin (Reagent A)	22 mL distilled water	Mix gently	-20° C for at least 3 months after recon- stitution	
¹²⁵ I-vasopressin (Reagent B)	25 mL distilled water	Mix gently	-20° C until expiry date	
Double antibody solid phase (Reagent C)	Ready for use. The separation reagent should be placed on a magnetic stirrer for 10 minutes at room temp		2-8° C until expiry date	It is possible to pipette the reagent with a repeating dispenser
Assay buffer (Reagent D)	Ready for use		2-8° C until expiry date	
Vasopressin calibrator 60 pmol/L (Reagent E)	5.00 mL distilled water	Mix gently	-20° C for at least 3 months after recon- stitution	Refer to table for calibration curve preparation
Vasopressin low control (Reagent F)	2.00 mL distilled water	Mix gently	-20° C for at least 3 months after recon- stitution	The value of the control is found on the label of the vial and in the QC sheet (without extraction)
Vasopressin high control (Reagent G)	2.00 mL distilled water	Mix gently	-20° C for at least 3 months after recon- stitution	The value of the control is found on the label of the vial and in the QC sheet (without extraction)

PREPARE ALL REAGENTS 15 MINUTES BEFORE USE!

11 SAMPLE PREPARATION

Before proceeding in the RIA procedure two different sample preparation methods can be used:

A1 : Sep-pak C18 extraction

A2 : Ethanol extraction

A1: Sep-pak C18 extraction procedure

Column: Sep-pak C18 cartridge (Waters Ass. Inc. art. 051910)

Procedure: DO NOT EXTRACT CALIBRATORS AND CONTROLS.

1. Wash the column with 10 mL distilled water, 5 mL methanol and 10 mL distilled water, respectively.
2. Acidify 1.0 mL plasma sample with 150 µL 1N HCl.
3. Bring this acidified sample into the column.
4. Wash the column with 20 mL 4% acetic acid.
5. Elute with 4 mL methanol.
6. Dry the methanol under a stream of nitrogen or air.
7. Reconstitute the residue with 1.0 mL of assay buffer.
8. Proceed the RIA procedure immediately or store the extracted samples at – 20°C.

To estimate recovery, add an aliquot (200 µL) ¹²⁵I-vasopressin tracer to a random plasma sample and submit the recovery sample for the same extraction procedure.

Recovery calculation

1. Prepare a recovery estimation tube (R).
 - Pipette 1.0 mL of a random plasma sample into the recovery tube (R). The sample used for this recovery assay should have a protein matrix similar to the samples being tested.
 - Add 200 µL ¹²⁵I-vasopressin tracer into tube R and mix.
 - Extract this sample along with samples in the above procedure.
2. Prepare 2 Total Recovery tubes (TR).
 - Pipette 200 µL ¹²⁵I-vasopressin tracer into two TR tubes.
 - Add 100 µL assay buffer and mix.
 - Cap and set aside these tubes to be counted for recovery calculation.
3. Reconstitute the dried recovery sample (R) by adding 1.0 mL assay buffer and vortex thoroughly.

4. Pipette 300 µL of the reconstituted recovery sample tube (R) into two assay tubes.
5. Count the total recovery (TR) and recovery (R) tubes for at least two minutes in a gamma counter.
Calculate % recovery by dividing the cpm in the recovery tubes (R) by cpm in the total recovery tubes (TR) and multiply by 3.33:

$$\% \text{ Recovery} : \frac{\text{cpm recovery tube (R)}}{\text{cpm total recovery tube}} \times 3.33 \times 100\%$$

Extraction recoveries should score values between 60-80%.

A2: Ethanol extraction procedure

DO NOT EXTRACT CALIBRATORS AND CONTROLS.

1. Label one extraction tube (E) for each patient sample. Label one additional tube (R) in order to estimate the extraction recovery.
2. Place the extraction tubes and ethanol on ice.
3. Pipette 0.8 mL of each sample into the appropriately labelled extraction tubes (E).
4. Prepare a recovery estimation tube (R).
 - Pipette 0.8 mL of a random plasma sample into the recovery tube (R). The sample used for this recovery assay should have a protein matrix similar to the samples being tested.
 - Add 200 µL ¹²⁵I-vasopressin tracer into tube R and mix.
 - Extract this sample along with samples in step 6.
5. Prepare 2 Total Recovery tubes (TR).
 - Pipette 200 µL ¹²⁵I-vasopressin tracer into two TR tubes.
 - Add 100 µL assay buffer and mix.
 - Cap and set aside these tubes to be counted for recovery calculation.
6. Add 4 mL chilled ethanol to each sample (tubes E) and Recovery Tube (R).
7. Mix and vortex for 2 minutes.
8. Centrifuge all extraction tubes (E and R) at 2000 g. for 15 min. at 2-8° C.
9. Decant supernatant from each extraction tube into previous prepared clean, appropriately labelled 16 x 100 mm tubes.
10. Evaporate the supernatants under a stream of nitrogen to dryness (at max. 37° C), or evaporate by using a Vac-concentrator.
11. Reconstitute the dried samples by adding 0.8 mL assay buffer and vortex thoroughly.
12. Proceed RIA procedure immediately or store the extracted samples at -20° C up to two weeks before using in the assay.
13. Reconstitute the dried recovery sample (R) by adding 0.8 mL assay buffer and vortex thoroughly.
14. Pipette 300 µL of the reconstituted recovery sample tube (R) into two assay tubes.
15. Count the total recovery (TR) and recovery (R) tubes for at least two minutes in a gamma counter.

Recovery calculation

Calculate % recovery by dividing the cpm in the recovery tubes (R) by cpm in the total recovery tubes (TR) and multiply by 2.67:

$$\% \text{ Recovery} : \frac{\text{cpm recovery tube (R)}}{\text{cpm total recovery tube (TR)}} \times 2.67 \times 100\%$$

Extraction recoveries should score values between 40-50%.

12 ASSAY PROTOCOL

All tests (calibrators, controls and samples) should be performed in duplicate.

A. Preparation of calibrator solutions

Dilution	Reagent E (=calibrator a)	Vasopressin concentration 60 pmol/L
1000 µL of Reagent E + 1000 µL assay buffer vortex	Calibrator b	30 pmol/L
1000 µL of calibrator b + 1000 µL assay buffer Vortex	Calibrator c	15 pmol/L
1000 µL of calibrator c + 1000 µL assay buffer Vortex	Calibrator d	7.5 pmol/L
1000 µL of calibrator d + 1000 µL assay buffer Vortex	Calibrator e	3.8 pmol/L
1000 µL of calibrator e + 1000 µL assay buffer vortex	Calibrator f	1.9 pmol/L
	assay buffer	0 pmol/L

B. Assay Procedure

- After preparation of the calibrator solutions pipette 300 µL of each calibrator, controls, each extract from plasma, or diluted urine into the correspondingly labelled tubes.
- Add 300 µL assay buffer (Reagent D) to the max binding (0 pmol/L binding) tubes and 500µL assay buffer to the blank tubes (NSB).
- Add 200 µL vasopressin antiserum (Reagent A) to all tubes, except blank (NSB) and total counts (TC) tubes.
- Vortex all tubes and incubate at 4° C for 18-24 hours.
- Add 200 µL ¹²⁵I-vasopressin (Reagent B) to all tubes.
- Vortex all tubes and incubate at 4° C for 18-24 hours.
- While stirring continuously add 100 µL double antibody solid phase (Reagent C) to all tubes, except TC tubes.
- Vortex and incubate 30-60 minutes at 4° C.
- Centrifuge all tubes for 15 min. at 1700 g at 4° C.
- Decant or aspirate supernatant.
- Count residue for 2-4 min.

	Assay buffer (D)	Calibrator or sample or contr.	Anti- Vasopressin (A)		¹²⁵ I-Vasopressin (B)		Double antibody solid phase (C)		
Total Counts (TC)	-	-	-	Vortex	200 µL	Vortex	-	Vortex	Centrifuge
Blank (NSB)	500 µL	-	-	and	200 µL	and	100 µL	and	for 15
St. 0 pmol/L	300 µL	-	200 µL	incubate	200 µL	incubate	100 µL	incubate	minutes at
St. 1.9 pmol/L	-	300 µL	200 µL	for 18-24	200 µL	for 18-24	100 µL	for 30-60	1700 g at
St. 3.8 pmol/L	-	300 µL	200 µL	hrs	200 µL	hrs	100 µL	minutes	4° C.
St. 7.5 pmol/L	-	300 µL	200 µL	at +4° C.	200 µL	at +4° C	100 µL	at	Aspirate or
St. 15 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL	4° C	decant the
St. 30 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		supernatant.
St. 60 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		Count the
Controls	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		residue for 2-4
Unknown sample	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		minutes.

C. Calculation

- Subtract the average count rate (cpm) of the NSB from the average count rate (cpm) of the replicates of calibrators, controls and patient samples.
- A calibration curve can be generated by plotting cpm, % B/Bo or % B/T of precipitated bound fraction against the concentration of the vasopressin calibrators.
- To obtain the vasopressin concentration in the extracted patient samples and controls, their cpm, % B/Bo or % B/T of precipitated bound fractions are interpolated now from the generated calibration curve.
- The calibration curve can also be constructed by computer methods. For automated data reduction, both logit/log and Spline methods can be used.
- Correct plasma and urine values for % extraction recovery.

Urine: calculate the 24 hour vasopressin excretion:

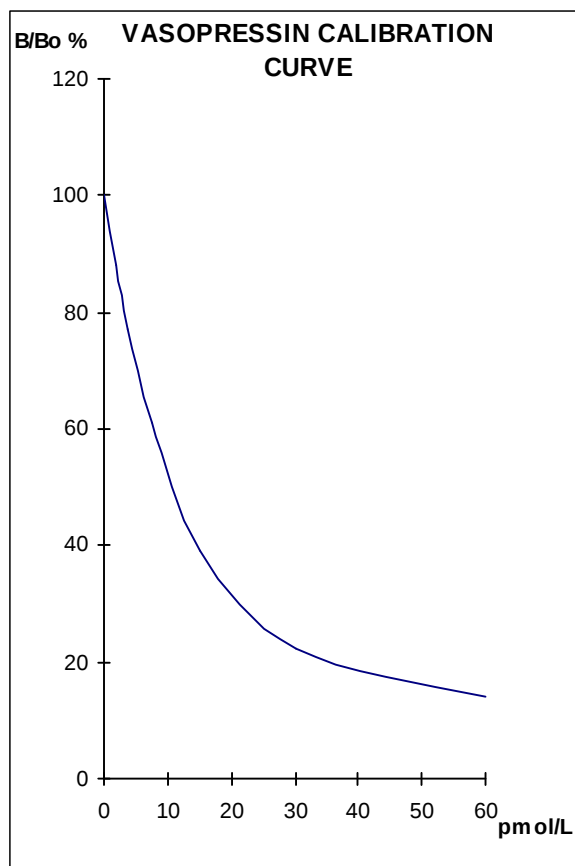
Vasopressin pmol/L x dilution x 24 hours urine volume in L.

This calculation provides vasopressin concentration in pmol/24 hours.

D. Calibration Curve Data

	Average cpm	Corrected cpm	% B/Bo	Results (pmol/L)
Total counts	11107			
NSB	555			
Calibrator 0 pmol/L	4770	4215	100	
Calibrator f 1.9 pmol/L	4340	3785	89.8	
Calibrator e 3.8 pmol/L	3739	3184	75.5	
Calibrator d 7.5 pmol/L	3135	2580	61.2	
Calibrator c 15 pmol/L	2199	1644	39.0	
Calibrator b 30 pmol/L	1490	935	22.2	
Calibrator a 60 pmol/L	1142	587	13.9	
Control low	3741	3186	75.6	4.0
Control high	1769	1214	28.8	21.1

13 EXAMPLE OF CALIBRATION CURVE



14 ASSAY CHARACTERISTICS

14.1 Precision									
Within-run					Between-run				
	n	mean pmol/L	SD	% c.v.		n	mean pmol/L	SD	% c.v.
sample A	18	4.17	0.27	6.5	sample A	6	4.38	0.26	6.0
sample B	16	20.2	1.00	4.9	sample B	6	21.4	1.48	6.9

14.2 Calibration
This assay is calibrated against the first international WHO calibrator 77/501

14.3 Recovery			
Two different samples are spiked with different amounts of vasopressin calibrator			
Sample	Expected conc. (pmol/L)	Observed conc. (pmol/L)	% Recovery
A1	9.2	9.8	106
A2	14.3	14.4	101
B1	9.6	10.0	104
B2	15.3	15.1	98

14.4 Specificity

Vasopressin antiserum is raised in rabbits.

The following cross reactivities were measured at 50% binding (B/Bo)

<u>Peptide</u>	<u>% Crossreactivity</u>
Arg ⁸ Vasopressin	100 %
Oxytocin	<0.1 %
Lys ⁸ -Vasopressin	<0.1 %
Desmopressin	<0.1 %
Arg ⁸ Vasotocin	80 %

14.5 Sensitivity

The sensitivity judged as 3 standard deviations change from zero calibrator is 0.5 pmol/L

14.6 Normal Range

Each laboratory should establish its own normal range of expected values.

Plasma: up to 13 pmol/L

Urine: 57 ± 22 pmol/24 hours urine

15 LITERATURE

Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.

Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.

Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metab. Clin. North. Am. 17(2) 281.

Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.

Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.

Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.

Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressine in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.

Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.

Von Zur Mühlen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.

Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.

Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.

Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.

Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.

Revision date : 2009-06-08



VASOPRESSIN-RIA

fr

KIPERB319

PRODUIT DE DIAGNOSTIC IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 BUT DU DOSAGE

La trousse RIA vasopressine de DIAsource contient des réactifs et les instructions pour la mesure quantitative de la vasopressine dans le plasma ou l'urine. Après une extraction en phase solide (SPE) ou une extraction à l'éthanol, les concentrations en vasopressine du plasma sont mesurées par une méthode radio-immunologique (RIA). Les concentrations en vasopressine de l'urine peuvent être mesurées directement. Uniquement pour un usage professionnel dans un laboratoire.

2 APPLICATION CLINIQUE

La vasopressine, ou hormone antidiurétique (ADH), est un nanopeptide cyclique d'un poids moléculaire de 1083. Sa structure est très semblable à celle de l'ocytocine, ne différant de celle-ci que de deux acides aminés. L'ADH endogène possède une activité antidiurétique et une activité sur la tension, les deux approchant 400 unités par mg avec un rapport antidiurétique-vasopressine de 1, une demi-vie plasmatisque biphasique de 2,5 et 14,5 minutes. L'ADH est synthétisée dans le noyau hypothalamique supra-optique et le noyau paraventriculaire chez les primates. Elle est transportée par l'intermédiaire d'un flux axonal à l'hypophyse postérieure pour y être stockée et éventuellement libérée. Les applications cliniques de la méthode de dosage radio-immunologique de la vasopressine sont diabète insipide, intoxication à l'eau psychogénique, hyponatrémie, situations de stress, études de l'ADH en tant que neurotransmetteur et de l'hypertension. Les valeurs de l'ADH peuvent être influencées par les cigarettes, le thé, le café, l'alcool et certains médicaments.

3 PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Après une extraction en phase solide (SPE) ou une extraction à l'éthanol des échantillons de plasma, la vasopressine est analysée par méthode radio-immunologique compétitive. La vasopressine urinaire peut être mesurée directement. Cette méthode utilise un antisérum de lapin dirigé contre la vasopressine et un traceur radioactif vasopressine I^{125} . Les phases liées et libres sont séparées par un second anticorps lié à la phase solide de particules. On procède ensuite à une centrifugation. La radioactivité des fractions liées est mesurée et l'on génère une courbe de calibration typique. Les valeurs des échantillons extraits sont corrigées pour la récupération d'extraction.

4 PRÉCAUTIONS

Le matériel dérivé du sang humain et utilisé dans la préparation de cette trousse a été testé et trouvé négatif pour l'antigène de surface de l'hépatite B (HBsAg), les anticorps anti-HCV et les anticorps HIV-1 et HIV-2. Manipuler cependant tous les composants comme étant une source potentielle d'infection.

Ces trousse contiennent de I^{125} (demi-vie: 60 jours) émettant des radiations ionisantes X (28 keV) et γ (35,5 keV).

Le matériel radioactif inclus ne peut être reçu, acquis, possédé et utilisé que par des médecins, des laboratoires cliniques ou des hôpitaux qui réalisent des tests cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du matériel, ou de la radiation provenant de celui-ci, à des êtres humains ou à des animaux. Ces réception, acquisition, possession, utilisation et transfert sont soumis à la réglementation de chaque pays.

Le respect des règles de base de sécurité du travail avec des produits radioactifs assure une protection adéquate.

- Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer des produits cosmétiques dans les lieux où du matériel radioactif est utilisé.
- Ne pas pipeter de solutions radioactives avec la bouche.
- Éviter le contact direct avec tout matériel radioactif en utilisant des protections telles que tabliers de laboratoire et gants jetables.
- Tout travail avec du matériel radioactif doit être effectué dans des endroits désignés.
- Le matériel radioactif doit être conservé dans les conteneurs d'origine dans un endroit désigné.
- L'équipement de laboratoire et la verrerie sujets à contamination doivent être isolés pour éviter la contamination croisée de différents isotopes.
- Toute éblouissement radioactive doit être immédiatement traitée selon les procédures établies.
- Tout matériel radioactif doit être jeté selon les réglementations courantes et les directives des organismes compétents en matière de laboratoire.

Les réactifs de cette trousse contiennent de l'azote de sodium (0,05%). Le contact avec des canalisations en cuivre ou en plomb peut provoquer la formation et l'accumulation de dépôts d'azote hautement explosifs. Lors de l'évacuation des réactifs dans les canalisations d'évacuation des eaux usées, toujours rincer abondamment à l'eau pour prévenir la formation d'azotures métalliques. Les tuyauteries contaminées ou suspectées d'être contaminées par ces dépôts explosifs doivent être rincées à fond par une solution d'hydroxyde de sodium à 10%.

5 PRÉLÈVEMENT DE L'ÉCHANTILLON

Il est recommandé de soigneusement standardiser la préparation du patient et les conditions de la prise d'échantillon.

5.1 Vasopressine dans le plasma

- Prélever du sang dans un tube réfrigéré contenant de l'EDTA ou de l'héparine, chez un patient à jeun.
- Centrifuger à 4° C pour séparer le plasma.
- Congeler l'échantillon dans des tubes en plastique à -20° C jusqu'au moment de l'analyse.

NOTE: La vasopressine (ADH) dans le plasma n'est stable à -20° C que pendant 4 semaines, ou jusqu'à 3 mois si l'on ajoute, après extraction, 500 KIU de Trasylol (Bayer) par mL de sang.

5.2 Vasopressine dans l'urine

La vasopressine peut être déterminée directement, sans extraction, dans l'urine humaine.

- Collecter un échantillon d'urines de 24 heures.
- Noter le volume d'urine.
- Mesurer l'osmolarité urinaire.
- Si l'échantillon n'est pas analysé immédiatement, garder une aliquote à -20° C.
- Mesurer les échantillons d'urine non dilués et dilués à 1:2, 1:4 ou plus.

6 RÉACTIFS ET MATÉRIEL REQUIS

- Pipettes (100 µL, 200 µL, 300 µL, 1.00 mL, 2.00 mL, 5.00 mL)
- Distributeurs répétitifs (100 µL, 200 µL)
- Cylindre gradué de 25 mL
- Tubes RIA en polystyrène (12 x 75 mm)
- Éthanol absolu (99%)
- Agitateur vortex.
- Centrifugeuse
- Bain de glace
- Vac-concentrator
- Azote gazeux
- Tubes en polystyrène ou en verre pour l'extraction (16 x 100 mm)
- Sep-pak C18 (Waters Ass Inc. art. 051910)
- Acide acétique à 4%
- Méthanol absolu (99%)
- HCl 1N
- Compteur gamma

7 CONTRÔLE DE QUALITÉ

Des contrôles doivent être réalisés dans chaque série d'analyses. Deux contrôles sont inclus dans la trousse. Leur valeur est indiquée (sans la procédure d'extraction) sur la feuille de contrôle de qualité et sur l'étiquette du flacon. Utiliser les contrôles pour vérifier l'exactitude et la précision des réactifs et des techniques, comme il est recommandé par le fournisseur du plasma de contrôle et conformément à la pratique des laboratoires de référence. Chaque laboratoire doit établir sa propre récupération d'extraction sous ses propres conditions expérimentales.

8 DURÉE DE CONSERVATION EN STOCK ET CONSERVATION

Cette trousse est stable jusqu'à la date d'expiration mentionnée si elle est conservée de la manière spécifiée.

À la réception de la trousse, tous les réactifs doivent être conservés entre 2 et 8° C.

Les réactifs reconstitués doivent être conservés suivant le tableau de la section 10.

Les réactifs reconstitués sont stables comme l'indique le tableau de la section 10, mais pas après la date d'expiration.

9 COMPOSANTS

Contenu de la trousse

- | | | | | | | |
|------|---|---------|------------------|---------|---|--|
| 1. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>A</td><td>Ab</td></tr></table> | REAG | A | Ab | 1 flacon, anti-vasopressine lyophilisée (lapin) pour 100 tubes.
Couleur : jaune | |
| REAG | A | Ab | | | | |
| 2. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>B</td><td>Aa</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> | REAG | B | Aa | ¹²⁵ I | 1 flacon, 28 KBq ou 0.75 µCi. Lyophilisé. Activité spécifique : 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Couleur : bleu. |
| REAG | B | Aa | ¹²⁵ I | | | |
| 3. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>C</td><td>DASP</td></tr></table> | REAG | C | DASP | 1 flacon, IgG de chèvre anti-lapin liés à une phase solide.
11 mL de suspension. | |
| REAG | C | DASP | | | | |
| 4. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>D</td><td>ASSAY</td><td>BUF</td></tr></table> | REAG | D | ASSAY | BUF | 2 flacons, tampon phosphate 0,05 M avec 0,25 % de HSA, 0,25 % de sel dissodique d'EDTA, 0,05 % de NaN ₃ , 500 KIU de Trasylol/mL. 2 x 50 mL (liquide) |
| REAG | D | ASSAY | BUF | | | |
| 5. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>E</td><td>CAL</td></tr></table> | REAG | E | CAL | 1 flacon, 5,00 mL calibrateur vasopressine, 60 pmol/L. Lyophilisé dans un tampon de test. | |
| REAG | E | CAL | | | | |
| 6. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>F</td><td>Control</td></tr></table> | REAG | F | Control | 1 flacon, 2,00 mL contrôle vasopressine bas. Lyophilisée. | |
| REAG | F | Control | | | | |
| 7. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>G</td><td>Control</td></tr></table> | REAG | G | Control | 1 flacon, 2,00 mL contrôle vasopressine haut. Lyophilisé. | |
| REAG | G | Control | | | | |

10 PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Réactif	Reconstituer chacun des flacons avec		Stable à	Remarques particulières
Anti-vasopressine (Réactif A)	22 mL d'eau distillée	Mélanger doucement	-20° C pendant au moins 3 mois après la reconstitution	
Vasopressine ¹²⁵ I (Réactif B)	25 mL d'eau distillée	Mélanger doucement	-20° C jusqu'à la date d'expiration	
Double anticorps en phase solide (Réactif C)	Prêt à l'emploi. Le réactif de séparation doit être placé sur un mélangeur magnétique pendant 10 minutes à température ambiante		entre 2 et 8° C jusqu'à la date d'expiration	Si possible, pipeter le réactif avec un distributeur répétitif
Tampon de test (Réactif D)	Prêt à l'emploi		entre 2 et 8° C jusqu'à la date d'expiration	
Calibrateur Vasopressine 60 pmol/L (Réactif E)	5,00 mL d'eau distillée	Mélanger doucement	-20° C pendant au moins 3 mois après la reconstitution	Se référer au tableau pour la préparation de la courbe de calibration
Contrôle vasopressine bas (Réactif F)	2,00 mL d'eau distillée	Mélanger doucement	-20° C pendant au moins 3 mois après la reconstitution	La valeur du contrôle se trouve sur l'étiquette du flacon et la feuille de CQ (sans extraction)
Contrôle vasopressine élevé (Réactif G)	2,00 mL d'eau distillée	Mélanger doucement	-20° C pendant au moins 3 mois après la reconstitution	La valeur du contrôle se trouve sur l'étiquette du flacon et la feuille de CQ (sans extraction)

PRÉPARER TOUS LES RÉACTIFS 15 MINUTES AVANT L'UTILISATION!

