



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

*KIP1929*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b>
<b>230123</b>
New logo



en

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 84.99.91

## 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  $1,25(\text{OH})_2$  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  $^{125}\text{I}$  labelled  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin D competes with the  $1,25(\text{OH})_2$  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 18-25°C, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with washing solution and aspirated. A calibration curve is plotted and the  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin D concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	48 Test Kit	Reconstitution
Tubes coated with anti $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D	1 x 48	<b>Ready</b> for use
Ag <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><math>^{125}\text{I}</math></span> TRACER: $^{125}\text{I}$ odine labelled $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D (HPLC grade) in phosphate buffer with bovine casein and gentamycin.	1 vial lyophilised 75 kBq	<b>Add</b> 26 ml reconstitution solution
CAL N  Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in phosphate buffer with bovine casein and gentamycin	5 vials lyophilised	<b>Add</b> 2 ml elution solution
WASH SOLN CONC  Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	<b>Dilute</b> 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N  Controls - N = 1 or 2 in human plasma with gentamycin	2 vials lyophilised	<b>Add</b> 2 ml distilled water
REC SOLN  Reconstitution Solution: phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%)	1 vial 30 ml	<b>Ready</b> for use
ELU SOLN  Elution Solution: phosphate buffer with bovine casein, methanol and azide (<0.1%)	1 vial 30 ml	<b>Ready</b> for use
GEL  Bond Elut Silica cartridges	20	<b>Store</b> 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:

- 1 Distilled water
- 2 Diisopropylether (p.a.)
- 3 Cyclohexane (p.a.)
- 4 Ethyl acetate (p.a.)
- 5 Ethanol absolute (p.a.)
- 6 Dichloromethane (p.a.)

**NB : A DIAsource extraction kit containing all these solvents is available under the reference #3019700. This kit contains quantities of solvents necessary to extract the controls and samples, for 5 kits of  $1,25(\text{OH})_2$ -VIT.D-RIA-CT, in duplicate measurements.**

- 7 Pipettes for delivery of: 200 µl, 500 µl, 1 ml and 2 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- 8 Glass tubes (12 x 75 mm) for extraction and for elution. (closed with a cap for the extraction step)
- 9 Glass tubes (16 x 100 mm) or (12 x 120 mm), or polypropylene tubes (falcon 2097), for the washing of the cartridges.
- 10 Vortex mixer
- 11 Magnetic stirrer
- 12 Centrifuge operating at 800 g.
- 13 Tube shaker (1200 rpm)
- 14 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- 15 Aspiration system (optional)
- 16 Any gamma counter capable of measuring  $^{125}\text{I}$  may be used (minimal yield 70%).

#### VII. REAGENT PREPARATION

- A **Calibrators**: Reconstitute the calibrators with 2 ml elution solution (**just before the incubation step**).
- B **Controls**: Reconstitute the controls with 2 ml distilled water.
- C  **$^{125}\text{I}$ - $1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin.D** : Reconstitute with 26 ml of reconstitution solution.
- D **Working Wash solution**: Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.
- E **Extraction solvent**: 2 ml for each control or sample to be tested are needed. **Prepare a fresh solution** of diisopropylether, cyclohexane and ethyl acetate: 50/40/10 volume/volume) according to the number of extractions, as indicated in the table below.  
**Be careful : the exact proportion of each solvents has to be strictly respected.**

Nb of extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\*Patient samples and controls

- F **Washing solvent** : 1 ml for each control or sample to be tested is needed. **Prepare a fresh solution** of diisopropylether, cyclohexane, ethyl acetate and ethanol absolute (50/40/10/1 volume/volume) according to the number of extractions, as indicated in the table below.  
**Be careful : the exact proportion of each solvents has to be strictly respected.**

Nb of extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)	Ethanol (µl)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

\*Patient samples and controls

#### 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 18-25°C.
- 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**

### **A. Handling notes**

Do not use the kit or components beyond expiry date.

Do not mix materials from different kit lots.

Bring all the reagents to 18-25°C 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.

Attention: Performance of the kit was defined based on samples tested in duplicate, it is thus important to use the kit as recommended in the IFU. For this reason, the amount of cartridges provided in the kit is only sufficient to perform the extraction for a duplicate determination of the patient samples.

