



# **1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT**

***KIP1929***

---

**LOT** : 110217/1

Read entire protocol before use.

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. INTENDED USE

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

## II. GENERAL INFORMATION

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

**For technical assistance or ordering information contact :**  
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.90

## III. CLINICAL BACKGROUND

### A. Biological activities

Vitamin D<sub>3</sub> is mainly synthesized in the skin from 7- dehydrocholesterol and is partially from dietary origin. In the liver, Vitamin D<sub>3</sub> is hydroxylated on carbon 25 to produce the obligatory intermediate 25-OH-D<sub>3</sub>. 25-OH-D<sub>3</sub> must be metabolized further before it can carry out the functions of Vitamin D on intestine, kidney and bone. This subsequent reaction takes place exclusively in the kidney in the non-pregnant mammal. Thus 25-OH-D<sub>3</sub> is further hydroxylated in the 1 $\alpha$ -position to produce 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

In addition to renal tissue, placenta of pregnant women and macrophage cells in case of sarcoidosis can also produce some amount of 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is the active form of Vitamin D with regard to the known functions whereas 25-OH-D<sub>3</sub> and Vitamin D<sub>3</sub> itself can be excluded as being physiologically functional. Furthermore since 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is produced in the kidney and has some of its functions in the bone and intestine, it must be considered as a hormone. This hormone stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus. It also stimulates bone resorption and mineralization thereby preventing the development of rickets and osteomalacia.

1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> might also be active in other tissues responsible for Calcium transport (placenta, kidney, mammary gland, ...) and endocrine glands such as parathyroid glands. 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is rapidly metabolized and its lifetime is approximately 2-4 h in plasma. Its main metabolite is calcitroic acid, a C-23 carboxylic derivative essentially without any biological activity. In addition to this pathway, 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> undergoes 24-hydroxylation to produce 1,24,25-trihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub>. This compound has less biological activity than its parent and this metabolism is considered as a minor pathway.

The levels of 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma or serum is 100 to 1000 less than that of 25-OH-D<sub>3</sub>. Due to its low concentrations and the presence of many similar metabolites, the measurement of 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> requires extraction and separation either by HPLC or by column chromatography.


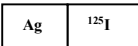
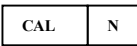





### B. Clinical application

The measurement of circulating 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is indicated in several disorders affecting calcium metabolism such as : sarcoidosis, renal failure, hyper and hypo-parathyroidism, rickets, tumor-associated hypercalcemia, Vitamin-resistant dysfunction and treatment with anti-convulsive medication.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

#### V. REAGENTS PROVIDED

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

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

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Diisopropylether (p.a.)
- Cyclohexane (p.a.)
- Ethyl acetate (p.a.)
- Ethanol absolute (p.a.)
- Dichloromethane (p.a.)
- Pipettes for delivery of: 200 µl, 500 µl, 1 ml and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Glass tubes (12 x 75 mm) for extraction and for elution. (closed with a cap for the extraction step)
- Glass tubes (16 x 100 mm) or (12 x 120 mm), or polypropylene tubes (falcon 2097), for the washing of the cartridges.
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Centrifuge operating at 800 g.

- Tube shaker (1200 rpm)
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring <sup>125</sup>I may be used (minimal yield 70%).

#### VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 2 ml elution solution (**just before the incubation step**).
- Controls:** Reconstitute the controls with 2 ml distilled water.
- <sup>125</sup>I 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin.D :** Reconstitute with 26 ml of reconstitution solution.
- Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- Extraction solvent :** 2 ml for each control or sample to be tested, are needed. **Prepare a fresh solution** of diisopropylether, cyclohexane, ethyl acetate, (50, 40, 10 v/v).
- Washing solvent :** 1 ml for each control or sample to be tested, are needed. **Prepare a fresh solution** of diisopropylether, cyclohexane, ethyl acetate, ethanol absolute (50, 40, 10, 1 v/v).

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

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

#### X. PROCEDURE

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

#### B. Procedure

- Extraction step : ! Only for controls and samples.**
  - Label glass tubes (12x75 mm) for extraction: 2 controls and up to 16 samples.
  - Add 0.5 ml control or sample in the respective tubes.
  - Dispense 2 ml extraction solvent in each tube.
  - Tubes are closed with a cap and placed on a shaker for 1 hour at 1200 rpm.
  - Centrifuge each tube for 5 minutes at room temperature (at 800 g).
  - Supernatants are needed for the next step of separation.
- Separation step : ! Only for controls and samples**
  - Label glass tubes (16 x 100 mm) or (12 x 120 mm), or polypropylene tubes (falcon 2097), for washing cartridges: 2 controls and up to 16 samples.
  - Put one "Bond Elut" cartridge in each tube.
  - Apply 1.6 ml of supernatant (2 x 0.8 ml), obtained after extraction step, on cartridge.

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

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

### III. Incubation step :

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

### XI. CALCULATION OF RESULTS

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

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

- Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B<sub>0</sub>(%)) values for each calibrator point as a function of the 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
- Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample (B/B<sub>0</sub> (%)) values, determine the 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D concentrations of the samples from the calibration curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D (B<sub>0</sub>/T) must be checked.

### XII. TYPICAL DATA

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

1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D	cpm	B/Bo (%)
Total count	51237	
Calibrator		
0.0 pg/ml	20425	100.0
4.7 pg/ml	17833	87.3
12.2 pg/ml	15921	77.9
60.4 pg/ml	10602	51.9
160.0 pg/ml	7150	35.0
411.0 pg/ml	4587	22.5

### XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

#### A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 1.6 pg/ml.

#### B. Specificity

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

Compound	Cross-Reactivity (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D3	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D2	70
25OH-Vitamin-D3	0.0004
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D3	0.0027
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D3	0.007

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

#### C. Precision

##### INTRA-ASSAY PRECISION

##### INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	INTRA-ASSAY PRECISION		INTER-ASSAY PRECISION			
		<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	24.5 ± 2.3	9.3	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	77.3 ± 3.5	4.5	B	10	33.4 ± 3.6	11.3

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

#### 7. D. Accuracy

##### DILUTION TEST

Sample	Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)
	1/1	-	70.0
	1/2	35.0	35.7
	1/4	17.5	14.5
	1/8	8.8	7.8
	1/16	4.4	4.6

The sample was diluted with Elution solution.

##### RECOVERY TEST

Sample	added 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D (pg/ml)	Recovered 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D (pg/ml)	Recovered (%)
Serum n°1	25	23.8	95
	50	47.5	95
	100	100.2	100
Serum n° 2	25	29.6	118
	50	47.9	96
	100	90.4	90

#### Conversion factor :

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

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

### XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

#### XV. REFERENCE INTERVALS

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

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

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

#### XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

##### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

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

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

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

#### XVII. BIBLIOGRAPHY

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

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

#### XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

DIASource Catalogue Nr : KIP1929	P.I. Number : 1700602/en	Revision nr : 110217/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2011-02-17

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. BUT DU DOSAGE

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

## II. INFORMATIONS GENERALES

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

**Pour une assistance technique ou une information sur une commande :**  
**Tel : +32 (0)10 84.99.11      Fax : +32 (0)10 84.99.90**

## III. CONTEXTE CLINIQUE

### A. Activités biologiques

La vitamine D<sub>3</sub> est synthétisée principalement dans la peau à partir du 7-déhydrocholestérol et celle d'origine diététique est hydroxylée sur le carbone 25 dans le foie principalement, pour produire l'intermédiaire obligatoire 25-OH-D<sub>3</sub>. La 25-OH-D<sub>3</sub> doit être encore métabolisée avant qu'elle puisse effectuer les fonctions de la vitamine D dans l'intestin, les reins et os. Cette réaction a lieu exclusivement dans les reins de mammifères non enceintes. Ainsi la 25-OH-D<sub>3</sub> est encore hydroxylée en position 1 $\alpha$  pour produire la 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub>). En plus du tissu rénal, le placenta des femmes enceintes et les cellules de macrophage en cas de sarcoïdose peuvent également produire une certaine quantité de 1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub>.

La 1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub> est la forme active de la vitamine D en ce qui concerne les fonctions connues, tandis que la 25-OH-D<sub>3</sub> et la vitamine D<sub>3</sub> elles-mêmes ne sont pas considérées comme physiologiquement fonctionnelles. De plus, comme la 1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub> est produite dans les reins et agit dans les os et l'intestin, elle doit être considérée comme une hormone. Cette hormone stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Elle stimule également la résorption et la minéralisation des os, empêchant de ce fait le développement du rachitisme et d'ostéomalacie. La 1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub> pourrait également être en activité dans d'autres tissus responsables du transport de calcium (placenta, rein, glande mammaire, etc...) et glandes d'endocrine telles que les glandes parathyroïdes. La 1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub> est rapidement métabolisée et sa vie est approximativement de 2-4 h dans le plasma. Son métabolite principal est l'acide de calcitroïde, un dérivé carboxylique C-23, sans activité biologique essentielle.

En plus de cette voie, la 1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub> subit une 24-hydroxylation pour produire la 1,24,25-trihydroxy-vitamine D<sub>3</sub>. Ce composé a une activité biologique moins importante que son ascendant et est considéré comme voie mineure. Les niveaux en 1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub> plasma ou sérum étant 100 à 1000 moins que concentré que la 25-OH-D<sub>3</sub> et dû à la présence de beaucoup de métabolites semblables, le dosage de la 1 $\alpha$ ,25-(OH)2D<sub>3</sub> exige une extraction et séparation par HPLC ou par chromatographie sur cartouche.


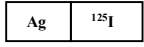
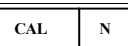
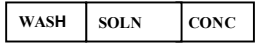
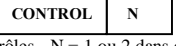
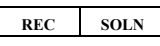
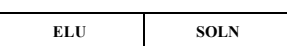
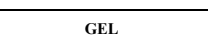
### B. Application clinique

Le dosage de la 1 $\alpha$ , 25-(OH)2D<sub>3</sub> circulante est indiquée dans plusieurs désordres affectant le métabolisme calcique comme: sarcoïdose, insuffisance rénale, hyper et hypo-parathyroïdisme, rachitisme, tumeur associée à une hypercalcémie, dysfonctionnement vitamino-résistant et traitement avec médication anti-convulsive.