11 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Avant de commencer la procédure RIA, on peut utiliser deux méthodes différentes de préparation de l'échantillon:

A1 : Extraction sur Sep-pak C18
A2 : Extraction à l'éthanol

A1: Procédure d'extraction sur Sep-pak C18

Colonne: cartouche Sep-pak C18 (Waters Ass. Inc. art. 051910)

Procédure: NE PAS EXTRAIRE NI LES CALIBRATEURS NI LES CONTRÔLES.

1. Laver la colonne successivement avec 10 mL d'eau distillée, 5 mL de méthanol et 10 mL d'eau distillée.
2. Acidifier 1,0 mL d'échantillon de plasma avec 150 µL de HCL 1N.
3. Déposer cet échantillon acidifié dans la colonne.
4. Laver la colonne avec 20 mL d'acide acétique à 4%.
5. Éluier avec 4 mL de méthanol
6. Sécher le méthanol sous un courant d'azote ou d'air.
7. Reconstituer le résidu avec 1,0 mL du tampon de test.
8. Réaliser la procédure RIA immédiatement après ou conserver les échantillons extraits à -20°C.

Pour estimer la récupération, ajouter une aliquote (200 µL) de traceur vasopressine I¹²⁵ à un échantillon de plasma pris au hasard et soumettre l'échantillon de récupération à la même procédure d'extraction.

Calcul de la récupération

1. Préparer un tube d'estimation de la récupération (R).
 - Pipeter 1,0 mL d'un échantillon de plasma pris au hasard dans le tube de récupération (R). L'échantillon utilisé pour la récupération doit avoir une matrice protéique semblable aux échantillons testés.
 - Ajouter 200 µL du traceur vasopressine I¹²⁵ dans le tube R et mélanger.
 - Extraire cet échantillon en même temps que les autres échantillons dans la procédure reprise ci-dessus.
2. Préparer deux tubes de récupération totale (TR).
 - Pipeter 200 µL du traceur vasopressine I¹²⁵ dans deux tubes TR.
 - Ajouter 100 µL du tampon de test et mélanger.
 - Fermer les tubes et les garder à part pour les compter afin de faire le calcul de récupération.

- Reconstituer l'échantillon de récupération séché (R) en ajoutant 1,0 mL de tampon de test et mélanger à fond au Vortex.
- Pipeter 300 µL du tube de l'échantillon de récupération reconstitué (R) dans deux tubes à essai.
- Compter la récupération totale (TR) et les tubes de récupération (R) pendant au moins deux minutes dans un compteur gamma. Calculer le % de récupération en divisant les cpm des tubes de récupération (R) par les cpm des tubes de récupération totale (TR) et multiplier par 3,33:

$$\% \text{ de récupération} : \frac{\text{cpm du tube de récupération (R)}}{\text{cpm du tube de récupération totale}} \times 3.33 \times 100\%$$

Les valeurs des scores des récupérations d'extraction doivent se situer entre 60 et 80%.

A2: Procédure d'extraction à l'éthanol

NE PAS EXTRAIRE NI LES CALIBRATEURS NI LES CONTROLES.

- Étiqueter un tube d'extraction (E) pour chacun des échantillons de patient. Étiqueter un tube (R) supplémentaire afin d'estimer la récupération d'extraction.
- Placer les tubes d'extraction et l'éthanol sur de la glace.
- Pipeter 0,8 mL de chacun des échantillons dans les tubes d'extraction étiquetés correspondants (E).
- Préparer un tube d'estimation de la récupération (R).
 - Pipeter 0,8 mL d'un échantillon de plasma pris au hasard dans le tube de récupération (R). L'échantillon utilisé pour ce test de récupération doit avoir une matrice protéique similaire à celle des échantillons testés.
 - Ajouter 200 µL du traceur vasopressine 125 dans le tube R et mélanger.
 - Extraire cet échantillon en même temps que les autres échantillons à l'étape 6.
- Préparer deux tubes de récupération totale (TR).
 - Pipeter 200 µL du traceur vasopressine 125 dans deux tubes TR.
 - Ajouter 100 µL du tampon de test et mélanger.
 - Fermer les tubes et les garder à part pour les compter afin de faire le calcul de récupération.
- Ajouter 4 mL d'éthanol réfrigéré à chacun des échantillons (tubes E) et au tube de récupération (R).
- Mélanger au Vortex pendant 2 minutes.
- Centrifuger tous les tubes d'extraction (E et R) à 2000 g. pendant 15 min. entre 2 et 8° C.
- Décanner le surnageant de chacun des tubes d'extraction dans des tubes 16 x 100 mm déjà préparés, lavés et étiquetés correctement.
- Évaporer les surnageants sous un courant d'azote jusqu'à ce qu'ils soient secs (à max. 37° C) ou évaporer en utilisant un Vac-concentrator.
- Reconstituer les échantillons séchés en ajoutant 0,8 mL de tampon de test et mélanger à fond au Vortex.
- Réaliser immédiatement la procédure RIA ou, avant de réaliser l'analyse, conserver les échantillons extraits à -20° C jusqu'à deux semaines.
- Reconstituer les échantillons de récupération séchés (R) en ajoutant 0,8 mL de tampon de test et mélanger à fond au Vortex.
- Pipeter 300 µL du tube de l'échantillon de récupération reconstitué (R) dans deux tubes à essai.
- Compter les tubes de récupération totale (TR) et de récupération (R) pendant au moins deux minutes dans un compteur gamma.

Calcul de la récupération

Calculer le % de récupération en divisant les cpm des tubes de récupération (R) par les cpm des tubes de récupération totale (TR) et multiplier par 2,67:

$$\% \text{ de récupération} : \frac{\text{cpm du tube de récupération (R)}}{\text{cpm du tube de récupération totale (TR)}} \times 2.67 \times 100\%$$

Les valeurs des scores de récupération d'extraction doivent se situer entre 40 et 50%.

12 PROTOCOLE D'ANALYSE

Tous les tests (calibrateurs, contrôles et échantillons) doivent être réalisés en double.

A. Préparation des solutions de calibration

Dilution	Réactif E (=calibrateur a)	Concentration en vasopressine 60 pmol/L
1000 µL de Réactif E + 1000 µL de tampon de test vortex	Calibrateur b	30 pmol/L
1000 µL of calibrateur b + 1000 µL de tampon de test Vortex	Calibrateur c	15 pmol/L
1000 µL of calibrateur c + 1000 µL de tampon de test Vortex	Calibrateur d	7,5 pmol/L
1000 µL of calibrateur d + 1000 µL de tampon de test Vortex	Calibrateur e	3,8 pmol/L
1000 µL of calibrateur e + 1000 µL de tampon de test vortex	Calibrateur f	1,9 pmol/L
	tampon de test	0 pmol/L

B. Procédure d'analyse

- Après la préparation des solutions de calibration, pipeter 300 µL de chacun des calibrateur, contrôles et extraits de plasma ou d'urine diluée dans les tubes étiquetés correspondants.
- Ajouter 300 µL de tampon de test (réactif D) aux tubes de liaison maximale (liaison 0 pmol/L) et 500 µL de tampon de test aux tubes des blancs (NSB).
- Ajouter 200 µL d'antisérum dirigé contre la vasopressine (réactif A) à tous les tubes, excepté aux tubes des blancs (NSB) et de comptage total (TC).
- Mélanger tous les tubes au Vortex et incubé à 4° C pendant 18 à 24 heures.
- Ajouter 200 µL de vasopressine I¹²⁵ (réactif B) à tous les tubes.
- Mélanger tous les tubes au Vortex et incubé à 4° C pendant 18 à 24 heures.
- En agitant continuellement, ajouter 100 µL de double anticorps en phase solide (réactif C) à tous les tubes, excepté les tubes TC.
- Mélanger au Vortex et incubé pendant 30 à 60 minutes à 4° C.
- Centrifuger tous les tubes pendant 15 minutes à 1700 g à 4° C.
- Décanté ou aspirer le surnageant.
- Compter le résidu pendant 2 à 4 minutes.

	tampon de test	Calibrateur ou échantillon ou contrôle	Anti- Vasopressine		Vasopressine ¹²⁵ I		Double anticorps en phase solide		
	(D)		(A)		(B)		(C)		
Comptage Total (TC)	-	-	-	Mélanger	200 µL	Mélanger au	-	Mélanger au	Centrifuger
Blanc (NSB)	500 µL	-	-	au Vortex	200 µL	Vortex et	100 µL	Vortex et	15 min. à
St. 0 pmol/L	300 µL	-	200 µL	et incubé	200 µL	incuber	100 µL	incuber	1700 g à +4°
St. 1,9 pmol/L	-	300 µL	200 µL	pendant	200 µL	pendant	100 µL	pendant	C.
St. 3,8 pmol/L	-	300 µL	200 µL	18 à 24	200 µL	18 à 24	100 µL	30 à 60	Aspirer ou
St. 7,5 pmol/L	-	300 µL	200 µL	heures à	200 µL	heures à 4°	100 µL	minutes à	décanté le
St. 15 pmol/L	-	300 µL	200 µL	4° C	200 µL	C	100 µL	4° C	surnageant.
St. 30 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		Compter le
St. 60 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		résidu pendant
Contrôles	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		2 à 4 minutes.
Échantillon inconnu	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		

C. Calculation

- Soustraire le taux de comptage moyen (CPM) des tubes NSB du taux de comptage (CPM) des calibrateurs, contrôles et échantillons des patients analysés en double.
- Générer une courbe de calibration en reportant les cpm, % B/Bo ou % B/T ou la fraction liée précipitée en fonction de la concentration des calibrateurs vasopressine.
- Pour obtenir la concentration en vasopressine des échantillons extraits et des contrôles, interpoler leur cpm, % B/Bo ou % B/T ou fraction liée précipitée à partir de la courbe de calibration générée.
- La courbe de calibration peut également être construite par des méthodes informatiques. Pour une réduction des données automatisées, on peut utiliser les deux méthodes logit/log et Spline.
- Corriger les valeurs plasmatiques et urinaires par le % de récupération d'extraction.

Urine: calculer l'excrétion de la vasopressine sur 24 heures:

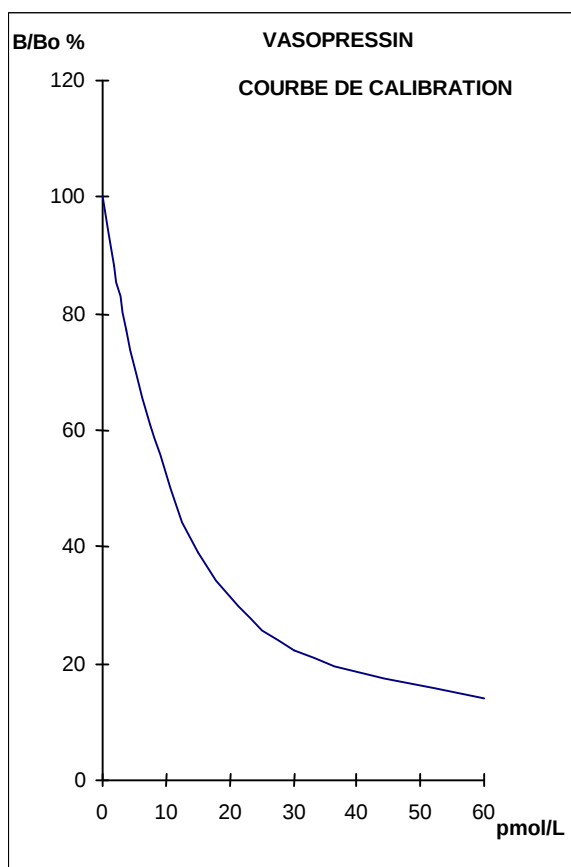
Vasopressine en pmol/L x la dilution x le volume d'urine de 24 heures en L.

Ce calcul fournit la concentration en vasopressine en pmol/24 heures.

D. Données de la courbe de calibration

	cpm moyen	cpm corrigé	% B/Bo	Résultats (pmol/L)
Comptages totaux	11107			
NSB	555			
Calibrateur 0 pmol/L	4770	4215	100	
Calibrateur f 1,9 pmol/L	4340	3785	89,8	
Calibrateur e 3,8 pmol/L	3739	3184	75,5	
Calibrateur d 7,5 pmol/L	3135	2580	61,2	
Calibrateur c 15 pmol/L	2199	1644	39,0	
Calibrateur b 30 pmol/L	1490	935	22,2	
Calibrateur a 60 pmol/L	1142	587	13,9	
Contrôle bas	3741	3186	75,6	4,0
Contrôle élevée	1769	1214	28,8	21,1

13 EXEMPLE DE COURBE DE CALIBRATION



14 CARACTÉRISTIQUES DE L'ANALYSE

14.1 Précision									
Intra-essai					Inter-essai				
	n	moyenne pmol/L	DS	% c.v.		n	moyenne pmol/L	DS	% c.v.
échantillon A	18	4,17	0,27	6,5	échantillon A	6	4,38	0,26	6,0
échantillon B	16	20,2	1,00	4,9	échantillon B	6	21,4	1,48	6,9

14.2 Calibration
Cette analyse est calibrée par rapport au premier calibrateur international de l'OMS 77/501

14.3 Récupération			
Deux échantillons différents ont été enrichis par différentes quantités du calibrateur vasopressine			
Échantillon	Conc. attendue (pmol/L)	Conc. observée (pmol/L)	% de récupération
A1	9,2	9,8	106
A2	14,3	14,4	101
B1	9,6	10,0	104
B2	15,3	15,1	98

14.4 Spécificité

L'antisérum vasopressine est produit chez le lapin.

Les réactivités croisées suivantes ont été mesurées à 50% de liaison (B/Bo)

<u>Peptide</u>	<u>% de réactivité croisée</u>
Vasopressine Arg ⁸	100 %
Ocytocine	<0,1 %
Vasopressine Lys ⁸	<0,1 %
Desmopressine	<0,1 %
Vasotocine Arg ⁸	80 %

14.5 Sensibilité

La sensibilité estimée comme un changement de 3 déviations standards par rapport au calibrateur zéro est de 0,5 pmol/L.

14.6 Fourchette de valeurs normales

Chaque laboratoire doit établir ses propres fourchettes de valeurs attendues.

Plasma: en-dessous de 13 pmol/L

Urine: 57 ± 22 pmol/urines de 24 heures

15 BIBLIOGRAPHIE

Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.

Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.

Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metab. Clin. North. Am. 17(2) 281.

Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.

Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.

Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.

Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.

Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.

Von Zur Mühlen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.

Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.

Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.

Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.

Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.

date de révision : 2009-06-08



VASOPRESSIN-RIA

de

KIPERB319

IN-VITRO-DIAGNOSTIKUM

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 ZWECKBESTIMMUNG

The DIAsource vasopressin-ria kit contains reagents and instructions for the quantitative measurement of vasopressin in plasma or urine. After solid phase extraction (SPE) or ethanol extraction the plasma vasopressin concentrations are measured by radioimmunoassay (RIA). Urine vasopressin concentrations can be measured directly.

Für den professionellen Gebrauch im medizinisch-diagnostischen Labor.

2 KLINISCHE ANWENDUNG

Vasopressin, oder Antidiuretisches Hormon (ADH), besteht aus neun Aminosäuren, die in einem Ring angeordnet sind, und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 1.060. Vasopressin zeigt eine sehr ähnliche Struktur zum Oxytocin, die sich in nur zwei Aminosäuren voneinander unterscheiden. Endogenes ADH hat eine antidiuretische und Osmolarität-regulatorische Funktion. Es zeigt eine bi-phasische Plasmahalbwertszeit von 2,5 und 14,5 Minuten. ADH wird im Hypothalamus synthetisiert und anschließend zur Aufbewahrung und eventuellen Freisetzung zum Hypophysenhinterlappen transportiert. Als klinische Indikation der Vasopressinbestimmung gelten vor allem der Diabetes insipidus, Hyponaträmie und Streßbedingungen; ADH als Neurotransmitter und bei Bluthochdruckstudien. ADH-Werte können durch Zigaretten, Tee, Koffein, Alkohol und einige Drogen beeinflusst werden.

3 TESTPRINZIP

Nach einem Solid-Phase (SPE) oder Ethanol-Extraktionsschritt der Plasmaproben, wird Vasopressin durch einen kompetitiven Radioimmunoassay bestimmt. Vasopressin im Urin kann direkt gemessen werden. Dieser RIA verläuft unter Anwendung eines Kaninchen-Anti-Vasopressin-Antiserums sowie eines Vasopressin-¹²⁵I Tracers.

Gebundene und frei Phase werden durch einen zweiten Antikörper, der an eine feste Phase gebunden ist, getrennt und anschließend zentrifugiert. Die Radioaktivität in der gebundenen Fraktion wird gemessen unter Zugrundelegung einer Kalibrationskurve. Die aus der extrahierten Probe erhaltenen Werte werden durch die Extraktionswiederfindung korrigiert.

4 VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur zum in vitro Gebrauch. Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Es ist notwendig, dass die für das Labor verantwortliche Person mit den im jeweiligen Land gültigen, gesetzlichen Bestimmungen im Umgang mit radioaktivem Material vertraut ist.

Alle Reagenzien dieses Testbestecks, die humanes Material enthalten, ergaben bei der Prüfung auf HCV, HBsAg bzw. Antikörper gegen HIV I/II-Virus ein negatives Ergebnis. Trotzdem kann das Vorhandensein solcher infektiöser Erreger nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien sollten deshalb wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Es sollten geeignete Maßnahmen zum sicheren Umgang mit dem radioaktiven Material ergriffen werden. Nur autorisierte Personen sollten Zugang zu den Reagenzien haben.

Die folgenden Vorsichtsmaßnahmen sollten beim Umgang mit radioaktivem Material beachtet werden:

- Radioaktives Material muß in speziell ausgewiesenen Räumen gelagert werden, die für nicht autorisiertes Personal nicht zugänglich sind.
- Der Umgang mit radioaktivem Material darf nur in speziell gekennzeichneten Räumen erfolgen.
- Vorsicht ist geboten vor oraler oder dermalen Aufnahme von radioaktiven Stoffen oder Kontamination von Kleidung. Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Bei der Testdurchführung darf weder gegessen, getrunken oder geraucht werden.
- Es wird empfohlen Einmalhandschuhe zu tragen. Nach Gebrauch radioaktiven Materials Hände waschen.
- Beim Umgang mit radioaktivem Material sollten die Labortische mit absorbierendem, wegwerfbarem Material abgedeckt sein.
- Verschüttetes radioaktives Material sollte sofort aufgenommen werden und kontaminiertes Material als radioaktiver Abfall entsorgt werden. Kontaminierte Tischoberflächen sollten mit einem Detergenz gesäubert werden.

Kitkomponenten enthalten Natriumazid. Kontakt mit Kupfer- oder Bleirohren kann zur Bildung von hochexplosiven Ablagerungen führen. Daher beim Einbringen in Abflüsse mit reichlich Wasser nachspülen, was die Bildung von Metallaziden verhindert. Rohre, die wahrscheinlich diese explosiven Ablagerungen enthalten vorsichtig mit 10%iger Natronlauge spülen.

5 PROBENGEWINNUNG

Es wird empfohlen, bei der Vorbereitung der Patienten und bei der Probenahme sorgfältig und standardisiert vorzugehen.

5.1 Vasopressin in Plasma

- Blut von nüchternen Patienten in ein gekühltes Probengefäß unter Zusatz von EDTA oder Heparin aufnehmen.
- Bei 4 °C zentrifugieren, um das Plasma abzutrennen.
- Proben in Plastikröhrchen bei –20°C bis zur Analyse einfrieren.

HINWEIS: Vasopressin (ADH) in Plasma ist bei -20° C nur für 4 Wochen stabil, nach Zugabe von 500 KIU Trasylol (Bayer) pro mL Blut ist es stabil für bis zu 3 Monate.

5.2 Vasopressin in Urin

Vasopressin kann in Urin ohne Extraktion direkt bestimmt werden.

- 24 h-Urinprobe sammeln.
- Registrieren.
- Urin-Osmolarität messen.
- Wenn die Probe nicht sofort analysiert wird, in Aliquots bei –20°C aufbewahren.
- Urinproben können unverdünnt oder in Verdünnungen von 1:2, 1:4 oder höher gemessen werden.

6 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL (NICHT IM KIT ENTHALTEN)

Pipetten mit Einmalspitzen, 100, 200, 300 µl und 1,00, 2,00 und 5,00 ml.

Eppendorf-Multipipette für Volumina 100 und 200 µl

Meßzylinder 25 ml

Einmal-Teströhrchen 12 x 75 mm, Polystyrol

Ethanol absolut (99%)

Vortexmixer

Zentrifuge

Eisbad

Vakuum-Ausrüstung

Stickstoffgas

Polystyrol- oder Glasröhrchen für Extraktion (16 x 100 mm)

Sep-pak C18 (Waters Ass Inc. Kat.-Nr. 051910)

Essigsäure, 4%

Methanol absolut (99%)

1N HCl

Gammazähler

7 QUALITÄTSKONTROLLE

Die Kontrollen sollten mit jedem Testlauf gemessen werden. Im Kit sind zwei Kontrollen enthalten. Die Werte der Kontrollen (ohne Extraktionsverfahren) sind auf dem QC-Zertifikat sowie auf den Etiketten angegeben. Es sollten weitere Kontrollen gemäß den Empfehlungen der Plasmahersteller und in Übereinstimmung mit Referenzlabors mitgeführt werden, um die Genauigkeit und Präzision der Reagenzien und Techniken zu überwachen. Jedes Labor sollte die Wiederfindung des Extraktionsverfahrens bestimmen unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen.

8 LAUFZEIT UND LAGERUNG

Dieser Kit ist haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum, wenn er unter den angegebenen Bedingungen gelagert wird. Nach dem Empfang sollten alle Reagenzien bei 2-8 °C gelagert werden.

Die rekonstituierten Reagenzien sollten gelagert werden wie in der Tabelle auf Abschnitt 10 angegeben. Die Haltbarkeit der rekonstituierten Reagenzien ergibt sich ebenfalls aus der Tabelle auf Abschnitt 10, überschreitet aber nicht das Verfallsdatum des Kits.

9 KOMPONENTEN DES KITS

- | | | | | | |
|----|------|---|-------|---|---|
| 1. | REAG | A | Ab | 1 vial, lyophilisiertes Anti-vasopressin (Kaninchen) für Röhrchen.
Farbe : Gelb. | |
| 2. | REAG | B | Aq | ¹²⁵ I | 1 vial, 28 KBq bzw. 0.75 µCi. Lyophilisiert. Spezif. Aktivität : 62-77 MBq/nmol
(1700-2100 µCi/nmol).
Farbe : Blau. |
| 3. | REAG | C | DASP | 1 vial, ziege anti-Kaninchen IgG gebunden an eine Festphase.
11 mL Suspension. | |
| 4. | REAG | D | ASSAY | BUF | 2 vials, 0.05 M phosphatpuffer mit 0.25 % HSA, 0.25 % EDTA Dinatriumsalz,
0.05 % NaN ₃ , 500 KIU Trasylol/mL. 2 x 50 mL (flüssig) |

5.

REAG	E	CAL
------	---	-----

 1 vial, 5.00 mL Vasopressin Standard, 60 pmol/L. Lyophilisiert in Assaypuffer.
6.

REAG	F	Control
------	---	---------

 1 vial, 2.00 mL lyophilisiertes Vasopressin Kontrolle, niedrig.
7.

REAG	G	Control
------	---	---------

 1 vial, 2.00 mL lyophilisiertes Vasopressin Kontrolle, hoch.