### **B. Procedure**

#### **I. Extraction step : ! Only for controls and samples.**

1. Label glass tubes (12x75 mm) for extraction: 2 controls and up to 16 samples.
2. Add 0.5 ml control or sample in the respective tubes.
3. Dispense 2 ml extraction solvent in each tube.
4. Tubes are closed with a cap and placed on a shaker for 1 hour at 1200 rpm.
5. Centrifuge each tube for 5 minutes at 18-25°C (at 800 g).
6. Supernatants are needed for the next step of separation.

#### **II. Separation step : ! Only for controls and samples**

1. 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.
2. Put one "Bond Elut" cartridge in each tube.
3. Apply 1.6 ml of supernatant (2 x 0.8 ml), obtained after extraction step, on cartridge.
4. Then, wash cartridges with 1 ml washing solvent (cfr reagent preparation). ! Be careful never apply vacuum on cartridges, just let solvent draw by gravity.
5. Add 300 µl dichloromethane on each cartridge, let draw by gravity.
6. Add 300 µl of distilled water on each cartridge.
7. Centrifuge each tube for 5 minutes at 18-25°C (at 800 g).
8. 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.
9. Apply 400 µl elution solution on each cartridge to elute 1,25 (OH)<sub>2</sub>-Vitamin D and centrifuge 5 minutes at 18-25°C (at 800 g).
10. 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 :**

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
2. Briefly vortex calibrators (use elution solution as zero calibrator), extracted controls and samples and dispense 150 µl of each into the respective tubes.
3. 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.
4. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
5. Incubate overnight at 18-25°C
6. 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.
7. 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.
8. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts).
9. Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant).
10. After the last washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
11. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

## **XI. CALCULATION OF RESULTS**

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

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

3. 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.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B<sub>0</sub> (%)) values, determine the 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D concentrations of the samples from the calibration curve.
6. 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/B <sub>0</sub> (%)
Total count	43937	
Calibrator		
0.0 pg/ml	16687	100.0
6.0 pg/ml	15268	91.5
20.0 pg/ml	12345	74.0
63.0 pg/ml	8033	48.1
230.0 pg/ml	3554	21.3
430.0 pg/ml	2148	12.9

## **XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS**

### **A. Detection limit**

The LOB (Limit of Blank) was calculated by measuring the blank several times and was calculated as the mean - 1.65 standard deviations of the distribution of the best values. The LOB was calculated to be 0.55 pg/ml. The LOD (limit of detection) was calculated as the LOB - 1.645 standard deviations of a low concentration sample tested in 10 different run. The LOD was calculated to be 2.88 pg/ml.

The LOQ (Limit of Quantitation) was calculated by testing 5 samples of low values 10 times. The LOQ was calculated to be 8.5 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	92.31
25OH-Vitamin-D3	0.001
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D3	0.005
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamin.D3	0.20

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

The assay performance is not affected by hemolysis (5 g/L hemoglobin tested), bilirubinemia (1 g/L bilirubin tested) or triglycerides (2.5 g/L tested). Ascorbic acid (Vitamin C) (1 g/L tested) and bilirubin conjugate (1g/L tested) don't interfere with this assay.

### **C. Precision**

#### INTRA-ASSAY PRECISION

#### INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	$\text{X} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	$\text{X} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	37.9 ± 2.6	6.8	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	98.2 ± 7.3	7.4	B	10	32.3 ± 3.6	11.3

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

## D. Accuracy

### DILUTION TEST

Sample dilution	Theoretical concen. (pg/ml)	Measured concen. (pg/ml)	Recovery (%)
1/1	70.0	70.0	100%
1/2	35.0	35.7	102%
1/4	17.5	14.5	83%
1/8	8.8	7.8	89%
1/16	4.4	4.6	105%

The sample was diluted with Elution solution.

### RECOVERY TEST

Added 1,25(OH)2-Vit.D (pg/ml)	Measured 1,25(OH)2 Vit.D concentrations		Recovery (%)
	Total (pg/ml)	Blanked (pg/ml)	
0.0	22.5		
25.0	46.3	23.8	95.2%
50.0	70.0	47.5	95.0%
100.0	122.7	100.2	100.2%

  

Added 1,25(OH)2-Vit.D (pg/ml)	Measured 1,25(OH)2 Vit.D concentrations		Recovery (%)
	Total (pg/ml)	Blanked (pg/ml)	
0.0	22.5		
25.0	52.1	29.6	118.4%
50.0	70.4	47.9	95.8%
100.0	112.9	90.4	90.4%

#### 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  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (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

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. 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 18-25°C		
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.		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



fr

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 84.99.91

## 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 1α pour produire la 1α,25 dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (1α, 25-(OH)D<sub>3</sub>). En plus du tissu rénal, le placenta des femmes enceintes et les cellules de macrophage en cas de sarcoïdes peuvent également produire une certaine quantité de 1α, 25-(OH)D<sub>3</sub>.