#### IV. PRINCIPE DU DOSAGE

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

#### V. REACTIFS FOURNIS

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

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

#### VI. MATERIEL NON FOURNI

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

1. Eau distillée
2. Di-isopropyléther. (p.a.)
3. Cyclohexane. (p.a.)
4. Ethylacetate. (p.a.)
5. Ethanol absolu. (p.a.)
6. Dichlorométhane (p.a.)
7. Pipettes pour distribuer: 200 µl, 500 µl, 1 ml et 2 ml (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
8. Tubes en verre (12 x 75 mm) pour l'extraction et l'éluion (fermés par un bouchon pour la phase d'extraction)

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

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs:** Reconstituer les calibrateurs avec 2 ml de Solution d'Elution (**immédiatement avant la phase d'incubation**).
- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 2 ml d'eau distillée.
- <sup>125</sup> 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamine.D :** Reconstituer avec 26 ml de la solution de reconstitution.
- Solution de Lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.
- Solvant d'extraction:** on a besoin de 2 ml pour chaque contrôle ou échantillon à tester. **Préparer une fraîche solution** de di-isopropyléther, cyclohexane, ethylacetate, (50, 40, 10 v/v).
- Solvant de lavage :** on a besoin de 1 ml pour chaque contrôle ou échantillon à tester. **Préparer une fraîche solution** de di-isopropyléther, cyclohexane, ethylacetate, éthanol absolu (50, 40, 10, 1 v/v).

#### VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

#### IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

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

#### X. MODE OPERATOIRE

##### A. Notes de manipulation

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

Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

##### B. Mode opératoire

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

- Les tubes sont fermés par un bouchon et mis sur un agitateur pendant 1 heure à 1200 rpm.
- Centrifuger chaque tube pendant 5 minutes à température ambiante (à 800 g).
- Les surnageants sont nécessaires pour la phase prochaine de la séparation.

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

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

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

## III. Phase d'incubation :

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

## XI. CALCUL DES RESULTATS

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

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

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

## XII. DONNEES TYPES

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

1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN-D	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	51237	
Calibrateur	0,0 pg/ml 4,7 pg/ml 12,2 pg/ml 60,4 pg/ml 160,0 pg/ml 411,0 pg/ml	20425 17833 15921 10602 7150 4587
		100,0 87,3 77,9 51,9 35,0 22,5

## XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

### A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 1,6 pg/ml.

### B. Spécificité

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

Composé	Réactivité Croisée (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D2	70
25OH-Vitamine-D3	0,0004
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	0,0027
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	0,007

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

### C. Précision

#### INTRA-ESSAI

#### INTER-ESSAI

Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	24.5 ± 2.3	9.3	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	77.3 ± 3.5	4.5	B	10	33.4 ± 3.6	11.3

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

### D. Exactitude

#### TEST DE DILUTION

Echantillon	Dilution	Concent. Théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)
	1/1	-	70.0
	1/2	35.0	35.7
	1/4	17.5	14.5
	1/8	8.8	7.8
	1/16	4.4	4.6

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

#### TEST DE RECUPERATION

Echantillon	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml) ajouté	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml) récupéré	Recupération (%)
Sérum n°1	25	23.8	95
	50	47.5	95
	100	100.2	100
Sérum n° 2	25	29.6	118
	50	47.9	96
	100	90.4	90

#### Facteur de conversion :

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

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

#### XIV. CÔNTRÔLE QUALITE INTERNE

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

#### XV. VALEURS ATTENDUES

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

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

Population	Portée (pg/ml)	Moyenne	SD	n
Sujets normaux	19.6 – 54.3	35.3	10.6	51

#### XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

##### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de  $^{125}\text{I}$  (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et  $\gamma$  (35.5 keV).

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

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

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

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

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

#### XVII. BIBLIOGRAPHIE

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

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

#### XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

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

Numéro de catalogue DIASource : KIP1929	Numéro de P.I.: 1700620/fr	Numéro de révision : 110217/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Date de révision : 2011-02-17



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. VERWENDUNGSZWECK

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

## II. ALLGEMEINE INFORMATION

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

**Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:**

**Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90**

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

E-mail Ordering : [ordering@diasource.be](mailto:ordering@diasource.be)

## III. KLINISCHER HINTERGRUND

### A. Biologische Aktivität

Das Vitamin D<sub>3</sub> wird hauptsächlich in der Haut aus 7-Dehydrocholesterin gebildet und stammt teilweise aus der aufgenommenen Nahrung. Durch Hydroxylierung auf Kohlenstoff 25 in der Leber entsteht das obligaten Zwischenprodukt 25-OH-D<sub>3</sub>. Bevor 25-OH-D<sub>3</sub> die Funktionen des Vitamins D in Darm, Niere und in den Knochen erfüllen kann, muss es weiter verstoffwechselt werden. Diese Reaktion findet beim nichtträchtigen Säugtier ausschließlich in der Niere statt. Auf diese Weise wird 25-OH-D<sub>3</sub> an der 1 $\alpha$ -Position weiter hydroxyliert, sodass 1 $\alpha$ ,25 Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) entsteht.

Außer dem renalen Gewebe sind auch die Plazenta schwangerer Frauen sowie Makrophagen bei Sarkoidose in der Lage, eine bestimmte Menge 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> herzustellen. 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stellt in Bezug auf die bekannten Funktionen die aktive Form des Vitamins D dar, während ausgeschlossen werden kann, dass das 25-OH-D<sub>3</sub> sowie Vitamin D<sub>3</sub> selbst physiologisch aktiv sind. Da das 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in der Niere produziert wird und einige seiner Funktionen in Knochen und Darm erfüllt, ist es ferner als Hormon zu betrachten. Dieses Hormon stimuliert die Aufnahme von sowohl Kalzium als auch Phosphor in den Darm. Es regt weiterhin die Knochenresorption und -mineralisierung an, wodurch der Entwicklung von Rachitis und Osteomalazie vorgebeugt wird.

1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> könnte auch in anderen, für den Kalziumtransport zuständigen Geweben (Plazenta, Niere, Brustdrüsen usw.) und in endokrinen Drüsen wie Nebenschilddrüsen aktiv sein. Es wird sehr schnell abgebaut; die Haltbarkeit im Plasma beträgt ca. 2 - 4 Stunden. Der Hauptmetabolit des 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ist die Calcitroidsäure, ein C-23-Karboxyl-Derivat, welches eigentlich ohne irgendeine biologische Aktivität ist. Zusätzlich zu diesem Weg unterliegt das 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> auch einer 24-Hydroxylierung, die zum 1,24,25-Trihydroxy-Vitamin D<sub>3</sub> führt. Dieses Produkt hat eine geringere biologische Aktivität als seine Eltern und ist als ein unbedeutender Abkömmling zu betrachten.

Da die Konzentrationen des 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in Plasma oder Serum 100- bis 1.000-fach geringer als die des 25-OH-D<sub>3</sub> sind und wegen der Anwesenheit zahlreicher ähnlicher Metaboliten, erfordert die Bestimmung des 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> eine Extraktion sowie eine Separation entweder durch HPLC oder Säulenchromatografie.


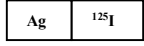
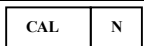

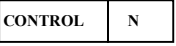
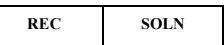
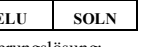

### B. Klinische Anwendung

Die Messung des zirkulierenden 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ist bei verschiedenen den Kalziumstoffwechsel betreffenden Erkrankungen angezeigt wie: Sarkoidose, Nierenversagen, Über- bzw. Unterfunktion der Schilddrüsen, Rachitis, tumorvermittelte Hyperkalzämie, vitaminresistente Mangelfunktion und Behandlung mit antikonvulsiven Medikamenten.

#### IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

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

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

#### VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Diisopropyläther (p.a.)
3. Cyclohexan (p.a.)
4. Ethylazetat (p.a.)
5. Äthanol, absolut (p.a.)
6. Dichloromethan (p.a.)
7. Pipetten: 200 µl, 500 µl, 1 ml und 2 ml (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
8. Glasröhrchen (12 x 75 mm) für Extraktion und Eluierung (für Extraktionsschritt mit Verschluss).

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

#### VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

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

#### VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

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

#### IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

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

#### X. DURCHFÜHRUNG

##### A. Bemerkungen zur Durchführung

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

##### B. Durchführung

###### I. Extraktionsschritt: ! Nur für Kontrollen und Proben

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

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

## II. Separationsschritt: ! Nur für Kontrollen und Proben

- Label Glasröhrcchen (16 x100 mm) oder (12 x 120 mm), oder Polypropylenröhrcchen (Falcon 2097), für das Waschen der Kartuschen : 2 Kontrollen und bis zu 16 Proben.
- Stecken Sie eine ‚Bond Elut‘ Kartusche in jedes Röhrcchen.
- Tragen Sie 1,6 ml des Überstandes (2 x 0,8 ml) aus dem Extraktionsschritt auf die Kartuschen.
- Waschen Sie die Kartuschen mit 1 ml Waschlösungsmittel (Herstellung s.o.). ! Niemals Vakuum an die Kartuschen anlegen, sondern Lösungsmittel allein durch Schwerkraft passieren lassen.
- Pipettieren Sie 300 µl Dichlormethan auf die Kartuschen; durch Schwerkraft passieren lassen.
- Pipettieren Sie 300 µl dest. Wasser auf die Kartuschen.
- Zentrifugieren Sie alle Röhrcchen 5 min. bei Raumtemperatur (800 g).
- Beschriften Sie die Glasröhrcchen (12 x 75 mm) für das Eluieren von 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D beschriften. Übertragen Sie die Kartuschen nach dem Zentrifugieren in die entsprechenden Glasröhrcchen.
- Tragen Sie 400 µl Eluierungslösung auf jede Kartusche, um 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D zu eluieren und zentrifugieren Sie 5 min. bei Raumtemperatur (800 g).
- Vortexmischen** Sie die eluierte Fraktion.

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

## III. Inkubationsschritt:

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

## XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

- Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B<sub>0</sub>(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D -Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
- Bestimmen Sie die 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D -Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B<sub>0</sub>(%) der Referenzkurve.
- Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D (B<sub>0</sub>/T) geprüft werden.

## XII. TYPISCHE WERTE

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

1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN-D		Cpm	B/B <sub>0</sub> (%)
Gesamtaktivität		51237	
Kalibrator	0,0 pg/ml	20424	100,0
	4,7 pg/ml	17833	87,3
	12,2 pg/ml	15921	77,9
	60,4 pg/ml	10602	51,9
	160,0 pg/ml	7150	35,0
	411,0 pg/ml	4587	22,5

## XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

### A. Nachweisgrenze

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

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 1,6 pg/ml.

### B. Spezifität

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

Substanz	Kreuz-Reaktivität (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D3	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D2	70
25OH-Vitamin D3	0,0004
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D3	0,0027
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D3	0,007

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

### C. Präzision

#### INTRA-ASSAY PRÄZISION

#### INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)		CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)		CV (%)
A	20	24.5 ± 2.3	9.3		A	10	13.6 ± 1.7	12.7	
B	20	77.3 ± 3.5	4.5		B	10	33.4 ± 3.6	11.3	

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

### D. Genauigkeit

#### VERDÜNNUNGSTEST

Probe	Verdünnung	Theoretische Konz. (pg/ml)	Gemessene Konz. (pg/ml)
	1/1	-	70.0
	1/2	35.0	35.7
	1/4	17.5	14.5
	1/8	8.8	7.8
	1/16	4.4	4.6

Die Proben wurden mit Eluierungslösung verdünnt.

#### WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zugeg. 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml)	Wiedergef. 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum n°1	25	23.8	95
	50	47.5	95
	100	100.2	100
Serum n°2	25	29.6	118
	50	47.9	96
	100	90.4	90

#### Umrechnungsfaktor:

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

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

#### XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

#### XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

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

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

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

#### XV. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

##### Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält <sup>125</sup>I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und  $\gamma$  (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

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

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

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

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

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

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

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

#### XVII. LITERATUR

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

#### XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

DIAsource Katalognummer : KIP1929	Beipackzettelnnummer : 1700620/de	Nummer der Originalausgabe : 110217/1
--------------------------------------	--------------------------------------	--

Lees het hele protocol vóór gebruik.

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. BEOOGD GEBRUIK

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

## II. ALGEMENE INFORMATIE

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

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie

kunt u contact opnemen met :

Tel: +32 (0) 10 84.99.11

Fax: +32 (0) 10 84.99.90

## III. KLINISCHE ACHTERGROND

### A. Biologische activiteiten

Vitamine D<sub>3</sub> wordt vooral gesynthetiseerd in de huid van 7- dehydrocholesterol en vindt zijn oorsprong gedeeltelijk in het dieet. In de lever wordt Vitamine D<sub>3</sub> gehydroxyleerd op koolstof 25 om de verplichte tussenstap 25-OH-D<sub>3</sub> te produceren. 25-OH-D<sub>3</sub> moet verder gemetaboliseerd worden voor het de functies van Vitamine D op de darm, de nier en de beenderen kan uitoefenen. Deze volgende reactie vindt enkel plaats in de nier van een niet zwanger zoogdier. Zo wordt 25-OH-D<sub>3</sub> verder gehydroxyleerd in de 1 $\alpha$ -positie om 1 $\alpha$ ,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) te produceren.

Naast het nierweefsel kunnen ook de placenta van zwangere vrouwen en macrofage cellen in geval van sarcoïden een hoeveelheid 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> produceren. 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is de actieve vorm van Vitamine D in verband met de gekende functies waarvan 25-OH-D<sub>3</sub> en Vitamine D<sub>3</sub> zelf kunnen worden uitgesloten als zijnde fysiologisch functioneel. Daarenboven, gezien 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> geproduceerd wordt in de nier en enkele van zijn functies in de beenderen en de darm heeft, moet het beschouwd worden als een hormoon. Dit hormoon stimuleert de intestinale absorptie van zowel calcium als fosfor. Het stimuleert ook de beenderresorptie en -mineralisatie en voorkomt zo de ontwikkeling van rachitis en osteomalacie.

1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> kan ook actief zijn in andere weefsels verantwoordelijk voor calciumtransport (placenta, nier, borstklier, ...) en endocriene klieren zoals de bijnier. 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wordt snel gemetaboliseerd en zijn levensduur is ongeveer 2-4 h in plasma. Zijn voornaamste metabooliet is calcitriol, een C-23 carboxyl derivaat hoofdzakelijk zonder enige biologische activiteit. Naast deze pathway, ondergaat 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> een 24-hydroxylatie om 1,24,25-trihydroxy-Vitamine D<sub>3</sub> te produceren. Deze component heeft minder biologische activiteit dan zijn voorganger en zijn metabolisme wordt beschouwd als een mindere pathway.

De gehalten van 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in plasma of serum zijn 100 tot 1000 minder dan die van 25-OH-D<sub>3</sub>. Door zijn lage concentraties en de aanwezigheid van vele gelijkaardige metaboolieten, vraagt de meting van 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> extractie en scheiding ofwel door HPLC ofwel door patroonchromatografie.


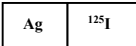
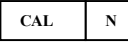
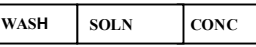

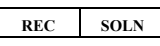
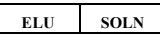
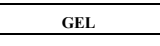
### B. Klinische toepassing

De meting van circulerend 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wordt aangewezen bij verschillende kwalen die het calciummetabolisme aantasten zoals : sarcoïdose, nierinsufficiëntie, hyper en hypo-parathyroidisme, rachitis, tumor- geassocieerde hypercalcemie, Vitamine-resistente disfunctie en behandeling met anti-convulsieve medicatie.

#### IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Enkel de monsters en de controles, niet de kalibrators, worden geëxtraheerd met een mengeling van solventen en toegepast op patronen om  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamine-D van andere Vitamine-D metabolieten te scheiden. Na elutie van de monsters en de controles worden de kalibrators, de monsters en de controles geïncubeerd in gecoate buisjes. Een vaste hoeveelheid  $^{125}\text{I}$  gelabeld  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D concurreert met  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D dat bepaald moet worden en aanwezig is in het monster of in de kalibrator voor een vast aantal plaatsen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een overnacht incubatie bij kamertemperatuur, wordt de concurrentiereactie beëindigd door een aspiratiefase. Daarna worden de buisjes gewassen met 2 ml werk-wasoplossing en opnieuw afgezogen. Een kalibratiecurve wordt uitgezet en de concentraties van  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D van de monsters worden bepaald door dosisinterpolatie van de kalibratiecurve.

#### V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagens	Kit voor 48 testen	Kleur-code	Reconstitutie
 Buisjes gecoat met anti $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D	1 x 48	Groen	Klaar voor gebruik
 Tracer : $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D gelabeld met $^{125}\text{I}$ -jood (HPLC-kwaliteit) in fosfaat buffer met bovien caseïne en gentamycine	1 flacon gevries-droogd 75 kBq	Rood	Voeg 26 ml reconstitutieoplossing toe
 Kalibrators $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D: N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in fosfaat buffer met bovien caseïne en gentamycine	5 flacons, gevries-droogd	Geel	2 ml Elutieoplossing toevoegen
 Wasoplossing 70x : TRIS-HCl	1 flacon 10 ml	Bruin	70x met gedistilleerd water <b>verdunnen</b> (gebruik een magnetische roerder)
 Controles : N = 1 of 2 in humaan plasma met gentamycine	2 flacons, gevries-droogd	Zilver	2 ml gedistilleerd water <b>toevoegen</b>
 Reconstitutieoplossing: fosfaat buffer met bovien caseïne en azide (< 0,1%)	1 flacon 30 ml	Zwart	Klaar voor gebruik
 Elutieoplossing: fosfaat buffer met bovien caseïne, methanol en azide (< 0,1%)	1 flacon 30 ml	Groen	Klaar voor gebruik
 Bond Elut Silica-kolom	20		Bewaar bij kamertemperatuur

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

#### VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

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

1. Gedistilleerd water
2. Diisopropylether (p.a.)
3. Cyclohexaan (p.a.)
4. Ethyl acetaat (p.a.)
5. Zuivere ethanol (p.a.)
6. Dichloromethaan (p.a.)
7. Pipetten voor een volume van 200  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 1 ml en 2 ml (het gebruik van nauwkeurige pipetten met plastic wegwerptips wordt aanbevolen)

8. Glazen buisjes (12 x 75 mm) voor de extractie en voor de elutieoplossing. (gesloten met een dop voor de extractiefase)
9. Glazen buisjes (16 x 100 mm) of (12 x 120 mm), of buisjes uit polypropyleen (falcon 2097), voor het wassen van de patronen
10. Vortexmenger
11. Magnetische roerder
12. Centrifuge werkend bij 800 g
13. Schudder voor de buisjes (1200 rpm)
14. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase
15. Afzuigsysteem (facultatief).
16. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van  $^{125}\text{I}$ . Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd

#### VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators:** Reconstitueer de controles met 2 ml Elutieoplossing (**juist voor de incubatiefase**).
- B. **Controles:** Reconstitueer de controles met 2 ml gedistilleerd water.
- C.  **$^{125}\text{I}$   $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin-D :** Reconstitueer met 26 ml van de reconstitutieoplossing.
- D. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedistilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing. Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.
- E. **Extractiesolvent :** 2 ml voor elke te testen controle of monster is nodig. **Bereid een verse oplossing** van diisopropylether, cyclohexaan, ethyl acetaat, (50, 40, 10 v/v).
- F. **Wassolvent :** 1 ml voor elke te testen controle of monster is nodig. **Bereid een verse oplossing** van diisopropylether, cyclohexaan, ethyl acetaat, zuivere ethanol (50, 40, 10, 1 v/v).

#### VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

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

#### IX. MONSTERAFNAME EN MONSTERBEREIDING

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

#### X. PROCEDURE

##### A. Opmerkingen bij de procedure

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

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

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

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

## B. Procedure

### I. Extractiefase : ! Enkel voor controles en stalen.

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

### II. Scheidingsfase : ! Enkel voor controles en monsters

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

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

### III. Incubatiefase :

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

## XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

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

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

3. Zet de (B/B<sub>0</sub>(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
4. Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
5. Bepaal de 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B<sub>0</sub>(%)) te interpoleren.

6. Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D (B<sub>0</sub>/T), gecontroleerd worden.

## XII. KENMERKENDE GEGEVENS

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

1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN-D	cpm	B/Bo (%)	
Totaaltelling	51237		
Kalibrator	0,0 pg/ml	20425	100,0
	4,7 pg/ml	17833	87,3
	12,2 pg/ml	15921	77,9
	60,4 pg/ml	10602	51,9
	160,0 pg/ml	7150	35,0
	411,0 pg/ml	4587	22,5

## XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

### A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met de serie andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 1,6 pg/ml.

### B. Specificiteit

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

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D2	70
25OH-Vitamine-D3	0,0004
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	0,0027
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	0,007

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

### C. Precisie

#### PRECISIE BINNEN EEN TEST

#### PRECISIE TUSSEN TESTEN

Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	VC (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	VC (%)
A	20	24.5 ± 2.3	9.3	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	77.3 ± 3.5	4.5	B	10	33.4 ± 3.6	11.3

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

### D. Nauwkeurigheid

#### VERDUNNINGSTEST

Monster	Verdunning	Theoretische concentratie (pg/ml)	Concentratie die bepaald werd (pg/ml)
	1/1	-	70.0
	1/2	35.0	35.7
	1/4	17.5	14.5
	1/8	8.8	7.8
	1/16	4.4	4.6

Monsters werden verdund met de Elutieoplossing

RECOVERY-TEST

Monster	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml) toegevoegd	Recovery van 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml)	Recovery (%)
Serum n°1	25	23.8	95
	50	47.5	95
	100	100.2	100
Serum n°2	25	29.6	118
	50	47.9	96
	100	90.4	90

Conversiefactor :

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

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

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

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

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

XV. REFERENTIE-INTERVALS

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

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

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

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat <sup>125</sup>I (halfwaardetijd: 60 dagen), dat ioniserende X- (28 keV) en  $\gamma$ -stralen (35.5 keV) uitzendt.