10 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Komponente	Jedes Fläschchen rekonstituieren mit:		Lagerung / Haltbarkeit:	Spezielle Hinweise:
Anti-Vasopressin (Reagenz A)	22 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen	-20° C für mind. 3 Monate nach Rekonstitution	
¹²⁵ I-Vasopressin (Reagenz B)	25 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen	-20° C bis zum Verfallsdatum des Kits	
Doppel-Antikörper-Festphase (Reagenz C)	Gebrauchsfertig. 10 min auf einem Magnetrührer mischen.		2-8° C bis zum Verfallsdatum des Kits	Das Reagenz kann mit einer Mehrfachpipette pipettiert werden.
Assaypuffer (Reagenz D)	Gebrauchsfertig.		2-8° C bis zum Verfallsdatum des Kits	
Vasopressin Kalibrator 60 pmol/L (Reagenz E)	5.00 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen	-20° C für mind. 3 Monate nach Rekonstitution	Kalibrationskurve siehe Tabelle
Vasopressin Niedrige Kontrolle (Reagenz F)	2.00 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen	-20° C für mind. 3 Monate nach Rekonstitution	Der Wert der Kontrolle ist dem Etikett oder dem QC-Zertifikat zu entnehmen (ohne Extraktion).
Vasopressin Hohe Kontrolle (Reagenz G)	2.00 mL bidest. Wasser	Vorsichtig mischen	-20° C für mind. 3 Monate nach Rekonstitution	Der Wert der Kontrolle ist dem Etikett oder dem QC-Zertifikat zu entnehmen (ohne Extraktion).

Alle Reagenzien sollten 15 min vor Beginn des Assays vorbereitet werden !

11 PROBENVORBEREITUNG

Vor Durchführung des RIAs können zwei verschiedene Extraktionsmethoden benutzt werden:

- A1: Sep-pak C 18 Extraktion
A2: Ethanol-Extraktion

A1: Protokoll zur Extraktion mittels Sep-pak C 18 Säulchen

Verwendete Säule: Sep-pak C 18 cartridge (Waters Ass. Inc. art. 051910, Classic oder 020515, C18 Plus)

Kalibratoren und Referenzkontrollen werden nicht extrahiert.

- Waschen der Säule mit 10 ml destilliertem Wasser, 5 ml Methanol und anschließend 10 ml destilliertem Wasser.
- Ansäuern von 1 ml Plasma mit 150 µl 1 N HCL.
- Diese angesäuerte Probe auf die Säule geben.
- Waschen der Säule mit 20 ml 4%iger Essigsäure.
- Eluieren der Säule mit 4 ml Methanol.
- Eindampfen des Methanols unter einem Stickstoff oder Sauerstoff-Strom.
- Rekonstitution des getrockneten Restes in 1 ml Assaypuffer.
- Die RIA-Testdurchführung unmittelbar danach anschließen, oder die extrahierten Proben bei -20 °C lagern.

Um die Wiederfindung zu bestimmen, ein Aliquot (200 µl) ¹²⁵Jod Vasopressin-Tracer zu einer beliebigen Plasmaprobe geben und diese Wiederfindungsprobe nach obigen Protokoll extrahieren.

Wiederfindung:

- Herstellung einer Wiederfindungsprobe (R).
1 ml einer mit 150µl 1 N HCl angesäuerten Plasmaprobe in ein entsprechendes Wiederfindungsröhrchen pipettieren (R). Die verwendete Probe sollte eine ähnliche Protein-Matrix haben wie die zu testenden Proben. 200 µl ¹²⁵Jod Vasopressin-Tracer in das Röhrchen (R) geben und vortexen. Diese Probe analog des obigen Extraktions-Protokolls extrahieren.
- Herstellung 2 Gesamt-Wiederfindungs-Röhrchens (TR, Doppelansatz). Je 200 µl ¹²⁵Jod Vasopressin-Tracer in 2 TR Röhrchen pipettieren, 100 µl Assay-Puffer hinzugeben und vortexen, Röhrchen verschließen und zur Seite stellen.
- Die getrocknete Wiederfindungs-Probe (R) durch Zusatz von 1,0 ml Assay-Puffer rekonstituieren und gründlich vortexen.

D. Je 300 µl der rekonstituierten Wiederfindungs-Probe (R) in 2 Assay-Röhrchen pipettieren.

E. Die totalen Wiederfindungs- (TR) und Wiederfindungs- (R) Röhrchen für wenigstens 2 Minuten in einem Gammacounter zählen.

Berechnung der Wiederfindung:

Berechnung der Prozent-Wiederfindung durch Division der cpm in den Wiederfindungsröhrchen (R) durch die cpm der Total-Wiederfindungsröhrchen (TR) und Multiplikation mit dem Faktor 3,33:

$$\% \text{ Wiederfindung} = \frac{\text{cpm Wiederfindungsröhrchen (R)}}{\text{cpm Totale Wiederfindungsröhrchen (TR)}} \times 3.33 \times 100\%$$

Die Extraktions-Wiederfindung sollte im Bereich zwischen 60-80% liegen.

A.2: Ethanol Extraktion

KALIBRATOREN UND REFERENZKONTROLLEN WERDEN NICHT EXTRAHIERT

1. Für jede Patientenprobe wird ein Extraktionsröhrchen beschriftet. Um die Extraktionswiederfindung zu bestimmen, wird ein zusätzliches Röhrchen (R) gekennzeichnet.
2. Die Extraktionsröhrchen sowie den Alkohol auf Eis stellen.
3. 0,8 ml jeder Probe in die entsprechend gekennzeichneten Extraktionsröhrchen pipettieren.
4. Ein Röhrchen zur Bestimmung der Wiederfindung (R) nach folgender Vorschrift herstellen: 0,8 ml eines Plasmas in das Wiederfindungsröhrchen (R) pipettieren. Die für die Wiederfindung verwendete Probe sollte eine ähnliche Proteinmatrix wie die zu testenden Proben haben. 200 µl 125 I-Vasopressin-Tracer in das Röhrchen (R) pipettieren und mischen. Diese Probe mit den anderen Proben in Schritt 6 extrahieren.
5. Zwei Röhrchen zur Bestimmung der totalen Wiederfindung (TR) nach folgender Vorschrift herstellen: 200 µl 125 I-Vasopressin-Tracer in zwei TR-Röhrchen pipettieren. 200 µl Assaypuffer hinzugeben und mischen. Dieses Röhrchen verschließen und zur Berechnung der Wiederfindung zur Seite stellen.
6. 4 ml gekühltes Ethanol zu jeder Probe sowie Wiederfindungsröhrchen (R) pipettieren.
7. Mischen und 2 Minuten vortexen.
8. Alle Extraktionsröhrchen bei 2.000g für 15 Minuten bei 2-8 °C zentrifugieren.
9. Den Überstand aus jedem Extraktionsröhrchen in ein neues sauberes, vorher gekennzeichnetes 16 x 100 mm Röhrchen überführen.
10. Die Überstände unter einem Stickstoffstrom bei max. 37 °C zur Trockne evaporieren.
11. Die getrockneten Proben durch Zugabe von 0,8 ml Assaypuffer rekonstituieren und gründlich vortexen.
12. Die RIA-Testdurchführung unmittelbar danach anschließen, oder die extrahierten Proben bei -20 °C für bis zu 2 Wochen lagern.
13. Die getrocknete Wiederfindungsprobe (R) durch Zugabe von 0,8 ml Assaypuffer rekonstituieren und gründlich mischen.
14. 300 µl der rekonstituierten Wiederfindungsprobe (R) in zwei 12 x 75 mm Röhrchen pipettieren.
15. Totale Wiederfindung (TR) und Wiederfindung (R) für wenigstens 2 Min. in einem Gamma counter messen.

Berechnung der Wiederfindung:

Die Wiederfindung in % wird durch Division der cpm in dem Wiederfindungsröhrchen (R) durch die cpm in den totalen Wiederfindungsröhrchen (TR) und Multiplikation mit dem Quotienten 2,67 x 100% berechnet. Die Wiederfindung der Extraktion liegt im Bereich zwischen 40-50%.

12 TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Tests (Kalibratoren, Kontrollen und Proben) sollten in Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

A. Herstellung der Kalibratorlösungen

Verdünnung	Reagenz E (=Kalibrator a)	Vasopressin Konzentration 60 pmol/L
1000 µL Reagenz E + 1000 µL Assaypuffer vortexen	Kalibrator b	30 pmol/L
1000 µL Kalibrator b + 1000 µL Assaypuffer vortexen	Kalibrator c	15 pmol/L
1000 µL Kalibrator c + 1000 µL Assaypuffer vortexen	Kalibrator d	7.5 pmol/L
1000 µL Kalibrator d + 1000 µL Assaypuffer vortexen	Kalibrator e	3.8 pmol/L
1000 µL Kalibrator e + 1000 µL Assaypuffer vortexen	Kalibrator f	1.9 pmol/L
	Assaypuffer	0 pmol/L

B. Assay-durchführung

1. Benötigte Röhrchen (Doppelbestimmungen) für Totalaktivität (T), NSB, Kalibratoren, Nullkalibrator (Bo), Kontrollen und Proben vorbereiten.
2. 300 µl eines jeden Standard, Kontrolle und 300 µl jedes Plasmaextraktes oder verdünnten Urins in die entsprechend gekennzeichneten Röhrchen pipettieren.
3. 300 µl Puffer zu den Maximale-Bindung (0 pmol/l-Bindung)-Röhrchen und 500 µl Puffer zu den Blank-Röhrchen pipettieren.
4. 200 µl Antiserum in alle Röhrchen (außer NSB und T) pipettieren. Mischen und Röhrchen mit Parafilm oder Alufolie abdecken.
5. Alle Röhrchen vortexen und bei 2 – 8 °C für 18 – 24 Stunden inkubieren.
6. 200 µl Vasopressin 125I-Tracer in alle Röhrchen geben.
7. Alle Röhrchen vortexen und bei 2 – 8 °C für 18 – 24 Stunden inkubieren.
8. Während kontinuierlichen Rührens werden 100 µl des Trennungsreagenzes in alle Röhrchen pipettiert, ausgenommen TA-Röhrchen.
9. Vortexen und 30 – 60 Minuten bei 2 – 8 °C inkubieren.
10. Alle Röhrchen für 15 Minuten bei 2 – 8 °C zentrifugieren (1700 g).
11. Den Überstand absaugen oder dekantieren.
12. Den Rückstand für 2 – 4 Minuten messen.

Wichtig: Alle Reagenzien sind auf den Boden der Röhrchen zu pipettieren um vollständiges Durchmischen zu gewährleisten.

	Assay-puffer (D)	Kalibrator Probe oder Kontrolle	Anti- Vasopressin (A)		¹²⁵ I-Vasopressin (B)		Doppel-Antikörper- Festphase (C)	
Total Counts (TC)	-	-	-	Vortexen	200 µL	Vortexen	-	15 min bei
Blank (NSB)	500 µL	-	-	und	200 µL	und	100 µL	1700 g und
St. 0 pmol/L	300 µL	-	200 µL	für	200 µL	für	100 µL	4° C zentrifu-
St. 1.9 pmol/L	-	300 µL	200 µL	18-24 h	200 µL	18-24 h bei	100 µL	gieren.
St. 3.8 pmol/L	-	300 µL	200 µL	bei +4° C	200 µL	+4° C inku-	100 µL	Dekantieren
St. 7.5 pmol/L	-	300 µL	200 µL	inku-bieren	200 µL	bieren	100 µL	und Radio-
St. 15 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL	aktivität der
St. 30 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL	Pellets
St. 60 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL	messen
Kontrollen	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL	(2-4 min).
Proben	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL	

C. Testauswertung

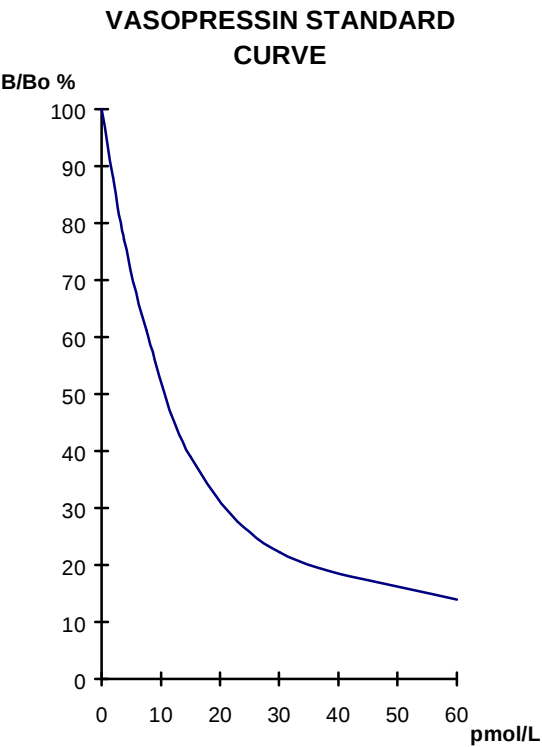
1. Subtraktion der mittleren Counts (cpm) der NSB von den mittleren Counts (cpm) für die Duplikate der Kalibratoren, Referenzkontrollen und Patientenproben.
2. Eine Kalibrationskurve wird erstellt durch Auftragen der cpms oder % B/Bo der präzipierten gebundenen Fraktion gegen die Konzentration der Vasopressin-Standards.
3. Um die Vasopressin-Konzentration in den extrahierten Patientenproben und Referenzkontrollen zu erhalten, werden diese aus der Kalibrationskurve gegenüber den cpms oder % B/Bo der präzipierten gebundenen Fraktion abgelesen.
4. Die Kalibrationskurve kann auch durch eine Computermethode errechnet werden. Für eine automatische Datenreduktion können sowohl logit/log- oder Spline-Methoden verwendet werden.
5. Die Plasma- und Urinwerte werden um die prozentuale Extraktions-Wiederfindung korrigiert.

Urin: Die 24-Stunden-Vasopressinausscheidung wird wie folgt berechnet: ADH pmol/l x Verdünnung x 24-Stunden-Urinvolumen in L. Diese Berechnung ergibt eine Vasopressin-Konzentration von pmol/24 Stunden.

D. Beispiel einer Kalibrationskurve

	Mittelwert cpm	Korrigierte cpm	% B/Bo	Ergebnis (pmol/L)
Total Counts	11107			
NSB	555			
Kalibrator 0 pmol/L	4770	4215	100	
Kalibrator f 1.9 pmol/L	4340	3785	89.8	
Kalibrator e 3.8 pmol/L	3739	3184	75.5	
Kalibrator d 7.5 pmol/L	3135	2580	61.2	
Kalibrator c 15 pmol/L	2199	1644	39.0	
Kalibrator b 30 pmol/L	1490	935	22.2	
Kalibrator a 60 pmol/L	1142	587	13.9	
Kontrolle, niedrig	3741	3186	75.6	4.0
Kontrolle, hoch	1769	1214	28.8	21.1

13 TYPISCHE KALIBRATIONSKURVE



14 TESTCHARAKTERISTIKA

14.1 Präzision									
Intra-Assay					Inter-Assay				
	n	Mittel-pmol/L	SD	% VK		n	Mittel-pmol/L	SD	% VK
Probe A	18	4.17	0.27	6.5	Probe A	6	4.38	0.26	6.0
Probe B	16	20.2	1.00	4.9	Probe B	6	21.4	1.48	6.9

14.2 Kalibrierung
Dieser Assay ist kalibriert gegen den ersten internationalen Kalibrator WHO 77/501

14.3 Wiederfindung			
2 Proben wurden mit verschiedenen Mengen des Vasopressin-kalibrator gespikt.			
Probe	Erwartete Konz. (pmol/L)	Gemessene Konz. (pmol/L)	% Wiederfindung
A1	9.2	9.8	106
A2	14.3	14.4	101
B1	9.6	10.0	104
B2	15.3	15.1	98

14.4 Spezifität

Kaninchen-Vasopressin
Die folgenden Kreuzreaktivitäten wurden bei 50% Bindung (B/Bo) gefunden:

Peptid	% Kreuzreaktivität
Arg ⁸ Vasopressin	100
Oxytocin	<0.1
Lys ⁸ -Vasopressin	<0.1
Desmopressin	<0.1
Arg ⁸ Vasotocin	80

14.5 Sensitivität

Die Sensitivität als die dreifache Standardabweichung des Nullstandards wurde bestimmt mit 0.5 pmol/L

14.6 Normalbereich

Jedes Labor sollte eigene Normalwertbereiche ermitteln.

Plasma: bis zu 13 pmol/L

Urin: 57 ± 22 pmol/24 h Urin

15 LITERATUR

1. Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.
2. Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.
3. Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metab. Clin. North. Am. 17(2) 281.
4. Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.
5. Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.
6. Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.
7. Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.
8. Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.
9. Von Zur Mühlen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.
10. Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.
11. Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.
12. Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.
13. Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.

Revisionsdatum: 2009-06-08



VASOPRESSIN-RIA

it

KIPERB319

DISPOSITIVO DIAGNOSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 USO DEL KIT

Il kit Vasopressin-RIA DIAsource contiene i reattivi e le istruzioni per l'uso per la determinazione quantitativa della vasopressina in campioni di plasma o urine. La concentrazione di vasopressina nel plasma viene determinata dopo un'estrazione in fase solida o con etanolo con un metodo RIA; la vasopressina nelle urine viene determinata senza estrazione preliminare.

Per uso professionale in laboratorio.

2 APPLICAZIONI CLINICHE

La vasopressina, o ormone antidiuretico (ADH) è un nanopeptide ciclico con peso molecolare 1083. La sua struttura è molto simile a quella dell'ossitocina dalla quale differisce per la sostituzione di due aminoacidi. L'ADH endogeno ha attività antidiuretiche e vasopressorie, circa 400 unità per mg per entrambe le molecole, con un rapporto azione antidiuretica/azione vasopressoria uguale a 1, e un'emivita plasmatica bifasica della durata di 2,5 e 14,5 minuti. L'ADH è sintetizzata nei primati nei nuclei sopraottici e paraventricolari dell'ipotalamo e viene trasportata dagli assoni fino all'ipofisi posteriore dove viene immagazzinata e rilasciata. Le indicazioni cliniche del dosaggio RIA della vasopressina sono il diabete insipido, l'intossicazione psicogena da eccesso d'acqua, l'iponatremia, le condizioni di stress, lo studio della molecola come neurotrasmettitore e l'ipertensione. I valori circolanti di ADH possono essere influenzati dal consumo di sigarette, the, caffè, alcool e di alcuni farmaci.

3 PRINCIPIO DEL METODO

La concentrazione di vasopressina nel plasma viene determinata dopo un'estrazione in fase solida o con etanolo con un metodo RIA; la vasopressina nelle urine viene determinata senza estrazione preliminare.

Il kit è un metodo radioimmunologico competitivo che utilizza un anticorpo di coniglio diretto contro la vasopressina e vasopressina marcata con ¹²⁵I. Dopo l'incubazione, il marcato legato all'anticorpo viene precipitato con l'aggiunta di un secondo anticorpo legato a cellulosa. Le provette vengono quindi centrifugate, decantate e contate con un contatore gamma; la concentrazione di vasopressina nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore. I valori finali di vasopressina nei campioni estratti vengono corretti per il fattore di recupero dell'estrazione.

4 PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico in vitro. Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

1. Alcuni reattivi presenti nel kit sono di origine umana e si sono rivelati negativi per HIV1 e HIV2, HBV e HCV. Questi reattivi devono essere manipolati come in grado di trasmettere malattie infettive. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che questi o altri agenti infettivi siano assenti. Manipolare questi reattivi come potenziali fonti di infezioni. Manipolare tutti i campioni di sangue come potenziali fonti di infezioni.
2. Alcuni reattivi contengono sodio azide come conservante, che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Le tubature eventualmente interessate da questi depositi esplosivi devono essere lavate con una soluzione di idrossido di sodio 10 %.
3. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. 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. 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.

- Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici.
- Non pipettare materiale radioattivo con pipette a bocca.
- Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo.
- I banchi da lavoro devono essere sempre coperti con carta assorbente monouso.
- Il materiale di laboratorio e la strumentazione soggetta ad una possibile contaminazione devono essere dedicati all'uso di un singolo isotopo per evitare cross-contaminazioni con isotopi differenti.
- Il materiale radioattivo eventualmente disperso nell'ambiente di lavoro deve essere immediatamente asportato con carta assorbente che deve poi essere eliminata nei contenitori per rifiuti radioattivi solidi. Le superfici interessate devono essere lavate con un liquido decontaminante adeguato.

Alcuni reattivi presenti nel kit contengono sodio azide (0,05 %), che può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosivi. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Le tubature che dovessero dimostrarsi contaminate con depositi potenzialmente esplosivi devono essere lavate facendo scorrere abbondantemente una soluzione al 10% di NaOH.

5 RACCOLTA DEI CAMPIONI

E' molto importante provvedere ad una attenta standardizzazione della preparazione dei pazienti e del condizioni di prelievo.

5.1 Vasopressina nel plasma

- Raccogliere i campioni da pazienti a digiuno in provette mantenute in bagno di acqua e ghiaccio e contenenti EDTA o eparina.
- Separare il plasma per centrifugazione a 4°C.
- Portare immediatamente il plasma a -20°C o a temperature inferiori fino al momento del dosaggio.

NOTA: La vasopressina (ADH) è stabile -20° C nel plasma solo per 4 settimane, o fino a 3 mesi dopo l'aggiunta alle provette di 500 KIU di Trasylol (Bayer) per mL di sangue intero; dopo l'estrazione.

5.2 Vasopressina nelle urine

La vasopressina può essere determinata direttamente in urine umane non estratte.

- Raccogliere le urine delle 24 ore.
- Registrare il volume delle urine.
- Misurare l'osmolarità delle urine.
- Se il dosaggio non viene eseguito immediatamente, conservare un'aliquota di urine a -20° C.
- Misurare i campioni di urine senza diluizione o diluiti 1:2, 1:4 o a diluizioni maggiori.

6 MATERIALE RICHIESTO, MA NON FORNITO

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio, è richiesto il materiale seguente:

Acqua distillata

Micropipette di precisione con puntali monouso (100, 200, 300 µL e 1 mL)

Pipette da 2 e 5 mL

Micropipette semiautomatiche 100 e 200 µL

Cilindro da 25 mL

Provette in polistirene 12 x 75 mm

Etanolo PA 99%

Agitatore tipo Vortex

Centrifuga refrigerata (min. 1700 x g)

Bagno di acqua e ghiaccio

Contatore gamma programmato per leggere ¹²⁵I.

Evaporatore centrifugo o sistema di evaporazione in corrente d'azoto

Provette in polistirene o in vetro per l'estrazione dei campioni (16 x 100 mm)

Sep-pak C18

Acido acetico 4%

Metanolo PA (99%)

HCl 1M

Contatore gamma

7 CONTROLLO DI QUALITA'

Utilizzare sempre i controlli. Con kit sono forniti 2 controlli che non devono essere estratti e i cui valori sono riportati sul foglio del controllo di qualità e sulle etichette dei rispettivi flaconi. Utilizzare i controlli come indicato dal produttore e per verificare l'accuratezza e la precisione dei reattivi e dell'attrezzatura di laboratorio.

E' importante eseguire il test di recupero operando nelle stesse condizioni di estrazione dei campioni.

8 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI REATTIVI

Il kit è stabile fino alla data riportata sulla confezione se conservato come prescritto.

Conservare i reattivi prima della ricostituzione a 2-8°C. I reattivi ricostituiti sono stabili se conservati come prescritto nella tabella successiva, ma non oltre la data riportata sull'etichetta di ciascun flacone.

9 CONTENUTO DEL KIT

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

 1 vial, anticorpo anti-vasopressina da coniglio, liofilizzato. Per 100 determinazioni.
Colore : giallo.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Aa | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

 1 vial, 28 KBq or 0.75 µCi. liofilizzato. Attività specifica : 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Colore : blu.
- | | | |
|------|---|------|
| REAG | C | DASP |
|------|---|------|

 1 vial, IgG anti coniglio da capra, legate a fase solida.
Sospensione di 11 mL.
- | | | | |
|------|---|-------|-----|
| REAG | D | ASSAY | BUF |
|------|---|-------|-----|

 2 vials, tampone fosfato 0,05 M, pH 7.4 con HSA 0,25 %, EDTA-Na₂ 0,25 %, NaN₃ 0,05 %, Trasylol 500 KIU/mL 2 x 50 mL (liquido).

5.

REAG	E	CAL
------	---	-----

 1 vial, calibratore di vasopressina, 5.00 mL, 60 pmol/L. Liofilizzato in tampone.