La 1α, 25-(OH)D<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 1α, 25-(OH)D<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 1α, 25-(OH)D<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 1α, 25-(OH)D<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 1α, 25-(OH)D<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 descendant et est considéré comme voie mineure. Les niveaux en 1α, 25-(OH)D<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 1α,25-(OH)D<sub>3</sub> exige une extraction et séparation par HPLC ou par chromatographie sur cartouche.

### B. Application clinique

Le dosage de la 1α, 25-(OH)D<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'élation des échantillons et contrôles, les étalons, échantillons et contrôles sont incubés dans des tubes coatés. 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 18-25°C, 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	Reconstitution
	1 x 48	<b>Prêt à l'emploi</b>
Ag <sup>125</sup> I	1 flacon lyophilisé 75 kBq	<b>Ajouter</b> 26 ml de la solution de reconstitution
CAL      N	5 flacons Lyophilisés	<b>Ajouter</b> 2 ml de Solution d'Elution
WASH    SOLN    CONC	1 flacon 10 ml	<b>Diluer</b> 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
CONTROL      N	2 flacons Lyophilisés	<b>Ajouter</b> 2 ml d'eau distillée
REC      SOLN	1 flacon 30 ml	<b>Prêt à l'emploi</b>
ELU      SOLN	1 flacon 30 ml	<b>Prêt à l'emploi</b>
GEL	20	<b>Garder à T.A.</b>
Cartouches Bond Elut Silica		

**Note :** Utiliser la solution d'élation 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.)

**NB:** Un kit d'extraction DIAsource contenant ces solvants est disponible sous la référence 3019700. Ce kit contient les quantités de solvants nécessaires à l'extraction des contrôles et des échantillons, pour 5 kits de 1,25 (OH)<sub>2</sub>-VIT.D-Elisa, en duplicita.

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'élution (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.
- I<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 solution fraîche** de di-isopropyléther, cyclohexane, ethylacetate, (50, 40, 10 v/v) en fonction du nombre d'extractions, comme indiqué dans le tableau ci-dessous.  
**Attention: la proportion exacte de chaque solvant doit être strictement respectée.**

Nb d'extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\* Échantillons de patients et contrôles

- Solvant de lavage :** on a besoin de 1 ml pour chaque contrôle ou échantillon à tester.

**Préparer une solution fraîche** de di-isopropyléther, cyclohexane, ethylacetate, éthanol absolu (50, 40, 10, 1 v/v) en fonction du nombre

Nb d'extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexane (ml)	Ethyl acetate (ml)	Ethanol (µl)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

d'extractions, comme indiqué dans le tableau ci-dessous.

**Attention: la proportion exacte de chaque solvant doit être strictement respectée.**

\* Échantillons de patients et contrôles

#### 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 18-25°C.
- Les calibrateurs et les contrôles sont très instables, utilisez-les immédiatement après la reconstitution, congelez-les immédiatement dans des aliquots et gardez-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 trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à 18-25°C 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. Attention : Les performances du kit ont été définies sur la base d'échantillons testés en double, il est donc important d'utiliser le kit tel que recommandé dans la notice. Pour cette raison, la quantité de cartouches fournies dans le kit est seulement suffisante pour effectuer l'extraction pour une détermination en double des échantillons de patients.

### **B. Mode opératoire**

#### **I. 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.
4. Les tubes sont fermés par un bouchon et mis sur un agitateur pendant 1 heure à 1200 rpm.
5. Centrifuger chaque tube pendant 5 minutes à 18-25°C (à 800 g).
6. Les surnageants sont nécessaires pour la phase prochaine de la séparation.

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

1. 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.
2. Disposer une cartouche "Bond Elut" dans chaque tube.
3. Appliquer 1,6 ml du surnageant (2 x 0,8 ml), obtenu après la phase d'extraction, sur la cartouche.
4. 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.
5. Ajouter 300 µl de dichlorométhane à chaque cartouche, laisser couler par gravité.
6. Ajouter 300 µl d'eau distillée à chaque cartouche.
7. Centrifuger chaque tube pendant 5 minutes à 18-25°C (à 800 g).
8. 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.
9. 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 18-25°C (à 800 g).
10. 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 :**

1. 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.
2. 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.
3. Distribuer 0,5 ml de 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamine-D marquée à l'<sup>125</sup>Iodine dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
4. Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
5. Incuber pendant une nuit à 18-25°C.
6. 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.