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

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

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

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

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel besmettelijk.

Vermijd dat de reagentia (natriumazide als conserveermiddel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens

de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

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

XVII. BIBLIOGRAFIE

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

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL-TELLINGEN (µl)	KALIBRATORS (µl)	MONSTER(S) CONTROLES (µl)
<b>EXTRACTIE</b>			
Kalibrators	-	-	-
Monsters, Controles	-	-	500
Extractiesolvent	-	-	2000
Schudden	1 uur aan 1200 rpm		
Centrifugatie	5 minuten aan 800 g		
<b>SCHEIDING</b>			
Supernatant van extractiefase	-	-	1600
<b>PATROON</b>			
Supernatant		1600 µl	
Wassolvent		1000 µl	
Dichloromethaan		300 µl	
Gedestilleerd water		300 µl	
Centrifugatie		5 minuten aan 800 g	
Elutieoplossing		400 µl	
Centrifugatie		5 minuten aan 800 g	
		<b>Vortex</b>	
<b>INCUBATIE</b>			
Kalibratoren	-	200	-
Geëxtraheerde stalen	-	-	200
Tracer	500	500	500
Incubatie	overnacht bij kamertemperatuur		
Scheiding	-	opzuigen (of decanteren)	
Werk-wasoplossing	-	2,0 ml	
Scheiding	-	opzuigen (of -decanteren)	
Werk-wasoplossing	-	2,0 ml	
Scheiding	-	opzuigen (of -decanteren)	
Telling	Tel buisjes gedurende 60 seconden		

DIAsource catalogusnummer: KIP1929	Bijsluiternummer: 1700602/nl	Revisienummer: 110217/1
---------------------------------------	---------------------------------	----------------------------



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. INSTRUCCIONES DE USO

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

## II. INFORMACIÓN GENERAL

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

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.90

## III. INFORMACIÓN CLÍNICA

### A. Actividades biológicas

La vitamina D<sub>3</sub> es principalmente sintetizada en la piel de 7- dehidrocolesterol y es parcialmente de origen dietético. En el hígado, la vitamina D<sub>3</sub> es hidroxilada sobre el carbono 25 para producir el intermediario necesario 25-OH-D<sub>3</sub>. La 25-OH-D<sub>3</sub> se debe metabolizar más antes de que pueda efectuar las funciones de la Vitamina D en el intestino, el riñón y el hueso. Esta reacción se efectúa solamente en el riñón de un mamífero no embarazado. Así la 25-OH-D<sub>3</sub> es hidroxilada más en la posición 1 $\alpha$  para producir la 1 $\alpha$ ,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

Además del tejido renal, la placenta de mujeres embarazadas y las células macrofagas en caso de sarcoidosis también pueden producir una cantidad de 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. La 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es la forma activa de la Vitamina D en relación con las funciones conocidas, mientras que la 25-OH-D<sub>3</sub> y la Vitamina D<sub>3</sub> misma pueden ser excluidas como factores fisiológicamente funcionales. Visto que la 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es producida en el riñón y tiene unas funciones en el hueso y en el intestino, debe ser considerada como una hormona. Esta hormona estimula la absorción intestinal del calcio y del fósforo. Estimula también la resorción y la mineralización óseas y evita así el desarrollo del raquitismo y de la osteomalacia.

La 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> también puede ser activa en otros tejidos responsables del transporte del calcio (placenta, riñón, glándula mamaria, ...) y en glándulas endocrinas como las glándulas paratiroides. La 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es metabolizada rápidamente y la duración de su vida en plasma es aproximadamente 2-4 h. Su metabolito principal es el ácido calcitroico, un derivado carboxílico con 23 C sin actividad biológica particular. Además de esta vía, la 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> experimenta una 24-hidroxilación para producir la 1,24,25-trihidroxivitamina D<sub>3</sub>. Este componente tiene menos actividad biológica que su antecesor y su metabolismo es considerado como una vía inferior.

Los niveles de la 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en plasma o en suero son 100 a 1000 menos que los de la 25-OH-D<sub>3</sub>. Debido a sus concentraciones bajas y a la presencia de muchos metabolitos similares, la medición de la 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> necesita extracción y separación por HPLC o por cromatografía en columna.


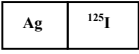
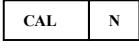
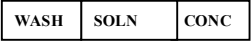
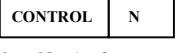
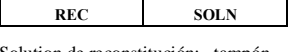
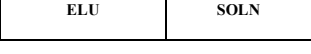
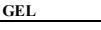
### B. Aplicaciones clínicas

La medición de la 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> es indicada con unas enfermedades que afectan el metabolismo de calcio como : sarcoidosis, deficiencia renal, hiper y hipo-paratiroidismo, raquitismo, hipercalcemia asociada con un tumor, disfunción resistente a la vitamina y tratamiento con medicación anti-convulsiva.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Solamente las muestras y los controles, no los calibradores, son extraídos con una mezcla de solventes y aplicados a los cartuchos para separar la  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamina-D de otros metabolitos de Vitamina-D. Después de la elución de las muestras y de los controles, los calibradores, las muestras y los controles son incubados en tubos recubiertos. Una cantidad fija de  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D marcada con  $^{125}\text{I}$  compete con el  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Después de una noche de incubación a temperatura ambiente, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 48 test	Código de Color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D	1 x 48	Verde	Listo para uso
 TRAZADOR: $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D marcado con $^{125}\text{I}$ (grado HPLC) en tampón fosfato con caseína bovina y gentamicina	1 vial liofilizados 75 kBq	Rojo	Añadir 26 ml de solución de reconstitución
 Calibradores $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en tampón fosfato con caseína bovina y gentamicina	5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 2 ml de Solución de elución
 Solución de lavado ( TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
 Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y gentamicina	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 2 ml de agua destilada
 Solución de reconstitución: tampón fosfato con caseína bovina y azida (<0,1%)	1 vial 30 ml	Negro	Listo para uso
 Solución de elución: tampón fosfato con caseína bovina, metanol y azida (<0,1%)	1 vial 30 ml	Verde	Listo para uso
 Cartuchos Bond Elut Silica	20		Guardar a T.A.

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

#### VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

- El material mencionado a continuación es necesario y no esta incluido en el kit
1. Agua destilada
  2. Diisopropiléter. (p.a.)
  3. Ciclohexano. (p.a.)
  4. Acetate de etilo. (p.a.)
  5. Alcohol etílico puro. (p.a.)
  6. Diclorometano. (p.a.)
  7. Pipetas de 200µl, 500µl, 1 ml y 2 ml (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
  8. Tubos de cristal (12 x 75 mm) para la extracción y la elución (cerrados con un tapón para la fase de extracción)
  9. Tubos de cristal (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm), o tubos de polipropileno (falcon 2097), para el lavamiento de los cartuchos.
  10. Vortex

11. Agitador magnético
12. Centrifugador funcionando a 800 g.
13. Agitador de tubos (1200 rpm)
14. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
15. Sistema de aspiración (opcional)
16. Contador de radiaciones gamma para medir  $^{125}\text{I}$  ( mínima eficiencia 70%)

#### VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir calibradores con 2 ml del Solución de elución (**justo antes de la fase de incubación**).
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 2 ml de agua destilada.
- C.  **$^{125}\text{I}$   $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamina.D** : Reconstituir con 26 ml de la solución de reconstitución.
- D. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.
- E. **Solvente de extracción** : 2 ml es necesario para cada muestra o control que debe ser probado. **Prepare una solución fresca** de diisopropiléter, ciclohexano, acetate de etilo, (50, 40, 10 v/v).
- F. **Solvente de lavamiento** : 1 ml es necesario para cada muestra o control que debe ser probado. **Prepare una solución fresca** de diisopropiléter, ciclohexano, acetate de etilo, alcohol etílico puro (50, 40, 10 ,1 v/v).

#### VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

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

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

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

#### X. PROTOCOLO

- A. **Notas de manejo**  
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.  
Agitar municiosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.  
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.  
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

## B. Protocolo

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

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

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

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

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

### III. Fase de incubación :

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores (Utilizar la solución de elución como el calibrador 0), muestras extraídas y controles y dispensar 150 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 0,5 ml de 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D marcado con I<sup>125</sup> en cada tubo, incluyendo los tubos descubiertos a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier barbuja cautiva de las paredes de los tubos.
5. Incubar durante Una noche a T.A.
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
8. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales).
9. Lavar de nuevo con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar.
10. Después del último lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
11. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

## XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente formula:

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

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

## XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN-D	cpm	B/Bo (%)	
Cuentas Totales	51237		
Calibrador	0,0 pg/ml	20425	100,0
	4,7 pg/ml	17833	87,3
	12,2 pg/ml	15921	77,9
	60,4 pg/ml	10602	51,9
	160,0 pg/ml	7150	35,0
	411,0 pg/ml	4587	22,5

## XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

### A. Limite de detección

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

El limite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 1,6 pg/ml.

### B. Especificidad

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

Componente	Reacción-cruzada (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D3	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D2	70
25OH-Vitamina-D3	0,0004
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D3	0,0027
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D3	0,007

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

### C. Precision

#### PRECISION INTRA-ENSAYO

#### PRECISION INTER-ENSAYO

Suero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	24.5 ± 2.3	9.3	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	77.3 ± 3.5	4.5	B	10	33.4 ± 3.6	11.3

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

### D. Exactitud

#### TEST DILUCIÓN

Muestra	Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)
	1/1	-	70.0
	1/2	35.0	35.7
	1/4	17.5	14.5
	1/8	8.8	7.8
	1/16	4.4	4.6

Las muestras fueron diluidas con la Solución de elución.

#### TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml) Añadido	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml) Recuperado	Recuperado (%)
Suero n°1	25	23.8	95
	50	47.5	95
	100	100.2	100
Suero n° 2	25	29.6	118
	50	47.9	96
	100	90.4	90

#### Factor de conversión:

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

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

#### XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

#### XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

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

Población	Alcance (pg/ml)	Medio	SD	n
Temas normales	19.6 – 54.3	35.3	10.6	51

#### XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

##### Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### XVII. BIBLIOGRAFIA

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

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

#### XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

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

DIAsource Catalogo Nr : KIP1929	P.I. Numero : 1700620/es	Revisión nr : 110217/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------



it

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

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro della 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>-Vit.D) in siero o plasma

## II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

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

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:  
Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.90

## III. INFORMAZIONI CLINICHE

### A. Attività biologiche

La vitamina D<sub>3</sub> viene sintetizzata principalmente nella pelle da 7-deidrocolesterolo ed è parzialmente di origine dietetica. Nel fegato la vitamina D<sub>3</sub> subisce una prima idrossilazione sul carbonio 25 per la sintesi del metabolita intermedio 25-OH-D<sub>3</sub>. 25-OH-D<sub>3</sub> deve essere ulteriormente metabolizzata prima che possa svolgere le azioni metaboliche della vitamina D a livello intestinale, renale e osseo. Nei mammiferi non gravidi, questa successiva reazione si sviluppa solamente nei reni. Pertanto, 25-OH-D<sub>3</sub> subisce una seconda idrossilazione in 1 $\alpha$  per sintetizzare 1,25 diidrossivitamina D<sub>3</sub> (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

Oltre al tessuto renale, anche la placenta delle donne gravide e le cellule macrofaghe, in caso di sarcoidosi, possono produrre una certa quantità di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> costituisce la forma attiva della vitamina D in relazione alle funzioni conosciute, anche se la 25-OH-D<sub>3</sub> e la vitamina D<sub>3</sub> prese singolarmente possono essere escluse in termini di funzionalità fisiologica. Inoltre dato che 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> viene sintetizzata nel rene ed esercita parte della propria azione nelle ossa e nell'intestino, deve essere considerata un ormone. Questo ormone stimola l'assorbimento intestinale del calcio e del fosforo. Favorisce anche il riassorbimento e la mineralizzazione ossei, prevenendo dunque lo sviluppo di rachitismo e osteomalacia.

1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> potrebbe essere attiva anche in altri tessuti, per il trasferimento del calcio (placenta, reni, ghiandola mammaria, ...) e ghiandole endocrine quali le ghiandole paratiroidi. 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> viene metabolizzata rapidamente e la sua vita utile è di circa 2-4 h nel plasma. Il suo metabolita principale è l'acido calcitroico, un C-23 derivato carbossilico, essenzialmente senza alcuna attività biologica. Oltre a questo percorso, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> subisce una 24-idrossilazione per sintetizzare 1,24,25-triidrossivitamina D<sub>3</sub>. Questo composto ha una attività biologica inferiore rispetto al genitore e questo metabolismo è considerato come percorso minore.

I livelli di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> nel plasma o nel siero sono da 100 a 1000 volte inferiori a quelli della 25-OH-D<sub>3</sub>. Considerando la sua bassa concentrazione e la presenza di molti metaboliti simili, la misurazione di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> richiede l'estrazione e la separazione tramite HPLC o cromatografia a colonna.


### B. Applicazione clinica

La misurazione di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> circolante è indicata in diverse patologie che interessano il metabolismo del calcio quali: sarcoidosi, insufficienza renale, iper- e ipo-paratiroidismo, rachitismo, ipercalcemia associata a tumori, disfunzione resistente alla vitamina e trattamento con medicinali anticonvulsivi.

#### IV. PRINCIPIO DEL METODO

Utilizzando una miscela di solventi vengono estratti solamente campioni e controlli ma non i calibratori e vengono applicati su cartucce per separare la 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D da altri metaboliti della vitamina D. Dopo l'eluizione di campioni e controlli, i calibratori, i campioni e i controlli vengono incubati in provette rivestite. Una quantità definita di 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D marcata con <sup>125</sup>I compete con il 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Dopo un'incubazione protrattasi per tutta la notte a temperatura ambiente, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

#### V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 48test	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D	1 x 48	verde	Pronte per l'uso
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">Ag</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;"><sup>125</sup>I</div> Marcato: 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D marcato con <sup>125</sup> I (grado HPLC), in tampone fosfato con caseina bovina e gentamicina	1 flacone liofilizzati 75 kBq	rosso	Aggiungere 26 ml di soluzione ricostituente
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CAL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">N</div> Calibratore 1-5 di 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in tampone fosfato con caseina bovina e gentamicina	5 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 2 ml di Soluzione di eluizione
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">WASH</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">SOLN</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">CONC</div> Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flacone 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">CONTROL</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">N</div> Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano e gentamicina	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 2 ml di acqua distillata
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">REC</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">SOLN</div> Soluzione ricostituente: tampone fosfato con caseina bovina e sodio azide (<0,1%)	1 flacone 30 ml	nero	Pronte per l'uso
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">ELU</div> <div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px; margin-left: 10px;">SOLN</div> Soluzione di eluizione: tampone fosfato con caseina bovina, metanolo e sodio azide (<0,1%)	1 flacone 30 ml	verde	Pronte per l'uso
<div style="border: 1px solid black; display: inline-block; padding: 2px;">GEL</div> Cartucce di silice bond elut	20		Conservare a temp.amb.

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

#### VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata.
2. Diisopropilene (p.a.)
3. Cicloesano. (p.a.)
4. Etilacetato. (p.a.)
5. Etanolo assoluto. (p.a.)
6. Diclorometano (p.a.)
7. Pipette per dispensare 200 µl, 500 µl, 1 ml e 2 ml (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
8. Provette in vetro (12 x 75 mm) per l'estrazione e l'eluizione. (chiuso con un tappo per la fase di estrazione)
9. Provette in vetro (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm) o in polipropilene (falcon 2097) per il lavaggio delle cartucce.
10. Agitatore tipo vortex.
11. Agitatore magnetico.

12. Centrifuga funzionante a 800 g.
13. Agitatore rotante (1200 rpm)
14. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
15. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
16. Contatore gamma con finestra per <sup>125</sup>I (efficienza minima 70%)

#### VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratore con 2 ml di Soluzione di eluizione (**appena prima della fase di incubazione**).
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 2 ml di acqua distillata.
- C. I<sup>125</sup> 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D** : Ricostituire con 26 ml di soluzione ricostituente.
- D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.
- E. Solvente di estrazione :** Sono necessari 2 ml per ogni controllo o campione da controllare. **Preparare una soluzione fresca** di diisopropilene, cicloesano, etilacetato, (50, 40, 10 v/v).
- F. Solvente di lavaggio:** Sono necessari 1 ml per ogni controllo o campione da controllare. **Preparare una soluzione fresca** di diisopropilene, cicloesano, etilacetato, etanolo assoluto (50, 40, 10, 1 v/v).

#### VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta; ad eccezione delle cartucce che vanno conservate a temperatura ambiente.
- I calibratori e i controlli sono notevolmente instabili: usarli subito dopo la ricostituzione, congelarli subito in aliquote e conservarli a -20°C per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Utilizzare solvente di estrazione e solvente di lavaggio appena preparati, non conservarli.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

#### IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero o plasma a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Dopo lo scioglimento, i campioni devono essere vortexati e centrifugati.
- Il siero e il plasma (eparina o EDTA) forniscono gli stessi valori

#### X. METODO DEL DOSAGGIO

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

#### B. Metodo del dosaggio

- I. Fase di estrazione: ! Solo per controlli e campioni.**
1. Etichettare le provette di vetro (12x75 mm) per l'estrazione: 2 controlli e 16 campioni al massimo.
2. Aggiungere 0,5 ml di controllo o campione nelle rispettive provette.
3. Dosare 2 ml di solvente di estrazione in ogni provetta.
4. Le provette sono chiuse con un tappo e inserite in un agitatore per 1 ora a 1200 rpm.
5. Centrifugare ciascuna provetta per 5 minuti a temperatura ambiente (a 800 g).
6. Per la fase successiva di separazione sono necessari supernatanti.

## II. Fase di separazione: ! Solo per controlli e campioni

- Etichettare le provette in vetro (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm) o in polipropilene (falcon 2097) per il lavaggio delle cartucce: 2 controlli e 16 campioni al massimo.
- Inserire una cartuccia "Bond Elut" in ogni provetta.
- Applicare sulla cartuccia 1,6 ml di supernatante (2 x 0,8 ml) ottenuto dopo la fase di estrazione.
- Quindi, lavare le cartucce con 1 ml di solvente di lavaggio (vedere preparazione reagente). ! Fare attenzione a non applicare mai il vuoto sulle cartucce, lasciare semplicemente che il solvente scenda per gravità.
- Aggiungere 300 µl di diclorometano su ogni cartuccia, lasciare scendere per gravità.
- Aggiungere 300 µl di acqua distillata su ogni cartuccia.
- Centrifugare ciascuna provetta per 5 minuti a temperatura ambiente (a 800 g).
- Etichettare le provette di vetro (12 x 75 mm) per l'eluizione di 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D. Dopo la centrifugazione, trasferire le cartucce nelle corrispondenti provette di vetro.
- Applicare una soluzione di eluizione di 400 µl su ciascuna cartuccia per eluire 1,25 (OH)<sub>2</sub>-Vitamin D e centrifuga 5 minuti a temperatura ambiente (a 800 g).
- Agitare a vortice** la frazione eluita.

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

## III. Fase di incubazione:

- Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- Agitare brevemente su vortex calibratore (Utilizzare la soluzione di eluizione come il calibratore 0), campioni estratti e controlli. Dispensare 150 µl di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- Dispensare 500 µl di 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D marcato con <sup>125</sup>I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
- Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
- Incubare per tutta la notte a temperatura ambiente
- Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
- Lavare nuovamente tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio e aspirare (o decantare).
- Dopo il secondo lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

## XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

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

- Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
- È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
- Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D
- Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

## XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

Il sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

1,25(OH) <sub>2</sub> VITAMIN-D	cpm	B/Bo (%)
Attività totale	51237	
Calibratore	0,0 pg/ml 4,7 pg/ml 12,2 pg/ml 60,4 pg/ml 160,0 pg/ml 411,0 pg/ml	20425 17833 15921 10602 7150 4587
		100,0 87,3 77,9 51,9 35,0 22,5

## XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

### A. Sensibilità

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 1,6 pg/ml.

### B. Specificità

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

Composto	Cross-Reattività (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D3	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D2	70
25OH-Vitamina D3	0,0004
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D3	0,0027
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D3	0,007

Nota : questa tabella mostra la cross-reattività relativa all'anti 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D

### C. Precisione

#### INTRA SAGGIO

#### INTER SAGGIO

Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	24,5 ± 2,3	9,3	A	10	13,6 ± 1,7	12,7
B	20	77,3 ± 3,5	4,5	B	10	33,4 ± 3,6	11,3

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

### D. Accuratezza

#### TEST DI DILUIZIONE

Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)
	1/1	-	70,0
	1/2	35,0	35,7
	1/4	17,5	14,5
	1/8	8,8	7,8
	1/16	4,4	4,6

I campioni sono stati diluiti con soluzione di eluizione.