6.

REAG	F	Control
------	---	---------

 1 vial, controllo di vasopressina, livello basso, 2,0 mL.

7.

REAG	G	Control
------	---	---------

 1 vial, controllo di vasopressina, livello elevato, 2,0 mL.

10 PREPARAZIONE DEI REATTIVI

Reattivo	Ricostituzione		Stabilità	Note
Anti vasopressina (Reattivo A)	22 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, tre mesi dopo ricostituzione	
Vasopressina - ¹²⁵ I (Reattivo B)	25 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, fino alla data di scadenza	
Secondo anticorpo-fase solida (Reattivo C)	Pronto per l'uso. Il reattivo deve essere agitato con agitatore magnetico per 10 min a temperatura ambiente		A 2-8°C, fino alla data di scadenza	E' possibile pipettare il reattivo con una pipetta a ripetizione automatica
Tampone (Reattivo D)	Pronto per l'uso.		A 2-8°C, fino alla data di scadenza	
Calibratore di vasopressina, 60 pmol/L (Reattivo E)	5,0 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, tre mesi dopo ricostituzione	Fare riferimento alla tabella per la preparazione della curva calibratore
Controllo di vasopressina, livello basso (Reattivo F)	2,0 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, tre mesi dopo ricostituzione	La concentrazione del controllo è riportata sull'etichetta del flacone e sul foglio del controllo di qualità. Il controllo non deve essere estratto
Controllo di vasopressina, livello elevato (Reattivo G)	2,0 mL di acqua distillata	Agitare delicatamente	A -20°C, tre mesi dopo ricostituzione	La concentrazione del controllo è riportata sull'etichetta del flacone e sul foglio del controllo di qualità. Il controllo non deve essere estratto

RICOSTITUIRE I REATTIVI 15 MINUTI PRIMA DELL'USO

11 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Prima del dosaggio RIA è necessario procedere all'estrazione dei campioni che può essere eseguita secondo due diversi metodi:

A1 : Estrazione con Sep-pak C18

A2 : Estrazione con etanolo

A1: Metodo per l'estrazione dei campioni di plasma con Sep-pak C18

Colonne: Cartucce Sep-pak C18 (Waters Ass. Inc. art. 051910)

Nota: NON ESTRARRE CALBRATORE E CONTROLLI.

1. Lavare in successione le colonne con 10 mL di acqua distillata, 5 mL di metanolo e 10 mL di acqua distillata.
2. Acidificare 1.0 mL di campione con 150 µL di HCl 1M.
3. Applicare i campioni acidificati sulle colonne.
4. Lavare le colonne con 20 mL di acido acetico 4%.
5. Eluire con 4 mL di metanolo.
6. Portare a secco il metanolo in corrente di azoto.
7. Ricostituire il residuo secco con 1.0 mL di tampone.
8. Eseguire immediatamente la procedura RIA, oppure conservare i campioni, previa estrazione, a -20°C.

Per stimare il recupero aggiungere 200 µL di marcato, vasopressina-¹²⁵I ad un campione ed eseguire la procedura di estrazione come descritto in precedenza.

Calcolo del recupero

- a/. Preparare una provetta per la stima del recupero (R).
- Pipettare 1.0 mL di un campione nella provetta per il recupero (R). Il campione usato per il recupero deve avere una matrice proteica simile a quello degli altri campioni che verranno estratti.
- Aggiungere 200 µL di vasopressina-¹²⁵I nella provetta R e agitare su vortex.
- Estrarre questo campione insieme agli altri come descritto in precedenza.

- b/. Preparare due provette per il controllo del recupero totale (TR).
 - Pipettare 200 µL di vasopressina-¹²⁵I nelle provette TR.
 - Aggiungere 100 µL di tampone e agitare su vortex.
 - Tappare e mettere da parte per il conteggio e il calcolo del recupero.
- c/. Recostituire il residuo secco del campione per la stima del recupero (R) con 1.0 mL di tampone e agitare su vortex.
- d/. Pipettare 300 µL del campione per il recupero ricostituito (R) in due provette.
- e/. Contare le provette (TR) e le provette (R) per almeno due minuti con un contatore gamma.

Calcolare la percentuale di recupero dividendo le cpm delle provette (R) per le cpm delle provette (TR) e moltiplicare per 3.33:

$$\text{Recupero \%} : \frac{\text{cpm delle provette per il recupero (R)}}{\text{cpm delle provette del recupero totale (TR)}} \times 3.33 \times 100\%$$

Il recupero deve essere compreso tra 60 e 80%.

A2: Metodo per l'estrazione dei campioni di plasma con etanolo

Nota: NON ESTRARRE CALIBRATORE E CONTROLLI.

- Numerare una provetta per l'estrazione (E) per ciascun campione. Numerare una provetta (R) per la stima del recupero.
- Mettere le provette e l'etanolo in bagno di acqua e ghiaccio.
- Pipettare 0.8 mL di ciascun campione nelle rispettive provette (E).
- Preparare una provetta per la stima del recupero (R).
 - Pipettare 0.8 mL di un campione nella provetta (R). Il campione usato per il recupero deve avere una matrice proteica simile a quello degli altri campioni che verranno estratti.
 - Aggiungere 200 µL di vasopressina-¹²⁵I nella provetta R e agitare su vortex.
 - Estrarre questo campione insieme agli altri come descritto nei punti successivi.
- Preparare due provette per il controllo del recupero totale (TR).
 - Pipettare 200 µL di vasopressina-¹²⁵I nelle provette TR.
 - Aggiungere 100 µL di tampone e agitare su vortex.
 - Tappare e mettere da parte per il conteggio e il calcolo del recupero.
- Aggiungere 4 mL di etanolo freddo a ciascuna provetta E e alla provetta R.
- Agitare su vortex per 2 minuti.
- Centrifugare tutte le provette (E e R) a 2000 g. per 15 min. a 2-8° C.
- Decantare il surnatante di tutte le provette per l'estrazione in nuove provette da 16 x 100 mm opportunamente numerate.
- Evaporare i surnatanti in corrente di azoto (a max. 37° C) o con un evaporatore centrifugo a vuoto.
- Ricostituire i residui secchi di ciascun campione con 0.8 mL di tampone e agitare a fondo su vortex.
- Procedere immediatamente con il dosaggio RIA o conservare gli estratti a -20° C fino al momento del dosaggio. In queste condizioni gli estratti sono stabili fino a 2 settimane.
- Ricostituire il residuo secco del campione per il recupero (R) con 0.8 mL di tampone e agitare a fondo su vortex.
- Pipettare 300 µL del campione per il recupero ricostituito (R) in due provette.
- Contare le provette (TR) e le provette (R) per almeno due minuti con un contatore gamma.

Calcolo del recupero

Calcolare la percentuale di recupero dividendo le cpm delle provette (R) per le cpm delle provette (TR) e moltiplicare per 2.67:

$$\text{Recupero \%} : \frac{\text{cpm delle provette per il recupero (R)}}{\text{cpm delle provette del recupero totale (TR)}} \times 2.67 \times 100\%$$

Il recupero deve essere compreso tra 40 e 50%.

12 METO DEL DOSAGGIO

Dosare in duplicato calibratore, controlli e campioni.

A. Preparazione delle soluzioni di lavoro degli calibratore

Diluzione	Reattivo E (=calibratore a)	Concentrazione di vasopressina 60 pmol/L
1000 µL di Reattivo E + 1000 µL di tampone. Agitare su vortex	calibratore b	30 pmol/L
1000 µL of calibratore b + 1000 µL di tampone. Agitare su vortex	calibratore c	15 pmol/L
1000 µL of calibratore c + 1000 µL di tampone. Agitare su vortex	calibratore d	7.5 pmol/L
1000 µL of calibratore d + 1000 µL di tampone. Agitare su vortex	calibratore e	3.8 pmol/L
1000 µL of calibratore e + 1000 µL di tampone. Agitare su vortex	calibratore f	1.9 pmol/L
	tampone	0 pmol/L

B. Dosaggio

1. Dopo la preparazione degli calibratore pipettare 300 µL di calibratore, controlli, Estratti ricostituiti dei campioni, o urine diluite nelle rispettive provette
2. Aggiungere 300 µL di tampone (Reattivo D) nelle provette 0 pmol/L (capacità legante massima) e 500µL di tampone alle provette per gli NSB.
3. Aggiungere 200 µL di anticorpo anti vasopressina (Reattivo B) in tutte le provette quelle per gli NSB e quelle per l'attività totale.
4. Agitare su vortex e incubare 18 –24 ore a 4°C.
5. Aggiungere 200 µL di vasopressina-¹²⁵I (Reattivo B) in tutte le provette
6. Agitare su vortex e incubare 18 –24 ore a 4°C.
7. Pipettare 100 µL di secondo anticorpo-fase solida (Reattivo C) mantenuto in sospensione in tutte le provette eccetto quelle per l'attività totale.
8. Agitare su vortex e incubare 30 - 60 minuti a 4°C.
9. Centrifugare tutte le provette, eccetto quelle per l'attività totale, 15 minuti a 1700 g a 4°C
10. Decantare con cura i surnatanti.
11. Contare tutte le provette con un contatore gamma per 2-4 minuti.

	Tampone	Calibratore Campioni o controlli	Anti- Vasopressina		Vasopressina- ¹²⁵ I		Secondo anticorpo			
	(D)		(A)		(B)		(C)			
Att. totale (TC)	-	-	-	Agitare su vortex e incubare 18-24 ore a 4°C	200 µL	Agitare su vortex e incubare 18-24 ore a 4°C	-	Agitare su vortex e incubare 30-60 minuti a 4°C.	Agitare su vortex e centrifugare 15 minuti a 1700 g a 4° C. Aspirare o decantare il surnatante. Contare la radioattività del precipitato per 2-4 minuti.	
NSB	500 µL	-	-		200 µL		200 µL			100 µL
St. 0 pmol/L	300 µL	-	200 µL		200 µL		100 µL			
St. 1.9 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL			
St. 3.8 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL			
St. 7.5 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL			
St. 15 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL			
St. 30 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL			
St. 60 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL			
Controlli	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL			
Campioni	-	300 µL	200 µL	200 µL	100 µL					

C. Calcolo dei risultati

1. Sottrarre la media delle cpm degli NSB degli calibratore dalle cpm dei replicati degli standard; sottrarre la media delle cpm degli NSB dei campioni dalle cpm dei replicati dei controlli e dei campioni.
2. Generare la curva calibratore riportando in ordinata le cpm della frazione legata B o il rapporto di competizione B/T% e in ascissa le concentrazioni degli calibratore.
3. Le concentrazioni di Gastrina in campioni e controlli vengono calcolate per interpolazione delle rispettive cpm della frazione legata B o del rapporto di competizione B/T% sulla curva calibratore.
4. Se si usa un sistema di elaborazione computerizzato, usare il metodo di interpolazione Spline.
5. Correggere il valore ottenuto per recupero.

Urine: calcolare l'escrezione di vasopressina nelle 24 ore:

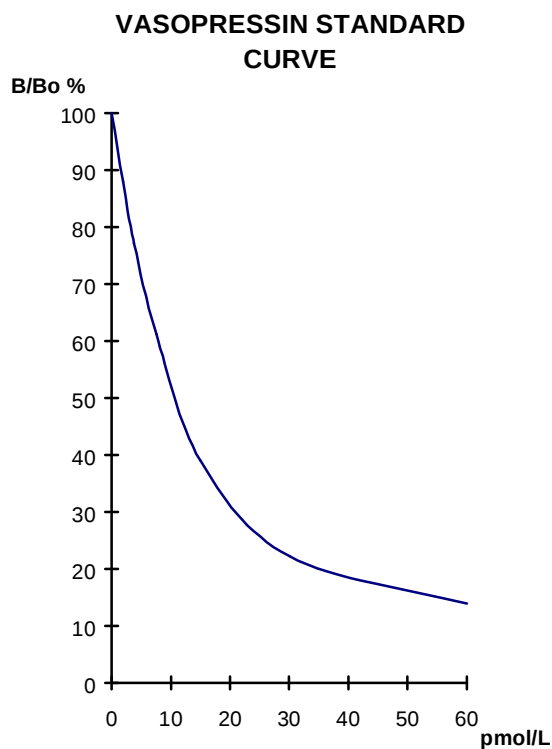
Vasopressina pmol/L x diluzione x volume in L delle urine delle 24 ore.

Questa equazione permette di calcolare la concentrazione di vasopressina in pmol/24 hours.

D. Curva Calibratore

	Media delle cpm	cpm corrette	B/Bo %	Risultati (pmol/L)
Attività totale	11107			
NSB	555			
Calibratore 0 pmol/L	4770	4215	100	
Calibratore f 1.9 pmol/L	4340	3785	89.8	
Calibratore e 3.8 pmol/L	3739	3184	75.5	
Calibratore d 7.5 pmol/L	3135	2580	61.2	
Calibratore c 15 pmol/L	2199	1644	39.0	
Calibratore b 30 pmol/L	1490	935	22.2	
Calibratore a 60 pmol/L	1142	587	13.9	
Controllo basso	3741	3186	75.6	4.0
Controllo alto	1769	1214	28.8	21.1

13 ESEMPIO CURVA CALBRATORE



14 CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

14.1 Precisione									
Intra saggio					Inter saggio				
	n	media pmol/L	DS	c.v.%		n	media pmol/L	DS	c.v.%
Camp. A	18	4.17	0.27	6.5	Camp. A	6	4.38	0.26	6.0
Camp. B	16	20.2	1.00	4.9	Camp. B	6	21.4	1.48	6.9

14.2 Calibrazione
Il dosaggio è calibrato contro il first international WHO calibratore 77/501

14.3 Recupero			
A due diversi compioni sono state aggiunte differenti quantità di calibratore di vasopressina			
Campione	Conc. attesa (pmol/L)	Conc. osservata (pmol/L)	Recupero%
A1	9.2	9.8	106
A2	14.3	14.4	101
B1	9.6	10.0	104
B2	15.3	15.1	98

14.4 Specificità

L'anticorpo anti vasopressina è prodotto in coniglio.
Sono state calcolate le seguenti cross reazioni al 50% di legame (B/Bo)

Peptide	Cross reazione %
Arg ⁸ vasopressina	100
Ossitocina	<0.1
Lys ⁸ -vasopressina	<0.1

Desmopressina	<0.1
Arg ⁸ vasotocina	80

14.5 Sensibilità

La sensibilità, calcolata come dose calcolata dalla curva calibratore della media – 3 DS delle cpm dello standard zero è risultata essere 0.5 pmol/L.

14.6 Valori normali

Ogni laboratorio deve stabilire i propri intervalli normali di valori.

Plasma: fine a 13 pmol/L

Urine: 57 ± 22 pmol/24 ore

15 BIBLIOGRAFIA

1. Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.
2. Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.
3. Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metab. Clin. North. Am. 17(2) 281.
4. Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.
5. Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.
6. Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.
7. Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressine in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.
8. Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.
9. Von Zur Mühlen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.
10. Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.
11. Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.
12. Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.
13. Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.

Data di revisione: 2009-06-08



VASOPRESSIN-RIA

es

KIPERB319

USO EN DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIASource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 APLICACIÓN

El kit de la Vasopressin-RIA de DIASource contiene reactivos e instrucciones para la medición cuantitativa de la vasopresina en plasma u orina. En las mediciones en plasma, después de una extracción de fase sólida (SPE) o de una extracción de etanol, las concentraciones de vasopresina se miden mediante un radioinmunoensayo (RIA). Las concentraciones de vasopresina en orina pueden medirse directamente. Sólo para uso profesional en el laboratorio.

2 APLICACIÓN CLÍNICA

La vasopresina, también conocida como hormona antidiurética (ADH), es un nanopéptido cíclico con un peso molecular de 1083. Su estructura se parece mucho a la de la oxitocina, de la que difiere solamente en dos aminoácidos. La ADH endógena posee una actividad antidiurética y presora, ambas aproximándose a 400 unidades por mg, con una razón antidiurética / vasopresina de 1, y una media vida bifásica en plasma de 2,5 y 14,5 minutos. La ADH se sintetiza en el núcleo supraóptico del hipotálamo y en los núcleos paraventriculares de los primates y es transportada mediante flujo axonal a la hipófisis posterior, donde se almacena para su ulterior liberación. La aplicación clínica del radioinmunoensayo de vasopresina es el diagnóstico de la diabetes insípida, la intoxicación de agua psicógena, la hiponatremia, los trastornos de estrés, la ADH como neurotransmisor y los estudios de hipertensión. Los valores de ADH pueden verse alterados por el consumo de tabaco, té, café, alcohol y algunos fármacos.

3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Después de una extracción de fase sólida (SPE) o de una extracción con etanol de las muestras de plasma, la vasopresina se mide mediante un radioinmunoensayo competitivo. La vasopresina contenida en la orina se puede medir directamente. Este ensayo utiliza un antisuero de conejo anti-vasopresina y un trazador de vasopresina radioiodada [I^{125}]. Las fases fijadas y libres se separan mediante un doble anticuerpo ligado a partículas en fase sólida, y después se centrifugan. Seguidamente se mide la radiactividad de las fracciones fijadas y se puede generar una curva de calibración típica. Los valores de las muestras extraídas se corrigen para la recuperación de extracción.

4 PRECAUCIONES

Todos los materiales derivados de sangre humana y utilizados en la preparación de este kit fueron probados y dieron negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), los anticuerpos del HCV y los anticuerpos del HIV-1 y HIV-2. Aún así, manejar todos los componentes como si fueran una posible fuente de infección.

Este kit contiene I^{125} (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Los materiales radiactivos incluidos podrán ser recibidos, adquiridos, poseídos y utilizados sólo por médicos, laboratorios clínicos o hospitales para pruebas in vitro o de laboratorio sin que los materiales, ni la radiación derivada de ellos, puedan ser administrados interna o externamente a seres humanos o animales. Su recepción, posesión, uso y transferencia están sujetos a la regulación de cada país.

El respeto de las reglas básicas de seguridad sobre radiactividad debería proporcionar una protección adecuada.

- No comer, beber, fumar o utilizar cosméticos donde se estén utilizando materiales radiactivos.
- No pipetear soluciones radiactivas con la boca.
- Evitar el contacto directo con todos los materiales radiactivos mediante la utilización de artículos tales como batas de laboratorio y guantes no reutilizables.
- Todo el trabajo radiológico debe hacerse en un área específica.
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en sus envases originales en un área específica.
- El equipo del laboratorio y toda la cristalería, que están sujetos a contaminación, deberían segregarse para evitar una contaminación cruzada de radioisótopos diferentes.
- En caso de derrame, el material radiactivo debe recogerse inmediatamente de acuerdo con los procedimientos establecidos al respecto.
- Todos los materiales radiactivos se deben eliminar de acuerdo con las regulaciones y pautas de la autoridad con jurisdicción sobre el laboratorio.

Los reactivos en este kit contienen azida sódica (0,05%). La azida sódica puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías formando azidas metálicas altamente explosivas. A la hora de verter los residuos en las tuberías, utilizar un gran volumen de agua para evitar que se forme este tipo de azidas. Asimismo, también se debería verter ocasionalmente un 10% de hidróxido de sodio en las tuberías de metal.

5 RECOGIDA DE LA MUESTRA

Se recomienda estandarizar con cuidado la preparación del paciente y las condiciones de muestreo.

5.1 Vasopresina en plasma

- Extraer sangre del paciente en ayunas y verterla en un tubo enfriado, que contenga EDTA o heparina.
- Centrifugar a 4° C para separar el plasma.
- Congelar la muestra en tubos de plástico a -20° C hasta el momento del ensayo.

NOTA: La vasopresina (ADH) en plasma es estable a -20° C sólo durante 4 semanas, o hasta 3 meses si se le añade 500 KIU de Trasylol (Bayer) por ml de sangre, después de la extracción.

5.2 Vasopresina en la orina

La vasopresina se puede determinar directamente, en orina humana no extraída.

- Recoger una muestra de orina de 24 horas.
- Registrar el volumen de la orina.
- Medir la osmolaridad de la orina.
- Si la muestra no se analiza inmediatamente, conservar una alícuota a -20° C.
- Medir las muestras de orina no diluidas y en diluciones de 1:2, 1:4 o superiores.

6 MATERIALES Y EQUIPO NECESARIOS

Pipetas (100 µL, 200 µL, 300 µL, 1 ml, 2 ml, 5 ml)
Dosificadores de repetición (100 µL, 200 µL)
Cilindro medidor de 25 ml
Tubos RIA de polietileno (12 x 75 mm)
Etanol absoluto (99%)
Agitador
Centrifuga
Baño de hielo
Concentrador de vacío
Gas nitrógeno
Tubos de polietileno o vidrio para la extracción (16 x 100 mm)
Sep-pak C18 (Waters Ass Inc. art. 051910)
Ácido acético al 4%
Metanol absoluto (99%)
HCl 1 N
Contador gamma

7 CONTROL DE CALIDAD

Los controles deben efectuarse para cada ensayo. Se incluyen dos controles en el kit, el valor (sin procedimiento de extracción) se indica en la hoja de Control de Calidad y en la etiqueta de los viales. Utilizar también controles recomendados por el fabricante del control de plasma y de acuerdo con la buena práctica clínica de referencia para monitorizar la precisión y la exactitud de las técnicas y los reactivos. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propia recuperación de extracción bajo sus propias condiciones experimentales.

8 CADUCIDAD Y ALMACENAMIENTO DE LOS REACTIVOS

Este kit es estable hasta la citada fecha de caducidad si se almacena tal como se especifica.

A partir del momento de recepción del kit, todos los reactivos deben almacenarse a 2-8° C.

Los reactivos reconstituidos deben almacenarse de acuerdo con la tabla de la párrafo 10.

Los reactivos reconstituidos son estables de acuerdo a la tabla de la párrafo 10, pero no más allá de su fecha de caducidad.

9 COMPONENTS

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

1 vial, anti-vasopresina liofilizada (Conejo) para 100 tubos.
Color : amarillo.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Aq | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

1 vial, 28 KBq or 0.75 µCi. Liofilizada. Actividad específica : 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Color : azul.
- | | | |
|------|---|------|
| REAG | C | DASP |
|------|---|------|

1 vial, anti-Ig de conejo de cabra unido a fase sólida.
Suspensión de 11 mL.
- | | | | |
|------|---|----|-----|
| REAG | D | AS | BUF |
|------|---|----|-----|

2 vials, tampón fosfato de 0.05 M, 0.25 % de HSA, 0.25 % de sal disódica EDTA, 0.05 % 0.05 % NaN₃, 500 KIU Trasylol/mL. 2 x 50 mL (líquido)
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

1 vial, 5.00 mL del estándar de vasopresina, 60 pmol/l. Liofilizado en tampón de ensayo

6. 1 vial, 2.00 mL del control de vasopresina liofilizado, nivel bajo.

REAG	F	Control
------	---	---------

7. 1 vial, 2.00 mL de control de vasopresina liofilizado, nivel alto.

REAG	G	Control
------	---	---------

10 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Reactivo	Reconstituir cada vial con		Estable a	Comentarios especiales
Anti-vasopresina (Reactivo A)	22 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C por lo menos 3 meses después de la reconstitución	
Vasopresina I- ¹²⁵ (Reactivo B)	25 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C hasta la fecha de caducidad	
Fase sólida de doble anticuerpo (Reactivo C)	Listo para el uso. El reactivo de separación debe colocarse en un agitador magnético durante 10 minutos a temperatura ambiente.		2-8° C hasta la fecha de caducidad	Es posible pipetear el reactivo con un dosificador de repetición
Tampón de ensayo (Reactivo D)	Listo para el uso.		2-8° C hasta la fecha de caducidad	
Calibrador de vasopresina 60 pmol/L (Reactivo E)	5 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C por lo menos 3 meses después de la reconstitución	Consultar la tabla para la preparación de la curva de calibración
Vasopresina, control bajo (Reactivo F)	2 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C por lo menos 3 meses después de la reconstitución	El valor de control figura en la etiqueta del vial y en la hoja del control de calidad (sin extracción)
Vasopresina, control alto (Reactivo G)	2 ml agua destilada	Mezclar con suavidad	-20° C por lo menos 3 meses después de la reconstitución	El valor de control figura en la etiqueta del vial y en la hoja del control de calidad (sin extracción)

PREPARAR TODOS LOS REACTIVOS 15 MINUTOS ANTES DE UTILIZARLOS!