7. 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.
8. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale).
9. 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.
10. Après le dernier lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
11. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

## **XI. CALCUL DES RESULTATS**

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

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillo n)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

3. Utiliser un "3 cycle semi-logarithmic" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B<sub>0</sub>(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D, écarter les valeurs aberrantes.
4. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B<sub>0</sub>(%)) détermine les concentrations en 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D à partir de la courbe de calibration.
6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D non marquée (B<sub>0</sub>/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)2 VITAMIN-D	cptm	B/B <sub>0</sub> (%)
Activité totale	43937	
Calibrateur		
0,0 pg/ml	16687	100,0
6,0 pg/ml	15268	91,5
20,0 pg/ml	12345	74,0
63,0 pg/ml	8033	48,1
230,0 pg/ml	3554	21,3
430,0 pg/ml	2148	12,9

## **XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE**

### **A. Limite de détection**

La LOB (Limite du blanc) a été calculée en mesurant plusieurs fois le blanc et en calculant la moyenne - 1,65 écart-type de la distribution des meilleures valeurs. La LOB a été calculée à 0,55 pg / ml.

La LOD (limite de détection) a été calculée en tant que LOB - 1,645 écart-types d'un échantillon à faible concentration testé lors de 10 essais différents. La LOD était calculée à 2,88 pg / ml.

La limite de quantification (LOQ) a été calculée en testant 10 fois 5 échantillons de valeurs faibles. La limite de quantification a été calculée à 8,5 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	92,31
25OH-Vitamine-D3	0,001
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	0,005
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	0,20

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

La performance de l'essai n'est pas affectée par l'hémolyse (5 g/L d'hémoglobine a été testé), la bilirubinémie (1 g/L de bilirubine a été testé) ou les triglycérides (2,5

g/L a été testé). L'acide ascorbique (vitamine C) (1 g/L a été testé) et la bilirubine conjuguée (1 g/L a été testé) n'interfèrent pas avec cet essai.

#### C. Précision

##### INTRA-ESSAI

##### INTER-ESSAI

Sérum	N	$\text{X} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	$\text{X} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	37,9 ± 2,6	6,8	A	10	13,6 ± 1,7	12,7
B	20	98,2 ± 7,3	7,4	B	10	32,3 ± 3,6	11,3

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

#### D. Exactitude

##### TEST DE DILUTION

Dilution de l'échantillon	Concentration théorique (pg/ml)	Concentration mesurée (pg/ml)	Récupération (%)
1/1	70,0	70,0	100%
1/2	35,0	35,7	102%
1/4	17,5	14,5	83%
1/8	8,8	7,8	89%
1/16	4,4	4,6	105%

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

##### TEST DE RECUPERATION

1,25(OH)2-Vit.D ajoutée (pg/ml)	Concentrations en 1,25(OH)2 Vit.D mesurées		Récupération (%)
	Total (pg/ml)	Récupéré (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	46,3	23,8	95,2%
50,0	70,0	47,5	95,0%
100,0	122,7	100,2	100,2%

  

1,25(OH)2-Vit.D ajoutée (pg/ml)	Concentrations en 1,25(OH)2 Vit.D mesurées		Récupération (%)
	Total (pg/ml)	Récupéré (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	52,1	29,6	118,4%
50,0	70,4	47,9	95,8%
100,0	112,9	90,4	90,4%

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. CONTRÔLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicate 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)	CALIBRA TEURS (µl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (µl)
<b>EXTRACTION</b> Calibrateurs Echantillons, contrôles Solvant d'Extraction	- - -	- - -	500 2000
Agitation Centrifugation		1 heure à 1200 rpm 5 minutes à 800 g	
<b>SEPARATION</b> Surnageant de la phase d'extraction	-	-	1600
<b>CARTOUCHE</b> Surnageant Solvant de lavage Dichlorométhane Eau distillée Centrifugation Solution d'élution Centrifugation		1600 µl 1000 µl 300 µl 300 µl 5 minutes à 800 g 400 µl 5 minutes à 800 g <b>Vortex</b>	
<b>INCUBATION</b> Calibrateurs Echantillons extraits Traceur	- - 500	150 - 500	- 150 500
Incubation		une nuit à 18-25°C	
Séparation Solution de Lavage Séparation Solution de Lavage Séparation	- - - - -	aspiration (ou décanter) 2 ml aspiration (ou décanter) 2 ml aspiration (ou décanter)	
Comptage (radioactivité)		Temps de comptage des tubes : 60 secondes	