#### TEST DI RECUPERO

Campione	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml) aggiunto	1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D (pg/ml) recuperato	Recupero (%)
Siero n°1	25	23,8	95
	50	47,5	95
	100	100,2	100
Siero n°2	25	29,6	118
	50	47,9	96
	100	90,4	90

Fattore di conversione:

Da pg/ml a pmol/l: x 2,4  
Da pmol/l a pg/ml : x 0,42

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

#### XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

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

#### XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

L'intervallo analizzato e basato su percentili da 2,5% a 97,5%.

Popolazione	Intervallo (pg/ml)	Media	SD	n
Oggetti normali	19.6 – 54.3	35.3	10.6	51

#### XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

##### Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene <sup>125</sup>I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e  $\gamma$  (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

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

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

#### XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

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

#### XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale ml	Calibratore ml	Campioni Controlli ml
<b>ESTRAZIONE</b>			
Calibratore	-	-	-
Campioni, controlli	-	-	500
Solvente di estrazione	-	-	2000
Centrifuga di agitazione	1 ore a 1200 rpm 5 minuti a 800 g		
<b>SEPARAZIONE</b>			
Supernatante dalla fase di estrazione	-	-	1600
<b>CARTUCCIA</b>			
Supernatante	1600 $\mu$ l		
Solvente di lavaggio	1000 $\mu$ l		
Diclorometano	300 $\mu$ l		
Acqua distillata	300 $\mu$ l		
Centrifuga	5 minuti a 800 g		
Centrifuga soluzione di eluizione	400 $\mu$ l 5 minuti a 800 g <b>Vortice</b>		
<b>INCUBAZIONE</b>			
Calibratore	-	150	-
Campioni estratti	-	-	150
Marcato	500	500	500
Incubazione	Per tutta la notte a temperatura ambiente		
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio	-	2 ml	
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio	-	2 ml	
Separazione	-	aspirare (o decantare)	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP1929	P.I. numero : 1700620/it	Revisione numero : 110217/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione : 2011-02-17

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

## II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

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

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:  
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.90

## III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

### A. Βιολογική δράση

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

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

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

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


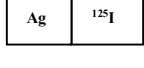
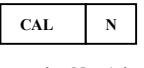
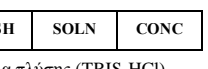
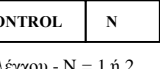
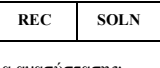
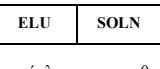
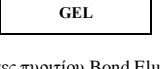
### B. Κλινική εφαρμογή

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

#### IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

#### V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 48 προσδιορισμών	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση
 Σωληνάρια επιστρομένα με αντι 1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη D	1 x 48	πράσινο	Έτοιμο για χρήση
 ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: 1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη D σημασμένη με <sup>125</sup> Iωδίνη (τύπου HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη και γενταμικίνη.	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο 75 kBq	κόκκινο	Προσθέστε 26 ml διαλύματος ανασύστασης
 Βαθμονομητές - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη και γενταμικίνη	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	κίτρινο	Προσθέστε 2 ml Διάλυμα έκλυσης
 Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
 Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με γενταμικίνη	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	ασημί	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
 Διάλυμα ανασύστασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 30 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
 Διάλυμα έκλυσης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βόεια καζεΐνη, μεθανόλη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 30 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση
 Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut	20		Φύλαξη σε θερμ. δωματίου

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

#### VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Δισοπροπυλικός αιθέρας. (p.a.)
3. Κυκλοεξάνιο. (p.a.)
4. Οξικός αιθυλεστέρας. (p.a.)
5. Αιθανόλη 100% (p.a.)
6. Διχλωρομεθάνιο (p.a.)
7. Πιπέτες για διανομή: 200 μl, 500 μl, 1 ml και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
8. Γυάλινα σωληνάρια (12 x 75 mm) για εκχύλιση και έκλυση. (κλειστά με πόμα για το βήμα της εκχύλισης)
9. Υάλινα σωληνάρια (16 x 100 mm) ή (12 x 120 mm) ή σωληνάρια από πολυπροπυλένιο (falcon 2097) για την πλύση των φυσιγγών.
10. Αναμεικτής στροβιλισμού
11. Μαγνητικός αναδευτήρας
12. Συσκευή φυγοκέντρισης στα 800 g.
13. Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (1200 rpm)
14. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Corning) για πλύση
15. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
16. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της <sup>125</sup>I (ελάχιστη απόδοση 70%).

#### VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές: Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 2 ml Διάλυμα έκλυσης (ακριβώς πριν το βήμα επώασης).
- B. Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2 ml απεσταγμένου νερού.
- Γ. I<sup>125</sup> 1,25(OH)<sub>2</sub>-Βιταμίνη D : Ανασυστήστε με 26 ml διαλύματος ανασύστασης.
- Δ. Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκου απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.
- E. Διαλύτης εκχύλισης: Απαιτείται 2 ml για κάθε ορό ελέγχου ή δείγμα που πρόκειται να υποβληθεί σε προσδιορισμό. **Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα** από δισοπροπυλαιθέρα, κυκλοεξάνη, αιθυλακετικό, (50, 40, 10 v/v).
- ΣΤ. Διαλύτης πλύσης: Απαιτούνται 1 ml για κάθε ορό ελέγχου ή δείγμα που πρόκειται να υποβληθεί σε προσδιορισμό. **Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα** από δισοπροπυλαιθέρα, κυκλοεξάνη, αιθυλακετικό, απόλυτη αλκοόλη (50, 40,10, 1 v/v).

#### VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

#### IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

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

#### X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

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

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

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

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

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

**III. Βήμα επώασης:**

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

**XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ**

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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Κρούσεις (BΒαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Κρούσεις (ΜΜηδενικόβαθμονομητής)}} \times 100$$

3. Με χρήση ημιλογαριθμικού χαρτιού γραφήματος ή χαρτιού γραφήματος logit-log 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B<sub>0</sub>(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 1,25(OH)<sub>2</sub>-Βιταμίνης D για κάθε σημείο βαθμονομητή. Απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
4. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
5. Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B<sub>0</sub>(%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις 1,25(OH)<sub>2</sub>-Βιταμίνης D των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

6. Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης 1,25(OH)<sub>2</sub>-Βιταμίνης D (B<sub>0</sub>/T).

**XII. ΤΥΠΙΚΑ ΑΕΔΟΜΕΝΑ**

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

1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη D	cpm	B/Bo (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη <sup>125</sup> I ("total")	51237	
Βαθμονομητής	0,0 pg/ml 4,7 pg/ml 12,2 pg/ml 60,4 pg/ml 160,0 pg/ml 411,0 pg/ml	20425 17833 15921 10602 7150 4587
		100,0 87,3 77,9 51,9 35,0 22,5

**XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ**

- A. Όριο ανίχνευσης  
Μετρήθηκαν είκοσι μηδενικοί βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.  
Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμωση, ήταν 1,6 pg/ml.

**B. Ειδικότητα**

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

Ένωση	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη.D <sub>3</sub>	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη.D <sub>3</sub>	70
25OH-Βιταμίνη-D <sub>3</sub>	0,0004
24,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη.D <sub>3</sub>	0,0027
25,26(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη.D <sub>3</sub>	0,007

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

**Γ. Ακρίβεια**

AKRIBEIA ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

AKRIBEIA ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	24.5 ± 2.3	9.3	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	77.3 ± 3.5	4.5	B	10	33.4 ± 3.6	11.3

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

**Δ. Ορθότητα**

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Δείγμα	Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (pg/ml)
	1/1	-	70.0
	1/2	35.0	35.7
	1/4	17.5	14.5
	1/8	8.8	7.8
	1/16	4.4	4.6

Το δείγμα αραιώθηκε με διάλυμα έκλυσης.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα 1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη D (pg/ml)	Ανακτηθείσα 1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη D (pg/ml)	Ανακτηθείσα (%)
Ορός n° 1	25	23.8	95
	50	47.5	95
	100	100.2	100
Ορός n° 2	25	29.6	118
	50	47.9	96
	100	90.4	90

#### Συντελεστής μετατροπής:

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

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

#### XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

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

#### XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

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

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

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

#### XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

##### Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το <sup>125</sup>I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

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

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

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

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

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

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

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

#### XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

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

#### XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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

Αρ. καταλόγου DIASource : KIP1929	Αριθμός P.I.: 1700620/e1	Αρ. αναθεώρησης: 110217/1
--------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

ημερομηνία αναθεώρησης: 2011-02-17



pl

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. PRZEZNACZENIE

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

## II. INFORMACJE OGÓLNE

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

**Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:**  
**Tel: +32 (0) 10 84.99.11**                      **Fax: +32 (0) 10 84.99.90**

## III. INFORMACJE KLINICZNE

### A. Aktywność biologiczna

Witamina D<sub>3</sub> jest syntetyzowana głównie w skórze z 7-dehydrocholesterolu, oraz częściowo pochodzi ze składników pokarmowych. W wątrobie, cała witamina D<sub>3</sub> ulega hydroksylacji przy 25 atomie węgla, tworząc 25-OH-D<sub>3</sub>. Związek 25-OH-D<sub>3</sub>, zanim zacznie wykazywać biologiczną aktywność witaminy D w jelicie cienkim, nerkach i kości, musi ulec dalszym przemianom metabolicznym. U ssaków nieciążarnych, takie przemiany zachodzą wyłącznie w nerkach. Witamina 25-OH-D<sub>3</sub> ulega dalszej hydroksylacji w pozycji 1 α, tworząc 1α,25 dihydroksywitaminę D<sub>3</sub> (1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

Oprócz tkanki nerkowej, pewne ilości 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> są wytwarzane w łożyskach kobiet ciężarnych oraz w makrofagach w stanach zapalenia tkanki mięsakowatej (sarcoiditis). Znane funkcje witaminy D<sub>3</sub> odnoszą się do postaci 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, podczas gdy 25-OH-D<sub>3</sub> i sama witamina D<sub>3</sub> nie przejawia istotnej aktywności fizjologicznej. Ponadto, z uwagi na wytwarzanie 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> w nerkach, oraz działanie tego związku w tkance kostnej i jelicie cienkim, należy traktować 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> jako hormon. Ten hormon stymuluje absorpcję jelitową wapnia i fosforu. Stymuluje również resorpcję tkanki kostnej i mineralizację kości, chroniąc w ten sposób przed krzywicą i osteomalacją.

Związek 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> może również być aktywny w innych tkankach odpowiedzialnych za transport wapnia (łożysko, nerki, gruczoł sutkowy,...), oraz w gruczołach endokrynowych, takich jak przytarczyce. 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ulega szybkiemu metabolizmowi a czas trwania w osoczu wynosi około 2 – 4 godziny. Jego głównym metabolitem jest kwas kalcetriolowy, 23-węglowa pochodna, która nie przejawia żadnej aktywności biologicznej. Oprócz tej drogi metabolicznej, 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> podlega hydroksylacji w pozycji 24 tworząc 1,24,25-trihydroksy-witaminę D<sub>3</sub>. Ten składnik przejawia mniejszą aktywność biologiczną niż jego prekursor, a ten szlak metaboliczny odgrywa mniejsze znaczenie.