11 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Antes de proceder a aplicar el procedimiento RIA, se pueden utilizar dos métodos diferentes de preparación de la muestra:

A1 : Extracción con Sep-pak C18

A2 : Extracción con etanol

A1: Procedimiento de extracción con Sep-pak C18

Columna: cartucho Sep-pak C18 (Waters Ass. Inc. art. 051910)

Procedimiento: NO EXTRAER LOS CALIBRADORES NI LOS CONTROLES.

1. Lavar la columna con 10 ml de agua destilada, 5 ml de metanol y 10 ml de agua destilada, respectivamente.
2. Acidificar 1 ml de la muestra de plasma con 150µL HCl 1 N
3. Colocar la muestra acidificada en la columna.
4. Lavar la columna con 20 ml de ácido acético al 4%.
5. Eluir con 4 ml de metanol.
6. Secar el metanol con un chorro de nitrógeno o aire.
7. Reconstituir el residuo con 1 ml de tampón de ensayo.
8. Seguir el manual estándar de RIA, si la muestra no se analiza inmediatamente, conservar una alícuota a -20° C.

Para estimar la recuperación, añadir una alícuota (200 µL) de trazador de vasopresina I-¹²⁵ a una muestra de plasma aleatoria y someter la muestra de recuperación al mismo procedimiento de extracción.

Cálculo de la recuperación

- a/. Preparar un tubo de estimación de la recuperación (R).
 - Pipetear 1 ml de la muestra de plasma aleatoria en el tubo de recuperación (R). La muestra utilizada en este ensayo de recuperación debe tener una matriz proteica similar a las muestras que se están analizando.
 - Añadir 200 µL del trazador de vasopresina I-¹²⁵ al tubo R y mezclar.
 - Extraer esta muestra junto con las muestras del procedimiento arriba expuesto.
- b/. Preparar dos tubos de Recuperación Total (TR).
 - Pipetear 200µL del trazador de vasopresina I-¹²⁵ en dos tubos TR.
 - Añadir 100µL de tampón de ensayo y mezclar.
 - Tapar y separar este tubo a fin de efectuar el conteo del cálculo de la recuperación

- c/. Reconstituir la muestra de recuperación desecada (R) añadiendo 1 ml de tampón de ensayo y mezclar bien
- d/. Pipetear 300 µL del tubo de la muestra de recuperación reconstituida (R) en dos tubos de ensayo.
- e/. Efectuar el conteo en los tubos de recuperación total (TR) y de recuperación (R) durante por lo menos dos minutos con un contador gamma.

Calcular el % de recuperación dividiendo las CPM de los tubos de recuperación (R) por las CPM de los tubos de recuperación total (TR) y multiplicando el resultado por 3,33:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{CPM del tubo de recuperación (R)}}{\text{CPM del tubo de recuperación total}} \times 3,33 \times 100\%$$

Las recuperaciones de extracción deberían alcanzar valores comprendidos entre el 60 y el 80%.

A2: Procedimiento de extracción con etanol

NO EXTRAER LOS CALIBRADORES NI LOS CONTROLES

1. Etiquetar un tubo de extracción (E) para cada muestra del paciente. Etiquetar un tubo adicional (R) para estimar la recuperación de extracción.
2. Colocar los tubos de extracción y etanol en hielo.
3. Pipetear 0,8 ml de cada muestra en los tubos de extracción (E) adecuadamente etiquetados.
4. Preparar un tubo de estimación de la recuperación (R).
 - Pipetear 0,8 ml de la muestra de plasma aleatoria en el tubo de recuperación (R). La muestra utilizada en este ensayo de recuperación debe tener una matriz proteica similar a las muestras que se están analizando.
 - Añadir 200 µL del trazador de vasopresina I-¹²⁵ al tubo R y mezclar.
 - Extraer esta muestra junto con las muestras del paso 6.
5. Preparar dos tubos de Recuperación Total (TR).
 - Pipetear 200µL del trazador de vasopresina I-¹²⁵ en dos tubos TR.
 - Añadir 100µL de tampón de ensayo y mezclar.
 - Tapar y separar este tubo a fin de efectuar el conteo del cálculo de la recuperación
6. Añadir 4 ml de etanol enfriado a cada muestra (tubos E) y al Tubo de Recuperación (R).
7. Mezclar y agitar durante 2 minutos.
8. Centrifugar todos los tubos de extracción (E y R) a 2000 g. durante 15 minutos a 2-8° C.
9. Decantar el sobrenadante de cada tubo de extracción en tubos de 16 x 100 mm, previamente preparados, limpios y adecuadamente etiquetados.
10. Evaporar los sobrenadantes con un chorro de nitrógeno hasta que se sequen (a 37° C como máximo), o evaporar utilizando un concentrador de vacío.
11. Reconstituir las muestras desecadas añadiendo 0,8 ml de tampón de ensayo y mezclar bien.
12. Aplicar el procedimiento RIA inmediatamente o conservar las muestras extraídas a -20° C durante un máximo de dos semanas antes de utilizar el ensayo.
13. Reconstituir las muestras desecadas añadiendo 0,8 ml de tampón de ensayo y mezclar bien.
14. Pipetear 300 µL del tubo de la muestra de recuperación reconstituida (R) en dos tubos de ensayo.
15. Efectuar el conteo en los tubos de recuperación total (TR) y de recuperación (R) durante por lo menos dos minutos con un contador gamma.

Cálculo de la recuperación

Calcular el % de recuperación dividiendo las CPM de los tubos de recuperación (R) por las CPM de los tubos de recuperación total (TR) y multiplicando el resultado por 2,67:

$$\% \text{ de recuperación} = \frac{\text{CPM del tubo de recuperación (R)}}{\text{CPM del tubo de recuperación total}} \times 2,67 \times 100\%$$

Las recuperaciones de extracción deberían alcanzar valores comprendidos entre el 40 y el 50%.

12 PROTOCOLO DEL ENSAYO

Todas las pruebas (calibradores, controles y muestras) deben hacerse por duplicado.

A. Preparación de soluciones estándar

Dilución	Reactivo E (=calibrador a)	Concentración de vasopresina 60 pmol/l
Mezclar 1000µL de Reactivo E y 1000µL de tampón de ensayo	calibrador b	30 pmol/l
Mezclar 1000µL de calibrador b y 1000µL de tampón de ensayo	calibrador c	15 pmol/l
Mezclar 1000µL de calibrador c y 1000 µL de tampón de ensayo	calibrador d	7,5 pmol/l
Mezclar 1000µL de calibrador d y 1000 µL de tampón de ensayo	calibrador e	3,8 pmol/l
Mezclar 1000µL de calibrador e y 1000 µL de tampón de ensayo	calibrador f	1,9 pmol/l
	Tampón de ensayo	0 pmol/l

B. Procedimiento del ensayo

- Después de preparar las soluciones calibrador, pipetear 300 µL de cada calibrador, de los controles, de cada extracto de plasma, o de la orina diluida en los tubos correspondientes etiquetados.
- Añadir 300 µL de tampón de ensayo (Reactivo D) a los tubos de fijación máxima (fijación de 0 pmol/L) i 500µL de tampón de ensayo a los tubos NSB.
- Añadir 200 µL de antisuero de vasopresina (reactivo A) a todos los tubos, exceptuando los tubos NSB y los totales TC.
- Mezclar todos los tubos e incubar a 4° C durante 18-24 horas.
- Añadir 200 µL de vasopresina I-¹²⁵ (Reactivo B) a todos los tubos
- Mezclar todos los tubos e incubar a 4° C durante 18-24 horas.
- Mientras se agitan continuamente, añadir 100µL de fase sólida de doble anticuerpo (Reactivo C) a todos los tubos, exceptuando los tubos TC.
- Mezclar e incubar durante 30-60 minutos a 4° C.
- Centrifugar todos los tubos durante 15 minutos a 1700 g y 4° C.
- Decantar o aspirar los sobrenadantes.
- Contar los residuos durante 2-4 minutos.

	Tampón de Ensayo	Calibrador o muestra a medir	Anti-Vasopresina		Vasopresina I- ¹²⁵		Fase sólida de doble anticuerpo		
	(D)		(A)		(B)		(C)		
Cuentas totales (TC) (NSB)	-	-	-	Agitar y	200 µL	Agitar y	-		Centrifugar
Calib. 0 pmol/l	500 µL	-	-	incubar	200 µL	incubar	100 µL		durante 15
Calib. 1,9 pmol/l	300 µL	-	200 µL	durante	200 µL	durante	100 µL		minutos a
Calib. 3,8 pmol/l	-	300 µL	200 µL	18-24	200 µL	18-24	100 µL		1700 g a
Calib. 7,5 pmol/l	-	300 µL	200 µL	horas	200 µL	horas	100 µL		4° C.
Calib. 15 pmol/l	-	300 µL	200 µL	a +4° C.	200 µL	a +4° C.	100 µL		Aspirar o
Calib. 30 pmol/l	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		decantar los
Calib. 60 pmol/l	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		supernadante
Controles	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		s.
Muestra desconocida	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		Contar los
									precipitados
									durante 2-4
									minutos.

C. Cálculo

- Restar la media de las CPM de los tubos NSB de la media de los duplicados de los calibradores, controles y muestras del paciente.
- Se puede obtener una curva de calibración representando las CPM, el % B/Bo o el % B/T de la fracción fijada en función de la concentración de los calibradores de vasopresina.
- Seguidamente, para obtener la concentración de vasopresina en las muestras extraídas del paciente y los controles, se interpolan los CPM, % B/Bo o % B/T de las fracciones fijadas precipitadas derivados de la curva de calibración generada.
- La curva de calibración también se puede construir utilizando procedimientos informáticos. Para reducir los datos mediante métodos automatizados, se pueden utilizar tanto métodos logit/log como Spline.
- Corregir los valores de plasma y orina teniendo en cuenta el % de recuperación de la extracción.

Orina: calcular la excreción de vasopresina de 24 horas:

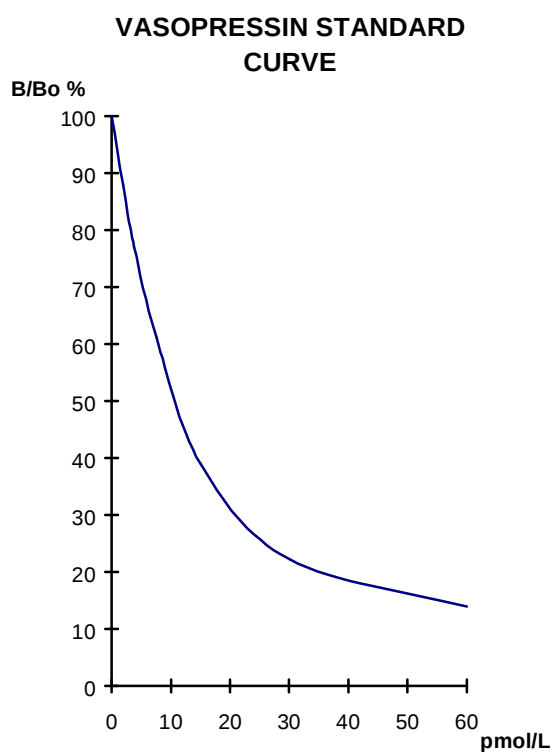
Vasopresina pmol/l x dilución x volumen de orina de 24 horas en L.

Este cálculo proporciona la concentración de vasopresina en pmol/24 horas.

D. Datos de la Curva Estándar

	Promedio de CPM	CPM Corregido	% B/Bo	Resultados (pmol/l)
Cuentas totales	11107			
NSB	555			
Calibrador 0 pmol/l	4770	4215	100	
Calibrador f 1,9 pmol/l	4340	3785	89,8	
Calibrador e 3,8 pmol/l	3739	3184	75,5	
Calibrador d 7,5 pmol/l	3135	2580	61,2	
Calibrador c 15 pmol/l	2199	1644	39,0	
Calibrador b 30 pmol/l	1490	935	22,2	
Calibrador a 60 pmol/l	1142	587	13,9	
Control bajo	3741	3186	75,6	4,0
Control alto	1769	1214	28,8	21,1

13 EJEMPLO DE CURVA DE CALIBRACIÓN



14 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

14.1 Precisión									
Intra-ensayo					Inter-ensayo				
	n	media de pmol/l	Desviación Estándar	% c.v.		n	media de pmol/l	Desviación Estándar	% c.v.
muestra A	18	4,17	0,27	6,5	muestra A	6	4,38	0,26	6,0
muestra B	16	20,2	1	4,9	muestra B	6	21,4	1,48	6,9

14.2 Calibración

Este ensayo está calibrado en base al primer calibrador internacional de la OMS 77/501

14.3 Recuperación

Dos muestras diferentes están mezcladas con diferentes cantidades del calibrador de vasopresina

Muestra	Concentración esperada (pmol/l)	Concentración obtenida (pmol/l)	% de recuperación
A1	9,2	9,8	106
A2	14,3	14,4	101
B1	9,6	10,0	104
B2	15,3	15,1	98

14.4 Especificidad

El antisuero de vasopresina se obtiene del conejo.

Al 50% de fijación (B/Bo), se obtuvieron las siguientes reacciones cruzadas.

<u>Péptido</u>	<u>% de Reacción cruzada</u>
Vasopresina Arg ⁸	100
Oxitocina	<0,1
Vasopresina Lys ⁸	<0,1
Desmopresina	<0,1
Vasotocina Arg ⁸	80

14.5 Sensibilidad

La sensibilidad, evaluada considerando 3 desviaciones estándares con respecto al calibrador cero, es de 0,5 pmol/l.

14.6 Amplitud Normal

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal de valores esperados.

Plasma: hasta 13 pmol/l

Orina: 57 ± 22 pmol/orina de 24 horas.

15 REFERENCIAS

1. Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.
2. Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.
3. Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metab. Clin. North. Am. 17(2) 281.
4. Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.
5. Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.
6. Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.
7. Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.
8. Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.
9. Von Zur Mühlen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.
10. Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.
11. Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.
12. Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.
13. Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.

Fecha de la revisión: 2009-06-08



VASOPRESSIN-RIA



KIPERB319

IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Το kit ραδιοανοσοπροσδιορισμού βαζοπρεσσίνης DIAsource περιέχει αντιδραστήρια και οδηγίες για την ποσοτική μέτρηση της βαζοπρεσσίνης στο πλάσμα ή στα ούρα. Μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) ή εκχύλιση με αιθανόλη οι συγκεντρώσεις της βαζοπρεσσίνης του πλάσματος μετρώνται με ραδιοανοσοπροσδιορισμό (RIA). Οι συγκεντρώσεις της βαζοπρεσσίνης στα ούρα μπορούν να μετρηθούν απευθείας. Για επαγγελματική χρήση σε εργαστήριο.

2 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ

Η βαζοπρεσσίνη ή Αντιδιουρητική Ορμόνη (ADH) είναι ένα κυκλικό νανοπεπτιδίο με μοριακό βάρος 1083. Η δομή του είναι πολύ όμοια με εκείνη της ωκυτοκίνης, διαφέροντας μόνο σε δύο αμινοξέα. Η ενδογενής ADH έχει αντιδιουρητικά και αγγειοδραστικά αποτελέσματα, επιτυγχάνοντας και για τα δύο 400 μονάδες ανά mg. Ο λόγος αντιδιουρητικής δράσης/βαζοπρεσσίνης είναι 1 και το φάρμακο παρουσιάζει διφασικό χρόνο ημιζωής στα 2,5 και 14,5 λεπτά. Η ADH συντίθεται στον υποεπιφυσιακό και παρακωλιακό πυρήνα του υποθαλάμου των πρωτεύοντων και μεταφέρεται μέσω αξονοπλάσματικής ροής στην οπίσθια υπόφυση όπου αποθηκεύεται και τελικά απελευθερώνεται. Η κλινική εφαρμογή ενός ραδιοανοσοπροσδιορισμού βαζοπρεσσίνης γίνεται στον άπιο διαβήτη, στην ψυχογενή δηλητηρίαση με νερό, στην υπονατριαιμία, σε καταστάσεις στρες, σε μελέτες της ADH ως νευροδιαβιβαστή και σε μελέτες υπέρτασης. Οι τιμές της ADH μπορεί να επηρεαστούν από την κατανάλωση καπνού, τσαγιού, καφέ, αλκοόλ και από ορισμένα φάρμακα.

3 ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΚΙΜΗΣ

Μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) ή εκχύλιση με αιθανόλη των δειγμάτων πλάσματος, η βαζοπρεσσίνη προσδιορίζεται με ανταγωνιστικό ραδιοανοσοπροσδιορισμό. Οι συγκεντρώσεις της βαζοπρεσσίνης στα ούρα μπορούν να μετρηθούν απευθείας. Αυτός ο προσδιορισμός χρησιμοποιεί αντι-βαζοπρεσσίνης κουνελίου και ιχνηθέτη βαζοπρεσσίνης σημασμένο με ραδιενεργό ιώδιο [¹²⁵I]. Η δεσμευμένη και η ελεύθερη φάση διαχωρίζονται από ένα δεύτερο αντίσωμα που δεσμεύεται στα σωματίδια στερεάς φάσης και ακολουθείται από ένα στάδιο φυγοκέντρησης. Μετράται η ραδιενέργεια στα δεσμευμένα κλάσματα και μπορεί να δημιουργηθεί μία τυπική καμπύλη βαθμονόμησης. Οι τιμές των εκχυλισμένων δειγμάτων διορθώνονται για ανάκτηση εκχύλισης.

4 ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Υλικά προερχόμενα από ανθρώπινο αίμα που χρησιμοποιήθηκαν στην προετοιμασία του παρόντος kit ελέγχθηκαν και διαπιστώθηκε πως είναι αρνητικά ως προς το επιφανειακό αντιγόνο της ηπατίτιδας Β (HBsAg), αντισώματα έναντι HCV και αντισώματα έναντι HIV-1 και HIV-2. Χειρίζεστε, ωστόσο, όλα τα συστατικά ως πιθανή πηγή μόλυνσης.

Το παρόν kit περιλαμβάνει ¹²⁵I (χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), εκπέμπον ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35,5 keV).

Η λήψη, απόκτηση, κατοχή και χρήση του ραδιενεργού υλικού επιτρέπεται μόνο σε ιατρούς, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία για in vitro κλινικές ή εργαστηριακές εξετάσεις, οι οποίες δεν ενέχουν εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού ή της ακτινοβολίας του σε ανθρώπους ή ζώα. Η λήψη, απόκτηση, κατοχή, χρήση και μεταφορά του υπόκειται στους κανονισμούς της εκάστοτε χώρας.

Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφαλείας από ραδιενέργεια θα πρέπει να παρέχει επαρκή προστασία.

- Μην τρώτε, πίνετε, καπνίζετε ή εφαρμόζετε καλλυντικά σε χώρους όπου χρησιμοποιούνται ραδιενεργά υλικά.
- Μη διανέμετε με πιπέτα ραδιενεργά διαλύματα χρησιμοποιώντας το στόμα σας.
- Αποφύγετε άμεση επαφή με οποιοδήποτε ραδιενεργό υλικό, χρησιμοποιώντας προϊόντα προστασίας όπως ποδιές εργαστηρίου και γάντια μίας χρήσης.
- Ο χειρισμός των ραδιενεργών υλικών θα πρέπει να λαμβάνει χώρα μόνο σε ειδικούς για το σκοπό αυτό χώρους.
- Τα ραδιενεργά υλικά θα πρέπει να φυλάσσονται στους αρχικούς περιέκτες σε ειδική γι' αυτό το σκοπό περιοχή.
- Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.
- Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών θα πρέπει να αντιμετωπίζονται αμέσως, σύμφωνα με τις καθιερωμένες διαδικασίες.
- Όλα τα ραδιενεργά υλικά θα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες του αρμόδιου για το εργαστήριο φορέα.

Τα αντιδραστήρια του παρόντος kit περιέχουν αζίδιο του νατρίου (0,05%). Τυχόν επαφή με υδραυλικές σωληνώσεις χαλκού ή μολύβδου μπορεί να οδηγήσει σε σωρευτικό σχηματισμό ιδιαίτερα εκρηκτικών αποθέσεων αζιδίου. Μετά την απόρριψη των αντιδραστηρίων στο αποχετευτικό σύστημα, εκπλύνετε πάντοτε με άφθονες ποσότητες νερού, για την αποφυγή σχηματισμού μεταλλικού αζιδίου. Υδραυλικές εγκαταστάσεις, στις οποίες υπάρχει υποψία πως έχουν σχηματιστεί αυτές οι εκρηκτικές αποθέσεις θα πρέπει να εκπλένονται σχολαστικά με διάλυμα 10% υδροξειδίου του νατρίου.

5 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Συνιστάται προσεκτική τυποποίηση των συνθηκών προετοιμασίας του ασθενούς και δειγματοληψίας.

5.1 Βαζοπρεσσίνη στο πλάσμα

- Λάβετε αίμα από νηστικό ασθενή και τοποθετήστε το σε ψυγμένο σωληνάριο που περιέχει EDTA ή Ηπαρίνη.
- Φυγοκεντρήστε στους 4° C για το διαχωρισμό του πλάσματος.
- Καταψύξτε το δείγμα σε πλαστικά σωληνάρια και σε θερμοκρασία -20° C μέχρι τον προσδιορισμό.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Η βαζοπρεσσίνη (ADH) στο πλάσμα παραμένει σταθερή στους -20° C μόνο για 4 εβδομάδες ή έως και 3 μήνες εάν προστεθούν 500 KIU Trasylol (Bayer) ανά mL αίματος - μετά την εκχύλιση.

5.2 Βαζοπρεσσίνη στα ούρα

Η βαζοπρεσσίνη μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας σε ανθρώπινα ούρα χωρίς εκχύλιση.

- Συλλέξτε δείγμα ούρων 24 ωρών.
- Σημειώστε τον όγκο των ούρων.
- Μετρήστε την οσμωμοριακότητα των ούρων.
- Εάν το δείγμα δεν προσδιοριστεί αμέσως, φυλάξτε μία δόση στους -20° C.
- Μετρήστε τα δείγματα ούρων χωρίς αραιώση και αραιωμένα σε αναλογίες των 1:2, 1:4 ή υψηλότερες.

6 ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- Πιπέτες (100 µL, 200 µL, 300 µL, 1.00 mL, 2.00 mL, 5.00 mL)
- Επαναληπτικοί διανεμητές (100 µL, 200 µL)
- Κυλινδρικός μετρητής 25 mL
- Σωληνάρια RIA από πολυστυρένιο (12 x 75 mm)
- Απόλυτη αιθανόλη (99%)
- Αναμείκτης στροβιλισμού (τύπου vortex)
- Φυγόκεντρος
- Λουτρό πάγου
- Συμπυκνωτής κενού
- Αέριο άζωτο
- Σωληνάρια πολυστυρενίου ή γυαλιού για εκχύλιση (16 x 100 mm)
- Sep-pak C18 (Waters Ass Inc. κωδ. 051910)
- Οξικό οξύ 4%
- Απόλυτη μεθανόλη (99%)
- 1N HCl
- Μετρητής γ ακτινοβολίας

7 ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Σε κάθε εκτελούμενο προσδιορισμού θα πρέπει να εκτελούνται οροί ελέγχου. Δύο οροί ελέγχου περιλαμβάνονται στο kit, η τιμή (χωρίς διαδικασία εκχύλισης) αναγράφεται στο φύλλο Ποιοτικού Ελέγχου και στην ετικέτα των φιαλιδίων. Χρησιμοποιείτε επίσης ορούς ελέγχου σύμφωνα με τις συστάσεις του κατασκευαστή του πλάσματος ελέγχου και σύμφωνα με την πρακτική των εργαστηρίων αναφοράς για την παρακολούθηση και την ακρίβεια αντιδραστηρίων και τεχνικών. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει την δική του ανάκτηση εκχύλισης κάτω από τις δικές του πειραματικές συνθήκες.

8 ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΖΩΗΣ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ

Το παρόν kit είναι σταθερό έως την αναφερόμενη ημερομηνία λήξης, εάν αποθηκευτεί με τον τρόπο που υποδεικνύεται.