nl

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 84.99.91

## 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 sarcôiden 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 bijtschildklier. 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 metaboliet is calcitroisch zuur, 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 gehaltes 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 metabolieten, 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-parathyroïdisme, rachitis, tumor- geassocieerde hypercalcemie, Vitamine-resistante 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 plaatzen met antilichamen die geïmmobiliseerd zijn aan de wand van een buisje van polystyreen. Na een overnacht incubatie bij  $18\text{-}25^\circ\text{C}$ , 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	Reconstitutie
	1 x 48	Klaar voor gebruik
	1 flacon gevriesdroogd 75 kBq	Voeg 26 ml reconstitutieoplossing toe
Tracer : $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D gelabeld met $^{125}\text{I}$ (HPLC-kwaliteit) in fosfaat buffer met boven caseïne en gentamycine	5 flacons, gevriesdroogd	2 ml Elutieoplossing toevoegen
 Kalibrators $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D: N = 1 tot 5 (zie de exacte waarden op de flaconetiketten) in fosfaat buffer met boven caseïne en gentamycine	1 flacon 10 ml	70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
 Wasoplossing 70x : TRIS-HCl	2 flacons, gevriesdroogd	2 ml gedistilleerd water toevoegen
 Controles : N = 1 of 2 in humaan plasma met gentamycine	1 flacon 30 ml	Klaar voor gebruik
 Reconstitutieoplossing: fosfaat buffer met boven caseïne en azide (< 0,1%)	1 flacon 30 ml	Klaar voor gebruik
 Elutieoplossing: fosfaat buffer met boven caseïne, methanol en azide (< 0,1%)	1 flacon 30 ml	Klaar voor gebruik
 Bond Elut Silica -kolom	20	Bewaar bij $18\text{-}25^\circ\text{C}$

**Opmerking:** Gebruik de elutieoplossing als kalibrator 0 en voor de verdunning 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. Gedestilleerd water
2. Diisopropylether (p.a.)
3. Cyclohexaan (p.a.)
4. Ethyl acetaat (p.a.)
5. Zuivere ethanol (p.a.)
6. Dichloromethaan (p.a.)

**NB:** Een DIA-bronextractiekit met al deze oplosmiddelen is beschikbaar onder referentie # 3019700. Deze kit bevat hoeveelheden oplosmiddelen die nodig zijn om de controles en monsters te extraheren voor 5 kits van  $1,25(\text{OH})_2$ -VIT.D-RIA-CT, in duplo-metingen.

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. Afzuigssysteem (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 gedestilleerd water.
- C.  **$^{125}\text{I}$ -Vitamine-D :** Reconstitueer met 26 ml van de reconstitutieoplossing.
- D. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd 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) volgens het aantal extracties, zoals aangegeven in de onderstaande tabel.  
**Wees voorzichtig: de exacte verhouding van elk oplosmiddel moet strikt worden gerespecteerd.**

Nb of extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexaan (ml)	Ethyl acetaat (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\* Patiëntmonsters en controles

- 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) volgens het aantal extracties, zoals aangegeven in de onderstaande tabel.  
**Wees voorzichtig: de exacte verhouding van elk oplosmiddel moet strikt worden gerespecteerd.**

Nb of extraction*	Diisopropylether (ml)	Cyclohexaan (ml)	Ethyl acetaat (ml)	Ethanol ( $\mu\text{l}$ )
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

\* Patiëntmonsters en controles

#### 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  $8^\circ\text{C}$ ; behalve de patronen, zij moeten bewaard worden bij  $18\text{-}25^\circ\text{C}$ .
- De kalibrators en controles zijn erg onstabiel, gebruik hen onmiddellijk na reconstitutie, bevries onmiddellijk in aliquots en bewaar hen bij  $-20^\circ\text{C}$  gedurende 3 maanden. Vermijd herhaalde invriezing en onttdooing.
- 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  $8^\circ\text{C}$  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 ontdooien.
- 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 18-25°C komen voor 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 pipettpip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

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

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

Let op: de prestaties van de kit zijn bepaald op basis van in tweevoud geteste monsters, het is dus belangrijk om de kit te gebruiken zoals aanbevolen in de instructies. Om deze reden is het aantal cartridges in de kit alleen voldoende om de extractie uit te voeren voor een duplicaatbepaling van de patiëntmonsters.