Poziomy 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> w osoczu lub w surowicy wynoszą od 100 do 1000 i są niższe od poziomów 25-OH-D<sub>3</sub>. Ze względu na niskie stężenia i obecność wielu podobnych metabolitów, pomiar 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wymaga ekstrakcji i separacji albo za pomocą HPLC, albo chromatografii kolumnowej.


### B. Zastosowania kliniczne

Pomiar krążącej 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> jest wskazany w zaburzeniach metabolizmu wapnia, takich jak: sarkoidoza, niewydolność nerek, nadczynność i niedoczynność przytarczyc, krzywica, hiperkalcemia paranowotworowa, oporność na witaminę oraz leczenie środkami przeciwdrgawkowymi.

#### IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Ekstrahowane za pomocą mieszaniny rozpuszczalników są wyłącznie próbki i kontrole, a nie kalibratory. Ekstrahowane substancje są umieszczane w pojemnikach w celu oddzielenia 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminy D<sub>3</sub> od innych metabolitów witaminy D. Po elucji próbek i kontroli, kalibratory, próbki i kontrole są inkubowane w opłaszczonych probówkach. Stała ilość 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminy D znakowanej 125I współzawodniczy z 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminą D obecną w badanej próbce lub w kalibratorze o stałą ilość miejsc na przeciwciałach, unieruchomionych na ściankach probówki polistyrenowej. Po całonocnej inkubacji w temperaturze pokojowej, wykonanie aspiracji przerywa reakcję kompetycyjną. Następnie próbki są płukane za pomocą roztworu do płukania i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminy D są określane na podstawie odniesienia dawki z krzywej kalibracyjnej.

#### V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

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

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

#### VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

1. Woda destylowana
2. Dwuizopropyloter. (p.a.)
3. Cykloheksan. (p.a.)
4. Octan etylu. (p.a.)
5. Etanol absolutny. (p.a.)
6. Dwuchlorometan. (p.a.)
7. Pipety do dozowania: 200 µl, 500 µl, 1 ml i 2 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi).
8. Probówki szklane (12 x 75 mm) do ekstrakcji i elucji. (zamknięte korkiem do etapu ekstrakcji).
9. Probówki szklane (16 x 100 mm) lub (12 x 120 mm), lub probówki polipropylenowe (falcon 2097), do płukania pojemników.

10. Mieszkadło wirowe
11. Mieszkadło magnetyczne
12. Wirówka 800 g.
13. Wytrząsarka probówek (1200 rpm)
14. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
15. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
16. Może być wykorzystywany jakkolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru <sup>125</sup>I (minimalny uzysk 70%)

#### VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

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

#### VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

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

#### IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

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

#### X. PROCEDURA

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

- B. Procedura**
  - I. Ekstrakcja: ! Dotyczy wyłącznie kontroli i próbek.**
    1. Oznaczyć szklane probówki (12 x 75 mm) do ekstrakcji: 2 kontrole i do 16 próbek.
    2. Dodać 0,5 ml kontroli lub próbki do odpowiedniej probówki.
    3. Dodać do każdej probówki 2 ml rozpuszczalnika do ekstrakcji.

4. Probówki są zamykane korkiem i umieszczane w wytrząsarce na 1 godzinę przy 1200 obr/min.
5. Wirować każdą probówkę przez 5 minut w temperaturze pokojowej (przy 800 g).
6. Supernatanty są potrzebne do dalszych etapów separacji.

## II. Separacja: ! Dotyczy wyłącznie kontroli i próbek.

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

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

## III. Inkubacja :

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone probówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe probówki.
2. Od razu wymieszać (na worteksie) kalibratory (jako kalibrator zerowy wykorzystać roztwór do elucji), ekstrahowane kontrole i próbki oraz dodać po 150 µl do odpowiednich probówek.
3. Do każdej probówki, w tym do probówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczenia, dodać po 500 µl 1,25(OH)<sub>2</sub>-witamina D oznakowanego jodem<sup>125</sup>.
4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwieczonych pęcherzyków powietrza.
5. Inkubować przez jedną noc w temperaturze pokojowej.
6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczenia). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej probówki.
7. Przepłukać probówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczenia) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
8. Aspirować (lub osuszyć) zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczenia).
9. Ponownie przepłukać próbki za pomocą 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczenia) a następnie aspirować (lub osuszyć).
10. Po ostatnim płukaniu, pozostawić probówki odwrócone przez 2 minuty a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
11. Zliczać probówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

## XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

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

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

3. Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B<sub>0</sub>(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia 1,25(OH)<sub>2</sub>-witamina D każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
4. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości (B/B<sub>0</sub>(%)) próbki należy określić stężenia 1,25(OH)<sub>2</sub>-witamina D w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego 1,25(OH)<sub>2</sub>-witamina D (B<sub>0</sub>/T).

## XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

1,25(OH) <sub>2</sub> -witamina D	cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite	51237	
Kalibrator	0,0 pg/ml 4,7 pg/ml 12,2 pg/ml 60,4 pg/ml 160,0 pg/ml 411,0 pg/ml	20425 17833 15921 10602 7150 4587
		100,0 87,3 77,9 51,9 35,0 22,5

## XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

### A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyłek standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 1,6 pg/ml.

### B. Swoistość

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

Związek	Reaktywność krzyżowa (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -witamina D3	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -witamina D2	70
25OH-witamina D3	0,0004
24,25(OH) <sub>2</sub> -witamina D3	0,0027
25,26(OH) <sub>2</sub> -witamina D3	0,007

**Nota:** w tej tabeli przedstawiono reaktywność krzyżową dla przeciwciał anti-1,25(OH)<sub>2</sub>-witamina D

### C. Precyzja

#### PRECYZJA W SERII

#### PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Surowica	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	24.5 ± 2.3	9.3	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	77.3 ± 3.5	4.5	B	10	33.4 ± 3.6	11.3

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

### D. Dokładność

#### BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Próbka	Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (pg/ml)	Stęż. zmierzone (pg/ml)
	1/1	-	70.0
	1/2	35.0	35.7
	1/4	17.5	14.5
	1/8	8.8	7.8
	1/16	4.4	4.6

Próbka została rozcieńczona za pomocą roztworu do elucji.

#### BADANIE ODZYSKU

Próbka	Dodano 1,25(OH) <sub>2</sub> -witamina D (pg/ml)	Odzyskany 1,25(OH) <sub>2</sub> -witamina D (pg/ml)	Odzysk (%)
Surowica 1	25	23.8	95
	50	47.5	95
	100	100.2	100
Surowica 2	25	29.6	118
	50	47.9	96
	100	90.4	90

#### Współczynnik konwersji :

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

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

#### XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

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

#### XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

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

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

Populacja	Zakres (pg/ml)	Średnia	SD	n
Zdrowi osobnicy	19.6 – 54.3	35.3	10.6	51

#### XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

##### Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

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

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

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

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

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

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

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

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

#### XVII. BIBLIOGRAFIA

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

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

#### XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

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

Nr katalogowy DIAsource KIP1929	Numer P.I. 1700620/pl	Nr aktualizacji : 110217/1
------------------------------------	--------------------------	-------------------------------

Data wydania : 2011-02-17

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

# 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT

## I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

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

## II. INFORMAÇÕES GERAIS

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

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica , contacte :  
Bélgica Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.90  
Ou o representante local

## III. SIGNIFICADO CLÍNICO

### A. Actividades Biológicas

A Vitamina D<sub>3</sub> é maioritariamente sintetizada na pele a partir do 7-dehidrocolesterol e é obtida parcialmente através da dieta. No fígado, a Vitamina D<sub>3</sub> é hidroxilada em carbono 25 para produzir o seu intermediário obrigatório, o 25-OH-D<sub>3</sub>. O 25-OH-D<sub>3</sub> tem de ser posteriormente metabolizado antes de poder desempenhar qualquer uma das funções da Vitamina D no intestino, rim e ossos. Esta reacção subsequente acontece apenas no rim nos mamíferos não-grávidos. Deste modo o 25-OH-D<sub>3</sub> é novamente hidroxilado na posição 1 $\alpha$ - para produzir a dihidroxivitamina D<sub>3</sub> 1 $\alpha$ , 25 (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>).

Para além do tecido renal, a placenta das mulheres grávidas e as células dos macrófagos, em caso de sarcoidose, podem também produzir alguma quantidade de 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. A 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é a forma activa da Vitamina D, tendo em conta as suas funções conhecidas, ao passo que a 25-OH-D<sub>3</sub> e a própria Vitamina D<sub>3</sub> podem ser excluídas como sendo fisiologicamente funcionais. Para além disto, uma vez que a 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é produzida no rim e desempenha algumas das suas funções no osso e intestino, esta terá de ser considerada como uma hormona. Esta hormona estimula a absorção intestinal de ambos, cálcio e fósforo. Além disso, estimula a reabsorção e mineralização ósseas, prevenindo deste modo o desenvolvimento de raquitismo e de osteomalácia.

A 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> também poderá actuar noutros tecidos responsáveis pelo transporte de cálcio (placenta, rim, glândula mamária, ...) e noutras glândulas endócrinas com as glândulas paratiróideas. A 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> é rapidamente metabolizada e o seu tempo de vida é de aproximadamente 2-4 h no plasma. O principal metabolito a que dá origem é o ácido calcitrico, um derivado carboxílico do C-23, sem qualquer tipo de actividade biológica. Para além deste percurso, a 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> passa por 24 hidroxilações para produzir a 1,24,25-trihidróxi-Vitamina D<sub>3</sub>. Este composto tem menos actividade biológica do que aquele que lhe deu origem e o seu metabolismo é considerado como uma via acessória

Os níveis de 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> no plasma ou no soro são entre 100 a 1000 vezes menores do que os de 25-OH-D<sub>3</sub>. Devido às suas baixas concentrações e à presença de muitos metabolitos semelhantes, as análises da 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> requerem a sua extracção e separação feita por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC) ou por cromatografia de coluna.

### B. Aplicação clínica

A medição da 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> circulante está indicada em diversas doenças que afectam o metabolismo do cálcio, tais como: sarcoidose, falência renal, hiper e hipoparatiroidismo, raquitismo, hipercalcemia associada a tumor, disfunção vitamino-resistente e tratamento com medicação anticonvulsivante.

#### IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

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

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

#### V. REAGENTES FORNECIDOS

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

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

#### VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

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

1. Água destilada
2. Diisopropiléter. (p.a.)
3. Ciclohexano. (p.a.)
4. Acetato de etilo. (p.a.)
5. Etanol absoluto. (p.a.)
6. Diclorometano (p.a.)
7. Pipetas automáticas: 200  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 1 ml e 2 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
8. Tubos de vidro (12 x 75 mm) para proceder à extracção e eluição (fechados com uma tampa durante o processo de extracção).
9. Tubos de vidro (16 x 100 mm) ou (12 x 120 mm), ou tubos em polipropileno (falcon 2097), para a lavagem dos cartuchos.

10. Misturador de vórtice
11. Agitador magnético
12. Centrifugadora a 800 g
13. Agitador de tubos (1200 rpm)
14. Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
15. Sistema de aspiração (opcional)
16. Qualquer contador de raios gama capaz de medir  $^{125}\text{I}$  pode ser utilizado (alcance mínimo de 70%).

#### VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

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

#### VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

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

#### IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

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

#### X. PROCEDIMENTO

##### A. Notas de manipulação

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

##### B. Procedimento

##### 1. Procedimento de extracção: ! Apenas para controlos e amostras.

1. Tubos de vidro graduados (12x75 mm) para proceder à extracção de 2 controlos e de, até, 16 amostras.
2. Adicione 0.5 ml de controlo ou de amostra nos tubos respectivos.
3. Verta 2 ml do solvente de extracção em cada tubo.
4. Encerre os tubos com uma tampa e coloque-os no misturador durante uma hora a 1200 rpm.
5. Proceda à centrifugação de cada tubo durante 5 minutos à temperatura ambiente (a 800 g).

6. Os sobrenadantes serão utilizados durante o próximo passo, o procedimento de separação.

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

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

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

## III. Procedimento de Incubação:

1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra, controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
2. Agite ligeiramente no vórtice calibradores (Utilize a solução de eluição como o Calibrador 0), amostras extraídas e controlos e verta 150µl de cada, para os tubos respectivos.
3. Verta 0,5 ml de Vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub> marcado com I<sup>125</sup> para cada tubo, incluindo os tubos normais para as contagens totais.
4. Agite suavemente o suporte dos tubos, para libertar possíveis bolhas de ar.
5. Proceda à sua incubação de um dia para o outro (Overnight) à temperatura ambiente
6. Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais). Certifique-se que a ponta de plástico do aspirador atinge o fundo do tubo revestido, para remoção de todo o líquido.
7. Lave os tubos com 2 ml de Solução de Lavagem de Trabalho (excepto as contagens totais). Evite a formação de espuma durante a adição de Solução de Lavagem de Trabalho
8. Aspire (ou decante) o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais).
9. Lave novamente os tubos com 2 ml da Solução de Lavagem de Trabalho (excepto as contagens totais) e aspire (ou decante).
10. Após a última lavagem deixe os tubos na posição vertical durante 2 minutos e aspire até à última gota de líquido.
11. Conte os tubos num contador de radiação gama durante 60 segundos.

## XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

3. Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log trace os valores (B/B<sub>0</sub>(%)) para cada ponto de calibração como uma função da concentração do Vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub> em cada ponto, rejeitando os "outliers" (casos aberrantes) óbvios.
4. Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibração. Se o processamento dos resultados for automático, recomenda-se a utilização de uma função logística de 4 parâmetros para a construção da curva.
5. Por interpolação dos valores das amostras (B/B<sub>0</sub>(%)), determine as concentrações de Vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub> das amostras da curva de referência.
6. Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de Vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub> (B<sub>0</sub>/T) marcado, deve ser verificada.

## XII. DADOS TÍPICOS

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

Vitamina D 1,25(OH) <sub>2</sub> -RIA-CT	cpm	B/B <sub>0</sub> (%)
Contagens total	51237	
Calibrador	0,0 pg/ml	100,0
	4,7 pg/ml	87,3
	12,2 pg/ml	77,9
	60,4 pg/ml	51,9
	160,0 pg/ml	35,0
	411,0 pg/ml	22,5

## XIII. DESEMPENHO E LIMITES

### A. Limite de detecção

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

O limite de detecção, definido como a concentração aparente, 2 DP abaixo das contagens médias com zero ligações, foi de 1,6 pg/ml.

### B. Especificidade

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

Composto	Reactividade Cruzada (%)
Vitamina D3 1,25(OH) <sub>2</sub>	100
Vitamina D2 1,25(OH) <sub>2</sub>	70
Vitamina D3 25OH.	0,0004
Vitamina D3 24,25(OH) <sub>2</sub>	0,0027
Vitamina D3 25,26(OH) <sub>2</sub>	0,007

**Nota:** esta tabela mostra a reactividade cruzada da anti Vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub>

### C. Precisão

#### PRECISÃO INTRA-ENSAIO

#### PRECISÃO INTER-ENSAIO

Soro	N	<X> ± DP (pg/ml)	CV (%)	Soro	N	<X> ± DP (pg/ml)	CV (%)
A	20	24.5 ± 2.3	9.3	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	77.3 ± 3.5	4.5	B	10	33.4 ± 3.6	11.3

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

### D. Exactidão

#### TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Conc. teórico (pg/ml)	Conc. medida (pg/ml)
	1/1	-	70.0
	1/2	35.0	35.7
	1/4	17.5	14.5
	1/8	8.8	7.8
	1/16	4.4	4.6

As amostras foram diluídas com Solução de Eluição.

#### TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	Vitamina D 1,25(OH) <sub>2</sub> adicionada (pg/ml)	Vitamina D 1,25(OH) <sub>2</sub> recuperada (pg/ml)	Recuperação (%)
Soro n°1	25	23.8	95
	50	47.5	95
	100	100.2	100
Soro n°2	25	29.6	118
	50	47.9	96
	100	90.4	90

**Factor de conversão:**

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

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

#### XIV. CONTROLO DE QUALIDADE INTERNO

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

#### XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

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

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

População	Intervalo (pg/ml)	MÉDIA	SD	n
Assuntos normais	19.6 – 54.3	35.3	10.6	51

#### XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

##### Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém <sup>125</sup>I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizantes. Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrado a seres humanos ou a animais.

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

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

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

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

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

#### XVII. BIBLIOGRAFIA

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








5. Deluca H.F. (1979). **The Vitamin D system in the regulation of calcium and phosphorus metabolism.** Nutritional Rev., 37:161-193
6. Haussler, M.R., McCain, T.A. (1977). **Basic and clinical concepts related to Vitamin D metabolism and action.** N. Engl. J. Med., 297:974-983

#### XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

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

Nº do catálogo DIAsource : KIP1929	Nº de P.I.: 1700620/pt	Nº de revisão: 110217/1
---------------------------------------	---------------------------	----------------------------

Data da revisão: 2011-02-17

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

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

	<b><u>Gebrauchte Symbolen</u></b>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
<b>LOT</b>	Chargenbezeichnung
<b>REF</b>	Bestellnummer
<b>CONTROL</b>	Kontrolle
<b>I V D</b>	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
<b>U U</b>	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer

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

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

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

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

	<b><u>Símbolos utilizados</u></b>
	Consulte instruções de utilização
	Temperatura de conservação
	Utilizar antes de
<b>LOT</b>	Código de lote
<b>REF</b>	Número de catálogo
<b>CONTROL</b>	Controlo
<b>I V D</b>	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
WASH SOLN CONC	Solução de lavagem concentrada
CAL 0	Calibrador zero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Controlo #
Ag 125I	Marcador
Ab 125I	Marcador
Ag 125I CONC	Marcador concentrada
Ab 125I CONC	Marcador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampão de incubação
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Soro
DIL SPE	Diluidor de espécimes
DIL BUF	Tampão de diluição
ANTISERUM	Anti-soro
IMMUNOADSORBENT	Imunoadsorvente
DIL CAL	Diluinte do calibrador
REC SOLN	Solução de Reconstituição
PEG	Poliétileno-glicol
EXTR SOLN	Solução de Extração
ELU SOLN	Solução de Eluição
GEL	Cartuchos de sílica Bond Elut
PRE SOLN	Solução de pré-tratamento
NEUTR SOLN	Solução de neutralização
TRACEUR BUF	Tampão Marcador
<b>TLT</b>	Placa de micro titulação
Ab HRP	HRP Conjugação
Ag HRP	HRP Conjugação
Ab HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
CONJ BUF	Conjuge o tampão
CHROM TMB CONC	Cromogénica TMB concentrada
CHROM TMB	Solução Cromogénica TMB
SUB BUF	Tampão de substrato
STOP SOLN	Solução de Paragem
INC SER	Soro de incubação
BUF	Tampão
Ab AP	AP Conjugação
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado HRP de avidina
ASS BUF	Tampão de ensaio
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticorpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina HRP concentrado
NSB	Ligações não específicas
2nd Ab	Anticorpo secundário
ACID BUF	Tampão de acidificação

	<b><u>Stosowane symbole</u></b>
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
	Temperatura przechowywania
	Zużyć przed
<b>LOT</b>	Kod serii
<b>REF</b>	Numer katalogowy
<b>CONTROL</b>	Kontrola
<b>I V D</b>	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
	Producent
	Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH SOLN CONC	Roztwór płuczący stężony
CAL 0	Kalibrator zerowy
CAL N	Kalibrator nr
CONTROL N	Kontrola nr
Ag 125I	Znacznik izotopowy
Ab 125I	Znacznik izotopowy
Ag 125I CONC	Znacznik izotopowy stężony
Ab 125I CONC	Znacznik izotopowy stężony
	Probówki
INC BUF	Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE	Acetonitryl
SERUM	Surowica
DIL SPE	Rozcieńczalnik próbki
DIL BUF	Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM	Antysurowica
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Rozcieńczalnik kalibratora
REC SOLN	Roztwór do rozcieńczania
PEG	Glikol poli(oksy)etylenowy
EXTR SOLN	Roztwór ekstrakcyjny
ELU SOLN	Roztwór elucyjny
GEL	Kolumny krzemionkowe Bond Elut
PRE SOLN	Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR SOLN	Roztwór neutralizujący
TRACEUR BUF	Bufor znacznika
<b>TUF</b>	mikropłytki
Ab HRP	Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag HRP	Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab HRP CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag HRP CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ BUF	Bufor do koniugacji
CHROM TMB CONC	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)
CHROM TMB	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzodyny)
SUB BUF	Bufor substratu
STOP SOLN	Roztwór zatrzymujący reakcję
INC SER	Wymagana inkubacja surowicy
BUF	Bufor
Ab AP	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB PNPP	p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT CONJ CONC	Koncentrat koniugatu biotyny
AVID HRP CONC	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS BUF	Bufor do oznaczania
Ab BIOT	Koniugatu biotyny
Ab	Przeciwciało swoiste
SAV HRP CONC	Koncentrat streptawidyny HRP
NSB	Wiązanie nieswoiste
2nd Ab	Drugie przeciwciało
ACID BUF	Bufor zakwaszający