Με την παραλαβή του kit, όλα τα αντιδραστήρια θα πρέπει να φυλάσσονται μεταξύ 2 και 8° C.

Τα ανασυσταθέντα αντιδραστήρια θα πρέπει να φυλάσσονται σύμφωνα με τον πίνακα της ενότητας 10.

Τα ανασυσταθέντα αντιδραστήρια είναι σταθερά σύμφωνα με τον πίνακα της ενότητας 10, όχι όμως μετά την πάροδο της ημερομηνίας λήξης.

9 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Περιεχόμενα του kit

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

 1 φιαλίδιο, λυοφιλοποιημένη αντι-βασοπρεσσίνη (κουνέλι) για 100 σωληνάρια.
Χρώμα: κίτρινο.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Ag | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

 1 φιαλίδιο, 28 KBq ή 0,75 µCi λυοφιλοποιημένο. Ειδική δραστηριότητα: 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Χρώμα: μπλε.
- | | | |
|------|---|------|
| REAG | C | DASP |
|------|---|------|

 1 φιαλίδιο, IgG αίγας αντι-κονίκλου δεσμευμένο σε στερεά φάση.
Εναιώρημα 11 mL.
- | | | | |
|------|---|-------|-----|
| REAG | D | ASSAY | BUF |
|------|---|-------|-----|

 2 φιαλίδια, 0,05 M ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με 0,25 % HSA, 0,25 % EDTA δινάτριο άλας, 0,05 % NaN₃, 500 KIU Trasylol/mL. 2 x 50 mL (υγρό)
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

 1 φιαλίδιο, 5,00 mL βαθμονομητής βαζοπρεσσίνης, 60 pmol/L. λυοφιλοποιημένο σε ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού.

6.	REAG	F	Control
----	------	---	---------

1 φιαλίδιο, 2,00 mL λυοφιλοποιημένος ορός ελέγχου βαζοπρεσσίνης, χαμηλής συγκέντρωσης.

7.	REAG	G	Control
----	------	---	---------

1 φιαλίδιο, 2,00 mL λυοφιλοποιημένος ορός ελέγχου βαζοπρεσσίνης, υψηλής συγκέντρωσης.

10 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

Στοιχείο	Ανασυστήστε κάθε φιαλίδιο με		Σταθερό στους	Ειδικές παρατηρήσεις
Αντι-βαζοπρεσσίνη (Αντιδραστήριο Α)	22 mL απεσταγμένο νερό	Αναδεύστ ε ήπια	-20° C για τουλ. 3 μήνες μετά την ανασύσταση	
¹²⁵ I-βαζοπρεσσίνη (Αντιδραστήριο Β)	25 mL απεσταγμένο νερό	Αναδεύστ ε ήπια	-20° C έως την ημερομηνία λήξης	
Στερεά φάση διπλού αντισώματος (Αντιδραστήριο C)	Έτοιμο για χρήση. Το αντιδραστήριο διαχωρισμού θα πρέπει να τοποθετηθεί σε μαγνητικό αναδευτήρα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου		2-8° C έως την ημερομηνία λήξης	Το αντιδραστήριο μπορεί να διανεμηθεί με χρήση επαναληπτικού διανεμητή
Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού (Αντιδραστήριο D)	Έτοιμο για χρήση.		2-8° C έως την ημερομηνία λήξης	
Βαθμονομητής βαζοπρεσσίνης 60 pmol/L (Αντιδραστήριο E)	5,00 mL απεσταγμένο νερό	Αναδεύστ ατε ήπια	-20° C για τουλ. 3 μήνες μετά την ανασύσταση	Ανατρέξτε στον πίνακα για την προετοιμασία της καμπύλης βαθμονόμησης
Βαζοπρεσσίνη ορός ελέγχου χαμηλής συγκέντρωσης (Αντιδραστήριο F)	2,00 mL απεσταγμένο νερό	Αναδεύστ ατε ήπια	-20° C για τουλ. 3 μήνες μετά την ανασύσταση	Η τιμή του ορού ελέγχου αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου και στο φύλλο ποιοτικού ελέγχου (χωρίς εκχύλιση)
Βασοπρεσσίνη ορός ελέγχου υψηλής συγκέντρωσης (Αντιδραστήριο G)	2,00 mL απεσταγμένο νερό	Αναδεύστ ατε ήπια	-20° C για τουλ. 3 μήνες μετά την ανασύσταση	Η τιμή του ορού ελέγχου αναγράφεται στην ετικέτα του φιαλιδίου και στο φύλλο ποιοτικού ελέγχου (χωρίς εκχύλιση)

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΤΕ ΟΛΑ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ 15 ΛΕΠΤΑ ΠΡΙΝ ΑΠΟ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ!

11 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Προτού προχωρήσετε στη διαδικασία RIA μπορείτε να χρησιμοποιήσετε δύο διαφορετικές μεθόδους προετοιμασίας δείγματος:

A1 : Εκχύλιση Sep-pak C18

A2 : Εκχύλιση με αιθανόλη

A1: Διαδικασία εκχύλισης Sep-pak C18

Στήλη: Κασέτα Sep-pak C18 (Waters Ass. Inc. κωδ. 051910)

Διαδικασία: ΜΗΝ ΕΚΧΥΛΙΖΕΤΕ ΤΟΥΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΟΡΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥ.

1. Εκπλύνετε τη στήλη με 10 mL απεσταγμένου νερού, 5 mL μεθανόλης και 10 mL απεσταγμένου νερού, αντίστοιχα.
2. Ακολουθεί οξίνιση 1,0 mL δείγματος πλάσματος με 150 μL 1N HCl.
3. Εισάγετε το οξινοποιημένο δείγμα εντός της στήλης.
4. Εκπλύνετε τη στήλη με 20 mL οξικό οξύ 4%.
5. Ακολουθεί έκλουση με 4 mL μεθανόλης.
6. Ξηράνετε τη μεθανόλη υπό ροή αζώτου ή αέρα.
7. Ανασυστήστε το κατάλοιπο με 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού.
8. Προχωρήστε αμέσως στη διαδικασία RIA ή φυλάξτε τα εκχυλισμένα δείγματα στους – 20°C.

Για τον υπολογισμό της ανάκτησης, προσθέστε μία δόση (200 μL) ιχνηθέτη ¹²⁵I-βαζοπρεσσίνης σε ένα τυχαίο δείγμα πλάσματος και υποβάλλετε το δείγμα ανάκτησης στην ίδια διαδικασία εκχύλισης.

Υπολογισμός ανάκτησης

1. Προετοιμάστε ένα σωληνάριο εκτίμησης ανάκτησης (R).
 - Διανείμετε με πιπέτα 1,0 mL ενός τυχαίου δείγματος πλάσματος στο σωληνάριο ανάκτησης (R). Το δείγμα που χρησιμοποιείται για αυτόν τον προσδιορισμό ανάκτησης θα πρέπει να έχει ένα πρωτεϊνικό στρώμα, παρόμοιο με αυτό των εξεταζόμενων δειγμάτων.
 - Προσθέστε 200 μL ιχνηθέτη ^{125}I -βαζοπρεσσίνης στο σωληνάριο R και αναμίξτε.
 - Εκχυλίστε αυτό το δείγμα μαζί με τα δείγματα της ανωτέρω διαδικασίας.
2. Προετοιμάστε 2 σωληνάρια Ολικής Ανάκτησης (TR).
 - Διανείμετε με πιπέτα 200 μL ιχνηθέτη ^{125}I -βαζοπρεσσίνης στα δύο σωληνάρια TR.
 - Προσθέστε 100 μL ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού και αναμίξτε.
 - Κλείστε και αφήστε κατά μέρος αυτά τα σωληνάρια ώστε να μετρηθούν για υπολογισμό ανάκτησης.
3. Ανασυστήστε το αποξηραμένο δείγμα ανάκτησης (R) προσθέτοντας 1,0 mL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού και αναμίξτε με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex σχολαστικά.
4. Διανείμετε με πιπέτα 300 μL από το σωληνάριο ανασυσταμένου δείγματος ανάκτησης (R) σε δύο σωληνάρια του προσδιορισμού.
5. Μετρήστε τα σωληνάρια ολικής ανάκτησης (TR) και ανάκτησης (R) για τουλάχιστον δύο λεπτά σε μετρητή ακτινοβολίας γ.
Υπολογίστε το ποσοστό % ανάκτησης διαιρώντας το μέσο αριθμό κρούσεων (cpm) στα σωληνάρια ανάκτησης (R) με το cpm στα σωληνάρια ολικής ανάκτησης (TR) και πολλαπλασιάστε επί 3,33:

$$\% \text{ Ανάκτηση} : \frac{\text{cpm σωληνάριο ανάκτησης (R)}}{\text{cpm σωληνάριο ολικής ανάκτησης}} \times 3,33 \times 100\%$$

Τα ποσοστά των ανακτήσεων εκχύλισης θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 60 και 80%.

A2: Διαδικασία εκχύλισης με αιθανόλη

ΜΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΕΤΕ ΤΟΥΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΟΡΟΥΣ ΕΛΕΓΧΟΥ.

1. Επισημάνετε ένα σωληνάριο εκχύλισης (E) για κάθε δείγμα ασθενούς. Επισημάνετε ένα πρόσθετο σωληνάριο (R) για την εκτίμηση της ανάκτησης εκχύλισης.
2. Τοποθετήστε τα σωληνάρια ανάκτησης και την αιθανόλη σε πάγο.
3. Διανείμετε με πιπέτα 0,8 mL κάθε δείγματος στα κατάλληλα σημειωμένα σωληνάρια εκχύλισης (E).
4. Προετοιμάστε ένα σωληνάριο εκτίμησης ανάκτησης (R).
 - Διανείμετε με πιπέτα 0,8 mL ενός τυχαίου δείγματος πλάσματος στο σωληνάριο ανάκτησης (R). Το δείγμα που χρησιμοποιείται για αυτόν τον προσδιορισμό ανάκτησης θα πρέπει να έχει ένα πρωτεϊνικό στρώμα, παρόμοιο με αυτό των εξεταζόμενων δειγμάτων.
 - Προσθέστε 200 μL ιχνηθέτη ^{125}I -βαζοπρεσσίνης στο σωληνάριο R και αναμίξτε.
 - Εκχυλίστε αυτό το δείγμα μαζί με τα δείγματα του βήματος 6.
5. Προετοιμάστε 2 σωληνάρια Ολικής Ανάκτησης (TR).
 - Διανείμετε με πιπέτα 200 μL ιχνηθέτη ^{125}I -βαζοπρεσσίνης στα δύο σωληνάρια TR.
 - Προσθέστε 100 μL ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού και αναμίξτε.
 - Κλείστε και αφήστε κατά μέρος αυτά τα σωληνάρια ώστε να μετρηθούν για υπολογισμό ανάκτησης.
6. Προσθέστε 4 mL ψυχμής αιθανόλης σε κάθε δείγμα (σωληνάρια E) και στο Σωληνάριο Ανάκτησης (R).
7. Αναμίξτε και στροβιλίστε σε αναμείκτη στροβιλισμού για 2 λεπτά.
8. Φυγοκεντρήστε όλα τα σωληνάρια εκχύλισης (E και R) στα 2000 g, για 15 min. στους 2-8° C.
9. Μεταγγίστε τα υπερκείμενα από κάθε σωληνάριο εκχύλισης σε προηγουμένως ετοιμασμένα, καθαρά και καταλλήλως σημειωμένα σωληνάρια 16 x 100 mm.
10. Εξατμίστε τα υπερκείμενα υπό ρέον άζωτο έως ότου αποξηρανθούν (στους 37° C μεγ.) ή εξατμίστε με χρήση συμπυκνωτή κενού.
11. Ανασυστήστε τα αποξηραμένα δείγματα ανάκτησης προσθέτοντας 0,8 mL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού και αναμίξτε σχολαστικά με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex.
12. Προχωρήστε αμέσως στη διαδικασία RIA ή φυλάξτε τα εκχυλισμένα δείγματα στους -20° C έως και δύο εβδομάδες πριν τα χρησιμοποιήσετε στον προσδιορισμό.
13. Ανασυστήστε το αποξηραμένο δείγμα ανάκτησης (R) προσθέτοντας 0,8 mL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού και αναμίξτε σχολαστικά με αναμείκτη στροβιλισμού τύπου vortex.
14. Διανείμετε με πιπέτα 300 μL του σωληναρίου ανασυσταμένου δείγματος ανάκτησης (R) σε δύο σωληνάρια του προσδιορισμού.
15. Μετρήστε τα σωληνάρια ολικής ανάκτησης (TR) και ανάκτησης (R) για τουλάχιστον δύο λεπτά σε μετρητή γ ακτινοβολίας.

Υπολογισμός ανάκτησης

Υπολογίστε το ποσοστό % ανάκτησης διαιρώντας το μέσο αριθμό κρούσεων (cpm) στα σωληνάρια ανάκτησης (R) με το cpm στα σωληνάρια ολικής ανάκτησης (TR) και πολλαπλασιάστε επί 2,67:

$$\% \text{ Ανάκτηση} : \frac{\text{cpm σωληνάριο ανάκτησης (R)}}{\text{cpm σωληνάριο ολικής ανάκτησης (TR)}} \times 2,67 \times 100\%$$

Τα ποσοστά των ανακτήσεων εκχύλισης θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 40 και 50%.

12 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Όλες οι δοκιμασίες (βαθμονομητές, οροί ελέγχου και δείγματα) θα πρέπει να εκτελούνται εις διπλούν.

A. Προετοιμασία διαλυμάτων βαθμονομητών

Αραίωση	Αντιδραστήριο (=βαθμονομητής a)	Συγκέντρωση βαζοπρεσσίνης 60 pmol/L
1000 μL του αντιδραστήριου E + 1000 μL Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού Αναμείξτε σε vortex	Βαθμονομητής b	30 pmol/L
1000 μL του βαθμονομητή b + 1000 μL Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού Αναμείξτε σε vortex	Βαθμονομητής c	15 pmol/L
1000 μL του βαθμονομητή c + 1000 μL Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού Αναμείξτε σε vortex	Βαθμονομητής d	7,5 pmol/L
1000 μL του βαθμονομητή d + 1000 μL Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού Αναμείξτε σε vortex	Βαθμονομητής e	3,8 pmol/L
1000 μL του βαθμονομητή e + 1000 μL Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού Αναμείξτε σε vortex	Βαθμονομητής f	1,9 pmol/L
	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού	0 pmol/L

B. Διαδικασία προσδιορισμού

- Μετά την προετοιμασία των διαλυμάτων βαθμονομητών, διανείμετε με πιπέτα 300 μL κάθε βαθμονομητή, ορών ελέγχου, κάθε εκχυλίσματος από πλάσμα ή αραιωμένων ούρων στα αντιστοίχως σημειωμένα σωληνάρια.
- Προσθέστε 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού (Αντιδραστήριο D) στα σωληνάρια μέγιστης δέσμευσης (δέσμευση 0 pmol/L) και 500 μL ρυθμιστικού διαλύματος προσδιορισμού στα «τυφλά» σωληνάρια (NSB).
- Προσθέστε 200 μL αντιορού βαζοπρεσσίνης (Αντιδραστήριο A) σε όλα τα σωληνάρια, εκτός από τα τυφλά σωληνάρια (NSB) και τα σωληνάρια ολικών μετρήσεων (TC).
- Αναμείξτε όλα τα σωληνάρια σε αναμεικτική στροβιλισμού τύπου vortex και επωάστε στους 4° C για 18-24 ώρες.
- Προσθέστε 200 μL ¹²⁵I-βαζοπρεσσίνης (Αντιδραστήριο B) σε όλα τα σωληνάρια.
- Αναμείξτε όλα τα σωληνάρια σε αναμεικτική στροβιλισμού τύπου vortex και επωάστε στους 4° C για 18-24 ώρες.
- Ενώ αναδεύετε διαρκώς, προσθέστε 100 μL στερεάς φάσης διπλού αντισώματος (Αντιδραστήριο C) σε όλα τα σωληνάρια, εκτός από τα σωληνάρια TC.
- Αναμείξτε σε αναμεικτική στροβιλισμού τύπου vortex και επωάστε για 30-60 λεπτά στους 4° C.
- Φυγοκεντρήστε όλα τα σωληνάρια για 15 min., στα 1700 g και στους 4° C.
- Μεταγγίστε ή αναρροφήστε τα υπερκείμενα.
- Μετρήστε το κατάλοιπο για 2-4 λεπτά.

	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού (D)	Δείγμα βαθμονομ ησης ή ορός ελέγχου	Αντι- βαζοπρεσσίνη (A)		¹²⁵ I-βαζοπρεσσίνη (B)		Στερεά φάση διπλού αντισώματος (C)		
Ολικές Μετρήσεις (TC)	-	-	-	Αναμείξτε σε vortex	200 μL	Αναμείξτε σε vortex	-	Αναμείξτε σε vortex	Φυγοκεντρήστ ε επί
Τυφλά (NSB)	500 μL	-	-	και	200 μL	και	100 μL	και	15 λεπτά σε
Βαθ/τής 0 pmol/L	300 μL	-	200 μL	επωάστε	200 μL	επωάστε	100 μL	επωάστε	1700 x g και
Βαθ/τής 1,9 pmol/L	-	300 μL	200 μL	για 18-24	200 μL	για 18-24	100 μL	για 30-60	στους
Βαθ/τής 3,8 pmol/L	-	300 μL	200 μL	ώρες	200 μL	ώρες	100 μL	λεπτά	4° C.
Βαθ/τής 7,5 pmol/L	-	300 μL	200 μL	στους	200 μL	στους +4°C	100 μL	στους	Αναρροφήστε
Βαθ/τής 15 pmol/L	-	300 μL	200 μL	+4°C.	200 μL		100 μL	4° C	ή μεταγγίστε
Βαθ/τής 30 pmol/L	-	300 μL	200 μL		200 μL		100 μL		τα
Βαθ/τής 60 pmol/L	-	300 μL	200 μL		200 μL		100 μL		υπερκείμενα.
Οροί ελέγχου	-	300 μL	200 μL		200 μL		100 μL		Μετρήστε τα
Άγνωστο δείγμα	-	300 μL	200 μL		200 μL		100 μL		υπολείμματα για 2-4 λεπτά.

C. Υπολογισμοί

- Αφαιρέστε το μέσο αριθμό κρούσεων (cpm) των NSB από το μέσο αριθμό κρούσεων (cpm) των αντιγράφων των βαθμονομητών, ορών ελέγχου και δειγμάτων ασθενών.
- Η καμπύλη βαθμονόμησης μπορεί να δημιουργηθεί με αποτύπωση των cpm, % B/Bo ή % B/T του ιζήματος δεσμευμένου κλάσματος έναντι της συγκέντρωσης των βαθμονομητών βαζοπρεσσίνης.
- Για τη λήψη της συγκέντρωσης βαζοπρεσσίνης στα εκχυλισμένα δείγματα ασθενούς και ορών ελέγχου, τα cpm, % B/Bo ή % B/T των ιζημάτων δεσμευμένων κλασμάτων παρεμβάλλονται από τη καμπύλη βαθμονόμησης που δημιουργήθηκε.
- Η καμπύλη βαθμονόμησης μπορεί επίσης να σχηματιστεί με τη βοήθεια υπολογιστή. Για αυτοματοποιημένη αναγωγή δεδομένων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο οι μέθοδοι logit/log όσο και η μέθοδος Πολυώνυμου.
- Διορθώστε τις τιμές πλάσματος και ούρων ως προς το % ποσοστό της ανάκτησης εκχύλισης.

Ούρα: Υπολογίστε την απέκκριση βαζοπρεσσίνης 24 ωρών:

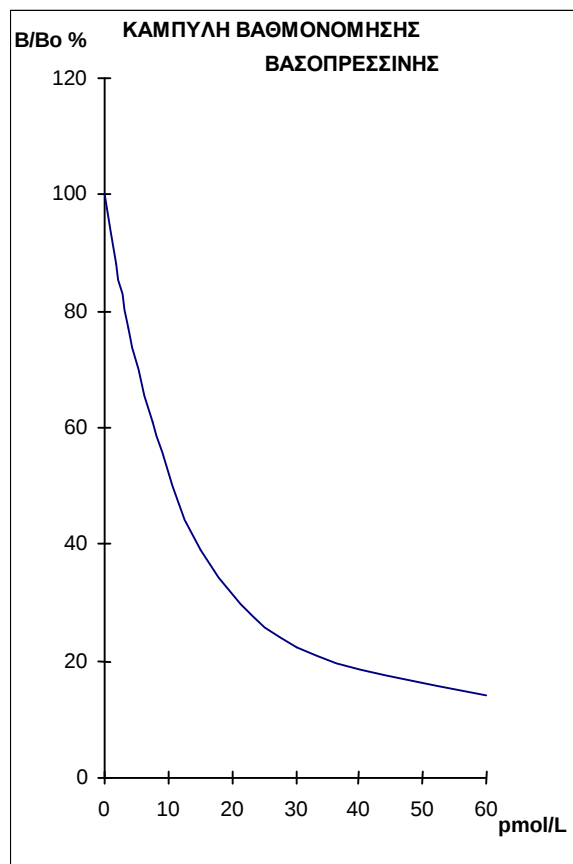
Βαζοπρεσσίνη pmol/L x αραιώση x όγκος ούρων 24 ωρών σε L.

Με αυτήν την εξίσωση υπολογίζεται η συγκέντρωση βαζοπρεσσίνης σε pmol/24 ώρες.

D. Δεδομένα Καμπύλης βαθμονόμησης

	Μέσο cpm	Διορθωμένο cpm	% B/Bo	Αποτελέσμα α (pmol/L)
Ολικές μετρήσεις	11107			
NSB	555			
Βαθμονομητής 0 pmol/L	4770	4215	100	
Βαθμονομητής f 1,9 pmol/L	4340	3785	89,8	
Βαθμονομητής e 3,8 pmol/L	3739	3184	75,5	
Βαθμονομητής d 7,5 pmol/L	3135	2580	61,2	
Βαθμονομητής c 15 pmol/L	2199	1644	39,0	
Βαθμονομητής b 30 pmol/L	1490	935	22,2	
Βαθμονομητής a 60 pmol/L	1142	587	13,9	
Ορός ελέγχου χαμηλής συγκ.	3741	3186	75,6	4,0
Ορός ελέγχου υψηλής συγκ.	1769	1214	28,8	21,1

13 ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ



14 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

14.1 Ακρίβεια									
Εντός εκτέλεσης					Μεταξύ εκτελέσεων				
	n	μέσο pmol/L	SD	% c.v.		n	μέσο pmol/L	SD	% c.v.
Δείγμα A	18	4,17	0,27	6,5	Δείγμα A	6	4,38	0,26	6,0
Δείγμα B	16	20,2	1,00	4,9	Δείγμα B	6	21,4	1,48	6,9

14.2 Βαθμονόμηση
Ο παρόν προσδιορισμός έχει βαθμονομηθεί έναντι του πρώτου διεθνούς βαθμονομητή του Π.Ο.Υ. 77/501

14.3 Ανάκτηση			
Δύο διαφορετικά δείγματα εμβολιάστηκαν με διαφορετικές ποσότητες βαθμονομητή βαζοπρεσσίνης			
Δείγμα	Αναμεν. συγκ. (pmol/L)	Παρατηρ. συγκ. (pmol/L)	Ανάκτηση %
A1	9,2	9,8	106
A2	14,3	14,4	101
B1	9,6	10,0	104
B2	15,3	15,1	98

14.4 Ειδικότητα

Ο αντιορός βαζοπρεσσίνης αναπτύσσεται σε κουνέλια.

Σε δέσμευση 50% (B/B₀) μετρήθηκαν οι ακόλουθες διασταυρούμενες δράσεις

Πεπτίδιο

Διασταυρούμενη δράση %

Arg ⁸ βαζοπρεσσίνη	100 %
Ωκυτοκίνη	<0,1 %
Lys ⁸ -βαζοπρεσσίνη	<0,1 %
Δεσμοπρεσσίνη	<0,1 %
Arg ⁸ βαζοτοκίνη	80 %

14.5 Ευαισθησία

Η ευαισθησία, καθορισμένη ως μεταβολή 3 τυπικών αποκλίσεων από το μηδενικό βαθμονομητή είναι 0,5 pmol/L

14.6 Φυσιολογικό Εύρος

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του φυσιολογικό εύρος αναμενόμενων τιμών.

Πλάσμα: έως και 13 pmol/L

Ούρα: 57 ± 22 pmol/ούρα 24 ωρών

15 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.

Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.

Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metb. Clin. North. Am. 17(2) 281.

Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.

Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.

Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.

Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressine in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.

Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.

Von Zur Mühlen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.

Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.

Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.

Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.

Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.

Ημερομηνία αναθεώρησης: 2009-06-08



VASOPRESSIN-RIA

SV**KIPERB319****IN VITRO DIAGNOSTISK ANVÄNDNING**

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 ANVÄNDNINGSSOMRÅDE

DIAsource Vasopressin-ria kit innehåller reagens och anvisningar för kvantitativ bestämning av vasopressin i plasma eller urin. Efter fast fas-extraktion (FFE) eller etanol-extraktion bestäms halterna av vasopressin i plasma genom radioimmunoanalys (RIA). Vasopressinkoncentrationen i urin kan bestämmas direkt.

Reagenssatsen är avsedd för yrkesmässigt bruk vid ett analyslaboratorium.

2 KLINISK TILLÄMPNING

Vasopressin eller antidiuretiskt hormon (ADH) är en cyklisk nanopeptid med en molekylvikt av 1083. Strukturen är mycket lik den för oxytocin och skiljer sig endast i 2 aminosyror. Kroppseget ADH har anti-diuretisk och blodtryckshöjande egenskaper. Vid en hormon-koncentration av cirka 400 enheter per mg är förhållandet mellan den antidiuretiska och blodtryckshöjande aktiviteten 1:1. Hormonet bryts ned på ett sådant sätt att 50% av anti-diuretiska aktiviteten kvarstår efter 2.5 minuter medan motsvarande tid för den blodtrycks-höjande aktiviteten är 14.5 minuter. ADH bildas i hypothalamus i kärnorna N. Supraopticus och N. Paraventricularis och når hypofysens baklob via axonal transport. Den kliniska tillämpningen av en vasopressin radioimmunoanalys är vid diabetes insipidus, psykogent överintag av vätska, hyponatraemia, stressförhållanden, ADH som neurotransmitter och studier angående förhöjt blodtryck. ADH-värdena kan influeras av cigaretter, te, kaffe, alkohol och vissa droger.

3 PRINCIP

Efter extraktion av plasmaprovet genom FFE eller etanol-extraktion bestäms halten av vasopressin genom kompetitiv radioimmunoanalys. Vasopressinkoncentrationen i urin kan bestämmas direkt. Analysen utnyttjar antiserum mot vasopressin från kanin och vasopressin som är märkt med radioaktivt jod [¹²⁵I]. Den bundna och den fria fasen separeras med hjälp av en andra antikropp som är bunden vid en partikulär fast fas. Radioaktiviteten i den bundna fraktionen mäts, och en typisk kalibreringskurva kan avläsas. Värdena för extraherade prov korrigeras för extraktionsutbytet.

4 VARNING

Endast för in vitro diagnostik. Detta kit innehåller ¹²⁵I (halveringstid: 60 dagar), avger röntgen (X: 28 keV) och gamma (γ: 35.5 keV) strålar.

Eftersom föreskrifter varierar från land till land, är det av vikt att den person som är ansvarig för laboratoriet känner till gällande föreskrifter avseende radioaktivt material av den typ och mängd som används i denna analys.

Kitet innehåller komponenter med humant ursprung. Dessa har testats för hepatit B antigen samt antikroppar mot HCV, HIV-1 och HIV-2 och befunnits negativa. Komponenterna ska trots detta hanteras som möjlig smittrisk.

Vidta åtgärder enligt lokala och/eller landets föreskrifter avseende handhavande av radioaktivt material. Endast bemyndigad personal ska ha tillgång till reagenserna.

Följande säkerhetsåtgärder ska iaktas vid handhavande av radioaktivt material:

- Radioaktivt material ska förvaras i härför avsedda utrymmen, normalt ej tillgängliga för ej bemyndigad personal.
- Hantering av radioaktivt material ska ske i för ändamålet avsedda utrymmen.
- Försiktighet ska iaktas för att förhindra intag och kontakt med huden och kläderna. Pipettera inte radioaktivt material med munnen.
- Att äta, dricka eller röka ska vara förbjudet i utrymmen där radioaktivt material hanteras.
- Handskar ska användas och händerna ska tvättas efter hantering av radioaktivt material.
- Hantering ska ske på yta täckt med absorberande material.
- Utspillt radioaktivt material ska torkas upp omedelbart och allt kontaminerat material ska kasseras som radioaktivt avfall. Kontaminerade ytor ska torkas av med rengöringsmedel.

Reagensen i kitet innehåller natriumazid. Kontakt med avloppsrör av koppar eller bly kan resultera i ackumulerad bildning av mycket explosiva azidavlagringar.

Vid utspolning av reagens i avloppet ska rikliga mängder vatten spolas med för att undvika uppkomst av metallisk azid. Rör som misstänks vara kontaminerade av explosiva avlagringar ska spolas/sköljas noggrant med 10% natriumhydroxidlösning.

5 PROVTAGNING

Noggrann kalibrering rekommenderas för förberedelser av patient och provtagning.

5.1 Vasopressin i plasma

- Tag blod från en fastande patient i ett kylt rör med EDTA eller heparin.
- Centrifugera provet omedelbart vid 4° C för att separera plasma.
- Frys plasman i plaströr vid -20° C fram till analystillfället.

OBS! Vasopressin (ADH) i plasma är stabilt vid -20° C i upp till 4 veckor, eller i upp till 3 månader efter tillsats av 500 KIU Trasolyt® (Bayer) per mL blod; efter extraktion.

5.2 Vasopressin i urin

Vasopressin kan bestämmas direkt, i icke extraherad humanurin.

- Tag ett dygnsurinprov.
- Registrera urinvolymen.
- Mät urinens osmolaritet.
- Om provet inte analyseras direkt tas ett delprov ut, som förvaras vid -20° C.
- Analysera urinprovet outspädd och efter spädning 1:2, 1:4 eller mer.

6 MATERIAL OCH UTRUSTNING SOM BEHÖVS

- Pipetter (100 µL, 200 µL, 300 µL, 1.00 mL, 2.00 mL, 5.00 mL)
- Repeterande pipetter (100 µL, 200 µL)
- Mätglas 25 mL
- RIA-rör av polystyren (12x75 mm)
- Etanol absolut (99%)
- Vortexombländare
- Centrifug
- Isbad
- Vakuumindestare
- Kvävgas
- Provrör av polystyren eller glas för extraktion (16x100 mm)
- Sep-pak C18 (Waters Ass Inc. art. 051910)
- Ättiksyra 4%
- Metanol absolut (99%)
- 1 M HCl
- Gammaräknare

7 KVALITETSKONTROLL

Vid varje analysomgång bör kontrollprov analyseras. Två kontrollprov ingår i satsen, och analysvärdet (utan extraktionsprocedur) anges på QC-bladet och på ampullerna. Använd kontrollprov enligt tillverkarens rekommendationer och enligt god laboratoriesed för att kontrollera noggrannhet och precision hos reagens och metoder. Varje laboratorium bör fastlägga egna värden på utbytet vid extraktion under de egna betingelserna.

8 HÅLLBARHET OCH FÖRVARING

Kitet är stabilt fram till utgångsdatum vid förvaring enligt anvisningarna.

När kitet tagits emot ska alla reagens lagras vid 2-8 °C.

När reagens rekonstituerats ska de lagras enligt anvisningarna i tabellen under punkt 10.

De rekonstituerade reagensen har den stabilitet som anges under punkt 10, dock aldrig längre än till angivet utgångsdatum.

9 KITETS INNEHÅLL

- | | | |
|------|---|----|
| REAG | A | Ab |
|------|---|----|

1 vial, frystorkat anti-vasopressin (från kanin) till 100 rör.
Färg : gult.
- | | | | |
|------|---|----|------------------|
| REAG | B | Aq | ¹²⁵ I |
|------|---|----|------------------|

1 vial, 28 KBq eller 0.75 µCi. Frystorkat. Specifik aktivitet : 62-77 MBq/nmol
(1700-2100 µCi/nmol).
Färg: blått.
- | | | |
|------|---|------|
| REAG | C | DASP |
|------|---|------|

1 vial, anti-kanin- IgG från get, bundet vid fast fas.
11 mL suspension.
- | | | | |
|------|---|----|-----|
| REAG | D | AS | BUF |
|------|---|----|-----|

2 vials, 0.05 M fosfatbuffert med 0.25 % HAS, 0.25 % EDTA dinatriumsalt, 0.05 % NaN₃,
500 KIU Trasylol/mL. 2 x 50 mL (vätska).
- | | | |
|------|---|-----|
| REAG | E | CAL |
|------|---|-----|

1 vial, 5.00 mL vasopressin kalibrator, 60 pmol/L, frystorkat i analysbuffert.

6.

REAG	F	Control
------	---	---------

 1 vial, 2.00 mL frystorkad vasopressin-kontroll, låg nivå
7.

REAG	G	Control
------	---	---------

 1 vial, 2.00 mL frystorkad vasopressin-kontroll, hög nivå

10 BEREDNING AV REAGENS

Komponent	Rekonstituera ampullen med		Stabil vid	Särskild anmärkning
Anti-vasopressin (reagens A)	22 mL destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20 °C under minst 3 månader efter rekonstituering	
¹²⁵ I-märkt vasopressin (reagens B)	25 mL destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20 °C fram till utgångsdatum	
Dubbel antikropp i fast fas (reagens C)	Klart för användning. Separations-reagenset bör omröras i 10 minuter med magnetom-rörare vid rumstemperatur		2-8 °C fram till utgångsdatum	Det är möjligt att pipettera reagenset med en repeterande pipett.
Analysbuffert (reagens D)	Klart för användning.		2-8 °C fram till utgångsdatum	
Vasopressin-kalibrator 60 pmol/L (reagens E)	5.00 mL destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20 °C under minst 3 månader efter rekonstituering	Se tabellen gällande kalibreringskurva
Vasopressin, låg kontroll (reagens F)	2.00 mL destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20 °C under minst 3 månader efter rekonstituering	Kontrollens koncentration anges på ampullen och på QC-bladet (utan extraktion)
Vasopressin, hög kontroll (reagens G)	2.00 mL destillerat vatten	Blanda försiktigt	-20 °C under minst 3 månader efter rekonstituering	Kontrollens koncentration anges på ampullen och på QC-bladet (utan extraktion)

BERED ALLA REAGENS 15 MINUTER FÖRE ANVÄNDNING!

11 PROVBEREDNING

Före RIA-analys kan provberedning ske på två olika sätt:

- A1 : Sep-pak C18-extraktion
A2 : Etanolextraktion

A1: Sep-pak C18-extraktion

Kolonn: Sep-pak C18-patron (Waters Ass Inc. art. 051910)

Genomförande: KALIBRATOR OCH KONTROLLER SKA INTE EXTRAHERAS.

1. Tvätta kolonnen med 10 mL destillerat vatten, 5 mL metanol samt 10 mL destillerat vatten.
2. Surgör 1.0 mL plasmaproov med 150 µL 1 M HCl.
3. Tillsätt detta surgjorda prov till kolonnen.
4. Tvätta kolonnen med 20 mL 4-procentig ättiksyra.
5. Eluera med 4 mL metanol.
6. Torka metanolen under strömmande kvävgas eller luft.
7. Rekonstituera återstoden med 1.0 mL analysbuffert.
8. Genomför RIA proceduren omedelbart, eller förvara de extraherade proverna vid -20°C under upp till två veckor före analys.

För bestämning av utbytet tillsätts en liten mängd (200 µL) ¹²⁵I-märkt vasopressin till ett slumpmässigt valt plasmaproov och detta utbytesprov utsätts för samma extraktionsprocedur.

Beräkning av utbyte

- a/ Gör i ordning ett rör (R-rör) för bestämning av extraktionsutbytet.
- Pipettera 1.0 mL av ett slumpmässigt valt plasmaproov i R-röret. Det prov som används för utbytesbestämningen bör ha samma proteinmatris som de prov som analyseras.
 - Tillsätt 200 µL ¹²⁵I-vasopressin till R-röret och blanda.
 - Extrahera detta prov samtidigt med de övriga proven enligt ovan.
- b/ Gör i ordning två rör för mätning av total radioaktivitet (TR-rör):
- Pipettera 200 µL ¹²⁵I-vasopressin i två TR-rör.
 - Tillsätt 100 µL analysbuffert och blanda.
 - Sätt lock på dessa rör och sätt dem åt sidan för senare mätning och beräkning.

c/ Rekonstituera det torkade utbytesprovet (R-röret) genom att tillsätta 1.0 mL analysbuffert och vortexblanda noggrant.

d/ Pipettera 300 µL av det rekonstituerade utbytesprovet i två provrör.

e/ Räkna sönderfallen i TR-rören och R-rören under minst två minuter i gammaraäknaren.

Beräkna procent utbyte genom att dividera CPM-värdet för R-rören med CPM-värdet för TR-rören och multiplicera med 3,33:

$$\% \text{ utbyte} = (\text{CPM i R-rör} / \text{CPM i TR-rör}) \times 3.33 \times 100$$

Utbytet av extraktionen bör ligga i intervallet 60-80%.

A2: Etanolextraktion

KALIBRATOR OCH KONTROLLER SKA INTE EXTRAHERAS.

1. Märl ett extraktionsrör (E-rör) för varje patientprov. Märk ett extra R-rör för att bestämma extraktionsutbytet.
2. Placera extraktionsrören samt etanol på is.
3. Pipettera 0.8 mL av varje prov i de märkta E-rören.
4. Gör iordning ett R-rör för bestämning av extraktionsutbytet.
Pipettera 0.8 mL av ett slumpmässigt valt plasmaprov i R-röret. Det prov som används för utbytesbestämningen bör ha samma proteinmatris som de prov som analyseras.
Tillsätt 200 µL ¹²⁵I-vasopressin till R-röret och blanda.
Extrahera detta prov samtidigt med proven enligt steget 6.
5. Gör i ordning två rör för bestämning av total radioaktivitet (TR-rör):
Pipettera 200 µL ¹²⁵I-vasopressin i två TR-rör.
Tillsätt 100 µL analysbuffert och blanda.
Sätt lock på dessa rör och sätt dem åt sidan för senare mätning av totalradioaktiviteten.
6. Tillsätt 4 mL kyld etanol till varje rör med prov (E-rören) och R-rör.
7. Vortexblanda under 2 minuter.
8. Centrifugera alla E- och R-rör vid 2000 x g under 15 minuter vid 2-8° C.
9. Dekanterar supernatanten från dessa rör, till rengjorda och märkta provrör 16x100 mm.
10. Indunsta supernatanten under strömmande kvävgas till torrhet (vid högst 37° C), eller i en vakuumindunstare.
11. Rekonstituera de torkade proven genom att tillsätta 0.8 mL analysbuffert och blanda noggrant med vortexblandare.
12. Genomför RIA-proceduren omedelbart, eller förvara de extraherade proven vid -20° C under upp till två veckor före analys.
13. Rekonstituera det torkade utbytesprovet (R-röret) genom att tillsätta 0.8 mL analysbuffert och blanda noggrant med vortexblandaren.
14. Pipettera 300 µL av det rekonstituerade utbytesprovet i två provrör.
15. Räkna sönderfallen i TR-rören och R-rören under minst två minuter i gammaraäknaren.

Beräkning av utbyte

Beräkna procent utbyte genom att dividera CPM-värdet för R-rören med CPM-värdet för TR-rören och multiplicera med 2.67:

$$\% \text{ utbyte} = (\text{CPM i R-rör} / \text{CPM i TR-rör}) \times 2.67 \times 100$$

Utbytet av extraktionen bör ligga i intervallet 40-50%.

12 ANALYSPROTOKOLL

Samtliga tester (kalibrator, kontroller, prover) utförs i duplikat.

A. Beredning av kalibrator

Spädning	Reagens E (=kalibrator A)	Koncentration vasopressin 60 pmol/L
1000 µL av reagens E + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator B	30 pmol/L
1000 µL av kalibrator B + 1000 µL analysbuffert Vortexblandning	kalibrator C	15 pmol/L
1000 µL av kalibrator C + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator D	7.5 pmol/L
1000 µL av kalibrator D + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator E	3.8 pmol/L
1000 µL av kalibrator E + 1000 µL analysbuffert vortexblandning	kalibrator F	1.9 pmol/L
	analysbuffert	0 pmol/L

B. Analysprocedur

1. Efter preparation av kalibrator pipetteras 300 µL av varje kalibrator och kontroll samt plasmaextrakt eller utspädd urin i märkta rör.
2. Tillsätt 300 µL analysbuffert (reagens D) till rören för maximal bindning (0 pmol/L) och 500 µL analysbuffert till blank-rören (OSB-rör).
3. Tillsätt 200 µL vasopressinantiserum (reagens A) till alla rör utom OSB-rören och TC-rören.
4. Vortexblanda samtliga rör och inkubera vid 4° C under 18-24 timmar.
5. Pipettera 200 µL ¹²⁵I-vasopressin (reagens B) i samtliga rör.
6. Vortexblanda samtliga rör och inkubera vid 4° C under 18-24 timmar.
7. Under kontinuerlig omrörning tillsätts 100 µL dubbel antikropp fast fas (reagens C) till alla rör utom TC-rören.
8. Vortexblanda och inkubera under 30-60 minuter vid 4° C.
9. Centrifugera samtliga rör under 15 minuter vid 1700 x g och 4° C.
10. Dekantera eller aspirera supernatanten.
11. Räkna sönderfall i centrifugellet under 2-4 minuter.

	Analys- buffert	Kalibrator, analys-prov, kontroll	Anti-vasopressin		¹²⁵ I-vasopressin		Dubbel antikropp fast fas		
	(D)		(A)		(B)		(C)		
Total aktivitet (TC)	-	-	-	Vortex- blanda och	200 µL	Vortex- blanda och	-	Vortex- blanda och	Centrifugera under
Blank (OSB)	500 µL	-	-	inkubera	200 µl	inkubera	100 µL	inkubera	15 minuter 1700
Kalib. 0 pmol/L	300 µL	-	200 µL	under	200 µl	under	100 µL	under	g
Kalib. 1.9 pmol/L	-	300 µL	200 µL	18-24	200 µl	18-24	100 µL	30-60	vid 4° C. Sug upp
Kalib. 3.8 pmol/L	-	300 µL	200 µL	timmar vid	200 µl	timmar vid	100 µL	minuter vid	eller håll av
Kalib. 7.5 pmol/L	-	300 µL	200 µL	4° C.	200 µl	4° C.	100 µL	4° C.	supernatanten.
Kalib. 15 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µl		100 µL		Räkna sönderfall i
Kalib. 30 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µl		100 µL		återstoden under
Kalib. 60 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µl		100 µL		2-4 minuter.
Kontroller	-	300 µL	200 µL		200 µl		100 µL		
Okänt prov	-		200 µL		200 µl		100 µL		

C. Beräkning

- Subtrahera medelvärde för räknade sönderfall (CPM) i OSB-rören från medelvärdet för CPM i kalibratoren, kontroller och patientprov.
- Rita en kalibreringskurva genom att avsätta CPM, %B/B₀ eller %B/T för precipiterad bunden fraktion mot koncentrationen i vasopressin kalibratorerna.
- För att beräkna halten av vasopressin i extraherade patientprov och kontroller interpoleras CPM, %B/B₀ eller %B/T för proverna med hjälp av kalibreringskurvan.
- Kalibreringskurvan kan också genereras med datorstöd. För datastött kurvritning kan både logit/log- och spline-metoden användas.
- Korrigera plasmavärdena utgående från erhållet utbyte i procent.

Urin: beräkna 24-timmars utsöndring av vasopressin:

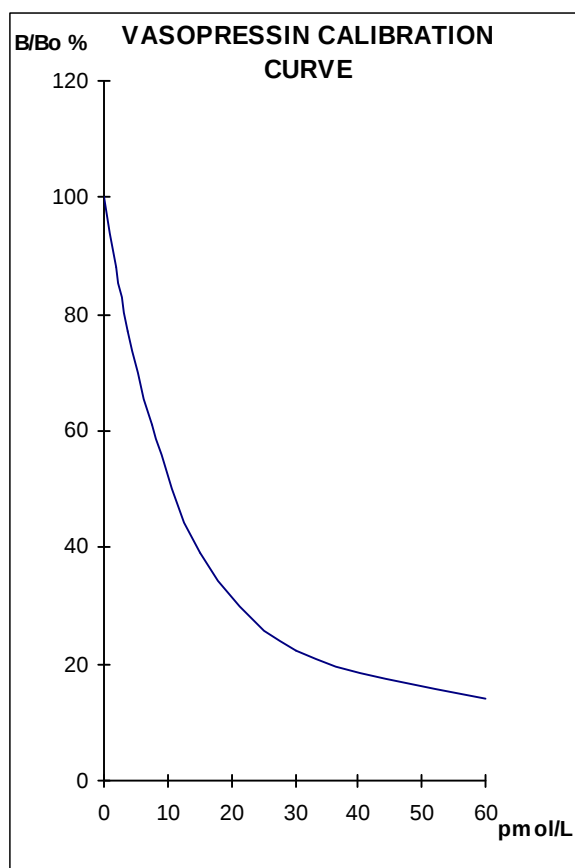
Vasopressin pmol/L x spädning x dygnsurinvolymin i L.

Denna beräkning ger vasopressinkoncentrationen i pmol/dygn. .

D. Kalibreringskurvdata

	Medel cpm	Korrigerad cpm	% B/Bo	Resultat (pmol/L)
Total counts	11107			
OSB	555			
Kalibrator 0 pmol/L	4770	4215	100	
Kalibrator f 1.9 pmol/L	4340	3785	89.8	
Kalibrator e 3.8 pmol/L	3739	3184	75.5	
Kalibrator d 7.5 pmol/L	3135	2580	61.2	
Kalibrator c 15 pmol/L	2199	1644	39.0	
Kalibrator b 30 pmol/L	1490	935	22.2	
Kalibrator a 60 pmol/L	1142	587	13.9	
Kontroll låg	3741	3186	75.6	4.0
Kontroll hög	1769	1214	28.8	21.1

13 EXAMPEL PÅ KALIBRERINGSKURV



14 PRESTANDA

14.1 Precision									
Inom samma analysomgång					Mellan olika analysomgångar				
	n	Medel-värde pmol/L	SD	% V.K.		n	Medel-värde pmol/L	SD	% V.K.
prov A	18	4.17	0.27	6.5	prov A	6	4.38	0.26	6.0
prov B	16	20.2	1.00	4.9	prov B	6	21.4	1.48	6.9

14.2 Kalibrering
Analysen har kalibrerats mot den första internationella WHO-kalibrator 77/501.

14.3 Utbyte			
Två olika prov försattes med olika mängder vasopressinkalibrator:			
Prov	Förväntad konc. (pmol/L)	Avläst konc. (pmol/L)	% utbyte
A1	9.2	9.8	106
A2	14.3	14.4	101
B1	9.6	10.0	104
B2	15.3	15.1	98

14.4 Specificitet

Antiserum mot vasopressin erhöles från kanin.

Följande korsreaktivitet uppmättes vid 50 % bindning (B/B₀).

Peptid	% korsreaktivitet
Arg ⁸ -vasopressin	100
Oxytocin	<0.1
Lys ⁸ -vasopressin	<0.1
Desmopressin	<0.1
Arg ⁸ -vasotocin	80

14.5 Känslighet

Känsligheten är 0.5 pmol/L, vilket motsvarar en ändring i bindning av 3 gånger standardavvikelsen för nollkalibratoren.

14.6 Normalområde

Varje laboratorium bör bestämma sitt eget normalområde för förväntade värden.

Plasma: upp till 13 pmol/L.

Urin: 57 ± 22 pmol/dygnsurin

15 REFERENSER

1. Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.
2. Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.
3. Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metb. Clin. North. Am. 17(2) 281.
4. Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.
5. Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma J. Clin. Endocr. 33, 254-260.
6. Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.
7. Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressine in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.
8. Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.
9. Von Zur Mühlen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.
10. Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.
11. Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.
12. Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.
13. Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E₂ Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.

Utfärdat: 2009-06-08



VASOPRESSIN-RIA

pt

KIPERB319

UTILIZAÇÃO EM DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles, Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

1 INTENÇÃO DE USO

O kit de radioimunoensaio (Ria) – Vasopressina da DIAsource contém reagentes e instruções para medição quantitativa de vasopressina no plasma ou urina. Após a extração da fase sólida (SPE) ou extração com etanol as concentrações de vasopressina no plasma são medidas por radioimunoensaio (RIA). A concentração de vasopressina na urina pode ser medida diretamente. Para uso profissional dentro do laboratório.

2 APLICAÇÃO CLÍNICA

Vasopressina ou Hormônio antidiurético é um nanopeptídeo cíclico com peso molecular de 1083. Sua estrutura é muito similar a da ocitocina, diferindo em apenas dois aminoácidos. HAD endógeno tem atividade antidiurética e pressora, ambos com aproximadamente 400 unidades por mg, com a proporção antidiurético-vasopressina de 1 para 1, e uma meia vida plasmática bifásica de 2,5 e 14,5 minutos. HAD é sintetizado no núcleo supra óptico hipotalâmico e núcleo paraventricular de primatas e transportado via exógena através da pituitária para posterior estocagem e eventual liberação. A aplicação clínica do radioimunoensaio de vasopressina é na diabetes insipidus, intoxicação psicogênica da água, hiponatremia, condições de stress, HAD como neurotransmissor e estudos de hipertensão. Valores de HAD podem ser influenciados por cigarros, chás, cafés, álcool e algumas drogas.

3 PRINCÍPIO DO TESTE

Após a extração da fase sólida (SPE) ou extração com etanol de amostras de plasma, a vasopressina é analisada por um radioimunoensaio competitivo. Vasopressina urinária pode ser medida diretamente. Este ensaio usa anti-soro antivasopressina de coelho e vasopressina marcada com iodo radiativo [¹²⁵I]. Fases ligadas e livres são separadas por um segundo anticorpo ligado a partículas na fase sólida, seguido por um passo de centrifugação. A radioatividade nas frações ligadas é medida e uma curva de calibração típica pode ser gerada. Os valores das amostras extraídas são corrigidos para correção da extração recuperada.

4 PRECAUÇÕES

Materiais derivados de sangue humano e usados na preparação deste kit foram testados e são negativos para antígeno de superfície de hepatite B (HBsAg), anticorpos para HCV e anticorpos para HIV-1 e HIV-2. Entretanto manuseie todos os componentes como possíveis fontes de infecção.

Este kit contém ¹²⁵I (meia vida: 60 dias), emitindo radiações ionizantes X (28 keV) e γ (35,5 keV).

O material radioativo incluído pode ser recebido, adquirido, processado e usado somente por médicos, laboratórios clínicos ou hospitais para testes in vitro clínicos ou laboratoriais não envolvendo risco da administração interna ou externa do material, ou da radiação deste, para a existência humana ou animal. Seu recebimento, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos a regulamentação de cada país.

Aderência às regras básicas de segurança à radiação deve fornecer proteção adequada.

- Não coma, beba, fume ou aplique cosméticos quando materiais radioativos estão sendo usados.
- Não pipete soluções radioativas com a boca.
- Evite contato direto com todos os materiais radioativos com o uso de aventais e luvas descartáveis..
- Todo trabalho radioativo deve ser feito em área designada.
- Materiais radioativos devem ser estocados em containers originais em área designada.
- Equipamentos laboratoriais e vidrarias, os quais estão sujeitos a contaminações, devem ser segregados para prevenir contaminação cruzada de diferentes radioisótopos.
- Qualquer derramamento radioativo deve ser cuidado imediatamente de acordo com os procedimentos estabelecidos.
- Todo material radioativo deve ser descartado de acordo com as regulamentações prevalentes nos laboratórios e diretrizes das agências que tem jurisdição sob o laboratório.

Os reagentes neste kit contêm azida sódica (0,05%). Contato com cobre ou canos de esgoto, pode resultar na formação cumulativa de depósitos de azida altamente explosivos. O descarte destes reagentes na rede de esgoto, deve ser feito com grandes quantidades de água, que previne a formação de azida metálica. Encanamentos suspeitos de estarem contaminados com estes depósitos explosivos devem ser enxaguados vigorosamente com solução de hidróxido de sódio 10%.

5 COLETA DA AMOSTRA

Padronizações cuidadosas da preparação do paciente e das condições de amostragem são recomendadas.

5.1 Vasopressina no plasma

- Aspire o sangue do paciente rapidamente para dentro de um tubo gelado contendo EDTA ou Heparina.
- Centrifugue a 4° C para separar o plasma.
- Congele a amostra em tubos plásticos a -20° C até o ensaio.

NOTA: Vasopressina (ADH) no plasma é estável a -20° C somente por 4 semanas, ou estável por mais de 3 meses após adição de 500 KIU Trasylol (Bayer) por mL de sangue; após extração.

5.2 Vasopressina na urina

Vasopressina pode ser determinada diretamente em urina humana não extraída.

- Colete amostra de urina por 24 horas.
- Registre o volume de urina.
- Meça a osmolaridade urinária.
- Se a amostra não for analisada imediatamente, mantenha a alíquota a -20° C.
- Meça amostras de urina sem diluir, e nas diluições 1:2, 1:4 ou maiores.

6 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS REQUERIDOS

- Pipetas (100 µL; 200 µL; 300 µL; 1,00 mL; 2,00 mL; 5,00 mL)
- Multidispensadores (100 µL, 200 µL)
- Cilindro de medição 25 mL
- Tubos RIA de Poliestireno (12 x 75 mm)
- Etanol absoluto (99%)
- Vortex
- Centrífuga
- Banho de gelo
- Concentrador a vácuo
- Gás Nitrogênio
- Tubos de poliestireno ou de vidro para extração (16 x 100 mm)
- Sep-pak C18 (Waters Ass Inc. art. 051910)
- Ácido Acético 4%
- Metanol absoluto (99%)
- 1N HCl
- Contador Gama

7 CONTROLE DE QUALIDADE

Controles devem ser colocados em cada ensaio. Dois controles são incluídos no kit, o valor (sem o procedimento de extração) é indicado na bula e nas etiquetas dos tubos. Use também controles como recomendados pelo fabricante de controle de plasma e em acordo com as práticas dos laboratórios de referência para monitorar a acurácia, precisão de reagentes e técnicas. Cada laboratório deve estabelecer suas próprias condições experimentais de extração de recuperação.

8 VIDA DE PRATELEIRA E ESTOCAGEM

Este kit é estável até data de validade se estocado como especificado.

Sobre o recebimento do kit, todos os reagentes devem ser guardados a 2-8° C.

Os reagentes reconstituídos devem ser estocados de acordo com a tabela na seção 10.

Os reagentes são estáveis de acordo com a tabela na seção 10, mas não mais que a data de validade.

9 COMPONENTES

Conteúdo do Kit

- | | | | | | | |
|------|---|---------|------------------|---------|--|--|
| 1. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>A</td><td>Ab</td></tr></table> | REAG | A | Ab | 1 frasco, liofilizado de anti-vasopressina (coelho) para 100 tubos.
Cor: amarelo. | |
| REAG | A | Ab | | | | |
| 2. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>B</td><td>Aa</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> | REAG | B | Aa | ¹²⁵ I | 1 frasco, 28 KBq ou 0,75 µCi. Liofilizado. Atividade específica : 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).
Cor: azul. |
| REAG | B | Aa | ¹²⁵ I | | | |
| 3. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>C</td><td>DASP</td></tr></table> | REAG | C | DASP | 1 frasco, IgG produzido em caprino anti-coelho ligado a fase sólida.
11 mL suspensão. | |
| REAG | C | DASP | | | | |
| 4. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>D</td><td>ASSAY</td><td>BUF</td></tr></table> | REAG | D | ASSAY | BUF | 2 frascos, 0,05 M tampão fosfato com 0,25 % HSA, 0,25 % EDTA , 0,05 % NaN ₃ , 500 KIU Trasylol/mL.
2 x 50 mL (líquido) |
| REAG | D | ASSAY | BUF | | | |
| 5. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>E</td><td>CAL</td></tr></table> | REAG | E | CAL | 1 frasco, 5,00 mL calibrador vasopressina, 60 pmol/L. Tampão de ensaio liofilizado. | |
| REAG | E | CAL | | | | |
| 6. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>F</td><td>Control</td></tr></table> | REAG | F | Control | 1 frasco, 2,00 mL de controle liofilizado de vasopressina, nível baixo. | |
| REAG | F | Control | | | | |
| 7. | <table border="1"><tr><td>REAG</td><td>G</td><td>Control</td></tr></table> | REAG | G | Control | 1 frasco, 2,00 mL de controle liofilizado de vasopressina, nível alto. | |
| REAG | G | Control | | | | |

10 PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Item	Cada tubo reconstituído com		Estável a	Anotações Especiais
Anti-vasopressina (Reagente A)	22 mL água destilada	Misture gentilmen te	-20° C por pelo menos 3 meses após reconstituição	
¹²⁵ I-vasopressina (Reagente B)	25 mL água destilada	Misture gentilmen te	-20° C até a data de expiração	
Anticorpo duplo na fase sólida (Reagente C)	Pronto para uso.O reagente de separação deve ser colocado sob agitação magnética por 10 minutos a temp.ambiente		2-8° C até a data de expiração.	É possível pipetar o reagente com o multidispensador.
Tampão de Ensaio (Reagente D)	Pronto para uso		2-8° C até a data de expiração	
Calibrador Vasopressina 60 pmol/L (Reagente E)	5,00 mL água destilada	Misture gentilmen te	-20° C por pelo menos 3 meses após reconstituição	Consulte a tabela para preparação da curva de calibração.
Vasopressina controle baixo (Reagente F)	2,00 mL água destilada	Misture gentilmen te	-20° C por pelo menos 3 meses após reconstituição	O valor do controle é encontrado na etiqueta do frasco e na bula QC (sem extração)
Vasopressina controle alto (Reagente G)	2,00 mL água destilada	Misture gentilmen te	-20° C por pelo menos 3 meses após reconstituição	O valor do controle é encontrado na etiqueta do frasco e na bula QC (sem extração)

PREPARE TODOS OS REAGENTES 15 MINUTOS ANTES DO USO!

11 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Antes de continuar o procedimento de RIA dois diferentes métodos de preparação da amostra podem ser usados:

A1 : Extração Sep-pak C18

A2 : Extração com Etanol

A1: Procedimento da extração Sep-pak C18

Coluna: Cartucho Sep-pak C18 (Waters Ass. Inc. art. 051910)

Procedimento: NÃO EXTRAIA OS CALIBRADORES E CONTROLES

1. Lave a coluna com 10 mL de água destilada, 5 mL de metanol e 10 mL de água destilada, respectivamente.
2. Acidificar 1,0 mL de amostra de plasma com 150 µL 1N HCl.
3. Coloque esta amostra acidificada dentro da coluna.
4. Lave a coluna com 20 mL de ácido acético 4%.
5. Elua com 4mL de metanol.
6. Seque o metanol sob fluxo de nitrogênio ou ar.
7. Reconstitua o resíduo com 1,0 mL do tampão de ensaio.
8. Proceda o ensaio RIA imediatamente ou estoque a amostra extraída a – 20°C.

Para estimar a recuperação, adicione uma alíquota (200 µL) de marcador ¹²⁵I-vasopressina a uma amostra aleatória de plasma e submeta a amostra de recuperação ao mesmo procedimento de extração.

Cálculo da recuperação

1. Prepare o tubo de recuperação estimada (R).
 - Pipete 1,0 mL de amostra de plasma, ao acaso, dentro do tubo de recuperação (R). A amostra usada para este ensaio de recuperação deve ter a proteína semelhante às amostras a serem testadas.
 - Adicione 200 µL de marcador ¹²⁵I-vasopressina no tubo R e misture.
 - Extraia esta amostra juntamente com as amostras do procedimento acima.
2. Prepare dois tubos de Recuperação Total (TR).
 - Pipete 200 µL do marcador ¹²⁵I-vasopressin dentro de dois tubos TR.
 - Adicione 100 µL de tampão de ensaio e misture.
 - Cubra e coloque este tubo de lado para ser contado para o cálculo da recuperação.
3. Reconstitua a amostra de recuperação seca (R) adicionando 1.0 mL de tampão de ensaio e vortex vigorosamente.

4. Pipete 300 µL da amostra de recuperação reconstituída do tubo (R) dentro de dois tubos de ensaio.
5. Conte a recuperação total (TR) e os tubos de recuperação (R) por pelo menos dois minutos no contador gama.
Calcule % de recuperação dividindo a cpm dos tubos de recuperação (R) pela cpm dos tubos de recuperação total (TR) e multiplique por 3,33:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{cpm tubo recuperação (R)}}{\text{cpm tubo recuperação total}} \times 3,33 \times 100\%$$

Extrações recuperadas devem ter valores entre 60-80%.

A2: Procedimento de extração por Etanol

Não extrair os calibradores e os controles..

1. Marque um tubo de extração (E) para cada amostra do paciente. Marque um tubo adicional (R) para estimar a recuperação de extração.
2. Coloque os tubos de extração e o etanol no gelo.
3. Pipete 0,8 mL de cada amostra dentro dos tubos de extração apropriadamente marcados (E).
4. Prepare o tubo para estimar a recuperação (R).
 - Pipete 0,8 mL de amostra de plasma ao acaso dentro do tubo de recuperação (R). A amostra usada para este ensaio de recuperação deverá ter a proteína semelhante às amostras a serem testadas.
 - Adicione 200 µL ¹²⁵I-vasopressina marcada dentro do tubo R e misture.
 - Extraia esta amostra juntamente com as amostras no passo 6
5. Prepare dois tubos de Recuperação Total (TR).
 - Pipete 200 µL ¹²⁵I-vasopressina marcada dentro de dois tubos TR.
 - Adicione 100 µL de tampão de ensaio e misture.
 - Cubra e coloque este tubo de lado para ser contado para o cálculo da recuperação.
6. Adicione 4 mL de etanol gelado para cada amostra (tubos E) e no tubo de Recuperação (R).
7. Misture e vortex por 2 minutos.
8. Centrifuge todos os tubos de extração (E e R) a 2000 g. por 15 min. a 2-8° C.
9. Despreze o sobrenadante para dentro de cada tubo de extração 16 x 100 mm, previamente preparado, limpo e marcado apropriadamente.
10. Evapore os sobrenadantes sob fluxo de nitrogênio para secagem (no max. 37° C), ou evapore usando o concentrador a vácuo.
11. Reconstitua as amostras secas adicionando 0,8 mL de tampão de ensaio e vortex vigorosamente.
12. Realize o procedimento de RIA imediatamente ou estoque as amostras extraídas a -20° C por até 2 semanas antes do uso no ensaio.
13. Reconstitua as amostras recuperadas secas (R) adicionando 0,8 mL de tampão de ensaio e vortex vigorosamente.
14. Pipete 300 µL de amostra de recuperação reconstituída (R) dentro de dois tubos de ensaio.
15. Conte a recuperação total (TR) e os tubos de recuperação (R) por pelo menos dois minutos no contador gama.

Cálculo da Recuperação

Calcule a % de recuperação dividindo a cpm dos tubos recuperados (R) pela cpm dos tubos de recuperação total (TR) e multiplique por 2,67:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{cpm tubo de recuperação (R)}}{\text{cpm tubo recuperação total (TR)}} \times 2,67 \times 100\%$$

Extrações recuperadas devem ter valores entre 40-50%.

12 PROTOCOLO DE ENSAIO

Todos os testes (calibradores, controles e amostras) devem ser realizados em duplicata

A. Preparação das soluções do calibrador

Diluição	Reagente E (=calibrador a)	Concentração Vasopressina 60 pmol/L
1000 µL de Reagente E + 1000 µL tampão de ensaio vortex	Calibrador b	30 pmol/L
1000 µL de calibrador b + 1000 µL Tampão de ensaio Vortex	Calibrador c	15 pmol/L
1000 µL of calibrador c + 1000 µL Tampão de ensaio Vortex	Calibrador d	7,5 pmol/L
1000 µL of calibrador d + 1000 µL Tampão de ensaio Vortex	Calibrador e	3,8 pmol/L
1000 µL of calibrador e + 1000 µL Tampão de ensaio vortex	Calibrador f	1,9 pmol/L
	Tampão de ensaio	0 pmol/L

B. Procedimento de Ensaio

1. Após preparação das soluções do calibrador pipete 300 µL de cada calibrador, controles, cada plasma extraído, ou urina diluída dentro dos tubos correspondentes etiquetados.
2. Adicione 300 µL de Tampão de ensaio (Reagente D) aos tubos para maximizar a ligação (0 pmol/L binding) e 500µL de tampão de ensaio ao tubos brancos (NSB).
3. Adicione 200 µL de anti-soro vasopressina (Reagente A) a todos os tubos, exceto o branco (NSB) e o tubo de contagem total (TC).
4. Vortex todos os tubos e incube a 4° C por 18-24 horas.
5. Adicione 200 µL de ¹²⁵I-vasopressina (Reagente B) a todos os tubos.
6. Vortex todos os tubos e incube a 4° C por 18-24 horas.
7. Enquanto stirring continuamente, adicione 100 µL de anticorpo duplo na fase sólida (Reagente C) para todos os tubos, exceto tubos TC.
8. Vortex e incube 30-60 minutos a 4° C.
9. Centrifuge todos os tubos por 15 min. a 1700 g a 4° C.
10. Despreze ou aspire o sobrenadante.
11. Conte o resíduo por 2-4 min.

	Tampão de Ensaio (D)	Calibrador ou amostra ou controle.	Anti-Vasopressina (A)		¹²⁵ I-Vasopressina (B)		Anticorpo duplo fase sólida (C)		
ContagemTotal (TC)	-	-	-	Vortex	200 µL	Vortex	-	Vortex	Centrifuge
Branco (NSB)	500 µL	-	-	e incube	200 µL	e	100 µL	e incube	por 15
St. 0 pmol/L	300 µL	-	200 µL	por 18-24	200 µL	incube	100 µL	por 30-60	minutos a
St. 1,9 pmol/L	-	300 µL	200 µL	hrs a	200 µL	por 18-24 hrs	100 µL	minutos	1700 g a
St. 3,8 pmol/L	-	300 µL	200 µL	+4° C.	200 µL	a +4° C	100 µL	a 4° C	4° C.
St. 7,5 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		Aspire ou
St. 15 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		decante o
St. 30 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		sobrenadante.
St. 60 pmol/L	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		Conte o
Controles	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		resíduo por 2-
Amostras desconhecidas	-	300 µL	200 µL		200 µL		100 µL		4 minutos.

C. Cálculo

- Subtraía a média da contagem (cpm) dos brancos (NSB) da média das contagens (cpm) das replicatas dos calibradores, controles e amostras de pacientes.
- A curva de calibração pode ser gerada plotando a cpm, % B/Bo ou % B/T da fração precipitada ligada contra a concentração dos calibradores de vasopressina.
- Para obter a concentração de vasopressina em amostras extraídas de pacientes e controles, suas cpm, % B/Bo ou % B/T das frações precipitadas ligadas são interpoladas agora com a curva de calibração gerada.
- A curva de calibração também pode ser construída por computador. Para redução de dados automatizados, ambos logit/log e métodos "Spline" podem ser usados.
- Corrija os valores de plasma e urina para % de extração de recuperação.

Urina: calcule a excreção durante 24 horas de vasopressina:

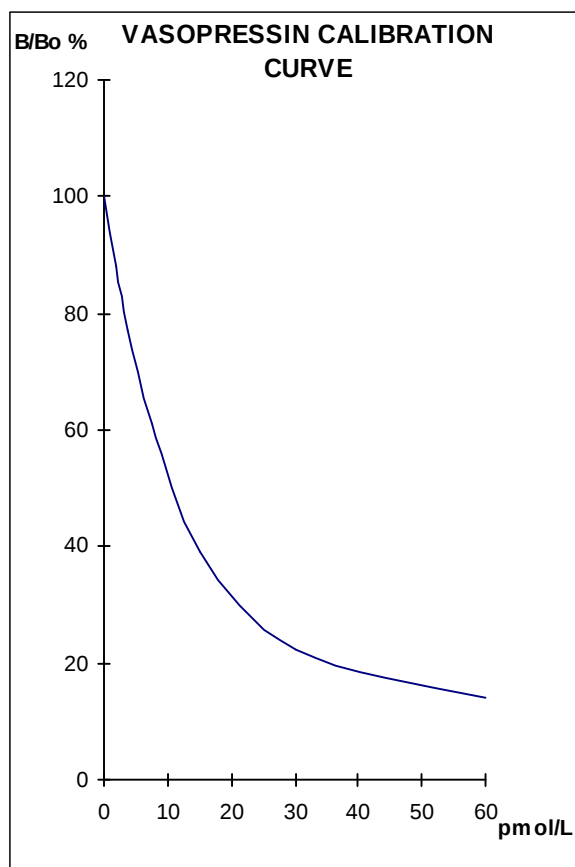
Vasopressina pmol/L x diluição x volume em 24 horas em L.

Este cálculo fornece a concentração de vasopressina em pmol/24 horas.

D. Dados da Curva de Calibração

	Média cpm	CPM corrigida	% B/Bo	Resultados (pmol/L)
Total counts	11107			
NSB	555			
Calibrador 0 pmol/L	4770	4215	100	
Calibrador f 1,9 pmol/L	4340	3785	89,8	
Calibrador e 3,8 pmol/L	3739	3184	75,5	
Calibrador d 7,5 pmol/L	3135	2580	61,2	
Calibrador c 15 pmol/L	2199	1644	39,0	
Calibrador b 30 pmol/L	1490	935	22,2	
Calibrador a 60 pmol/L	1142	587	13,9	
Controle baixo	3741	3186	75,6	4,0
Controle alto	1769	1214	28,8	21,1

13 EXEMPLO DE CURVA DE CALIBRAÇÃO



14 CARACTERÍSTICAS DO ENSAIO

14.1 Precisão									
Dentro da corrida					Entre corridas				
	n	média pmol/L	SD	% c.v.		n	média pmol/L	SD	% c.v.
amostra A	18	4,17	0,27	6,5	amostra A	6	4,38	0,26	6,0
amostra B	16	20,2	1,00	4,9	amostra B	6	21,4	1,48	6,9

14.2 Calibração
Este ensaio é calibrado comparado ao primeiro calibrador internacional WHO 77/501

14.3 Recuperação			
Duas amostras diferentes são adicionadas com diferentes quantidades de calibrador de vasopressina			
Amostra	Conc. Esperada. (pmol/L)	Conc. Observada. (pmol/L)	% Recuperação
A1	9,2	9,8	106
A2	14,3	14,4	101
B1	9,6	10,0	104
B2	15,3	15,1	98

14.4 Especificidade

Vasopressina anti-soro é produzido em coelhos.

As reações cruzadas a seguir são medidas a 50% de ligação (B/Bo)

<u>Peptídeo</u>	<u>% Reação Cruzada</u>
Arg ⁸ Vasopressina	100 %
Ocitocina	<0,1 %
Lys ⁸ -Vasopressina	<0,1 %
Desmopressina	<0,1 %
Arg ⁸ Vasotocina	80 %

14.5 Sensibilidade

A sensibilidade, considerada como 3 mudanças no desvio padrão do calibrador 0, é 0,5 pmol/L

14.6 Média Normal

Cada laboratório deve estabelecer sua média normal para valores esperados.

Plasma: menos que 13 pmol/L

Urina: 57 ± 22 pmol/24 horas urina

15 LITERATURA

Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.

Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.

Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metab. Clin. North. Am. 17(2) 281.

Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.

Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.

Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.

Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressine in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.

Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.

Von Zur Mühlen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.

Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.

Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.

Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.

Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.

Data da revisão: 2009-06-08

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

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

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

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

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

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

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