### **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 18-25°C (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 18-25°C (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 18-25°C (bij 800 g).
10. Vortex the eluted fraction.

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

#### **III. Incubatiefase :**

1. Etiketteer de gecoate buisjes in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buisjes voor de bepaling van de totaal tellingen.
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>-Vitamine-D de totaal tellingen.
4. Schud het rek met de buisjes voorzichtig zodat eventuele ingesloten luchtbellen vrijkomen.
5. Incubeer overnacht bij 18-25°C

6. Zuig de inhoud van elk buisje (met uitzondering van de totaal tellingen) op Zorg ervoor dat de plastic tip van de aspirator tot aan de bodem van het gecoate buisje komt zodat alle vloeistof verwijderd wordt.
7. Was de buisjes met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen). Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de werk-wasoplossing.
8. Zuig de inhoud van elke buis (met uitzondering van de totaal tellingen) op (of decanteer ).
9. Was de buisjes nogmaals met 2 ml werk-wasoplossing (met uitzondering van de totaal tellingen) 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 gummieroller 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 nukalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

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

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/B <sub>0</sub> (%)
Totaaltelling	43937	
Kalibrator		
0,0 pg/ml	16687	100,0
6,0 pg/ml	15268	91,5
20,0 pg/ml	12345	74,0
63,0 pg/ml	8033	48,1
230,0 pg/ml	3554	21,3
430,0 pg/ml	2148	12,9

## **XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN**

### **A. Detectielimiet**

De LOB (Limiet van blanco) werd berekend door de blanco verschillende keren te meten en werd berekend als het gemiddelde - 1,65 standaarddeviaties van de verdeling van de beste waarden. De LOB werd berekend als 0,55 pg / ml.

De LOD (detectielimiet) werd berekend als de LOB - 1,645 standaardafwijkingen van een monster met lage concentratie, getest in 10 verschillende runs. De LOD werd berekend als 2,88 pg / ml.

De LOQ (Beperking van kwantificering) werd berekend door 10 monsters van lage waarden 10 keer te testen. De LOQ werd berekend als 8,5 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	92,31
25OH-Vitamine-D3	0,001
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	0,005
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamine.D3	0,20

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

Het testresultaat wordt niet beïnvloed door hemolyse (getest op 5 g/L hemoglobine), bilirubinemie (getest op 1 g/L bilirubine) of triglyceriden (getest op 2,5 g/L).

Ascorbinezuur (Vitamin C) (getest op 1 g/L) en bilirubine conjugaat (getest op 1g/L) zorgen niet voor storingen met deze test.

## C. Precisie

### PRECISIE BINNEN EEN TEST

### PRECISIE TUSSEN TESTEN

Serum	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	VC (%)	Serum	N	$\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	VC (%)
A	20	37,9 ± 2,6	6,8	A	10	13,6 ± 1,7	12,7
B	20	28,2 ± 7,3	7,4	B	10	32,3 ± 3,6	11,3

SD: standaarddeviatie; VC: variatiecoëfficiënt

## D. Nauwkeurigheid

### VERDUNNINGSTEST

Verdunning monster	Theoretische concentratie (pg/ml)	Gemeten concentratie (pg/ml)	Recovery (%)
1/1	70,0	70,0	100%
1/2	35,0	35,7	102%
1/4	17,5	14,5	83%
1/8	8,8	7,8	89%
1/16	4,4	4,6	105%

Monsters werden verduld met de Elutieoplossing

### RECOVERY-TEST

Toegevoegd 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vit.D (pg/ml)	Gemeten 1,25(OH) <sub>2</sub> Vit.D concentraties		Recovery (%)
	Totaal (pg/ml)	Zonder blanco (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	46,3	23,8	95,2%
50,0	70,0	47,5	95,0%
100,0	122,7	100,2	100,2%
Toegevoegd 1,25(OH) <sub>2</sub> -Vit.D (pg/ml)	Gemeten 1,25(OH) <sub>2</sub> Vit.D concentraties		Recovery (%)
	Totaal (pg/ml)	Zonder blanco (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	52,1	29,6	118,4%
50,0	70,4	47,9	95,8%
100,0	112,9	90,4	90,4%

**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 controlematerialen 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 γ-stralen (35,5 keV) uitzendt.

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

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 conservermiddeel) in contact komen met de huid. Azide in deze kit kan reageren met lood en koper in de afvoerleidingen en op die manier zeer explosieve metaalaziden vormen. Tijdens de wasfase moeten de afvoerleidingen ruimschoots met water nagespoeld worden om ophoping van azide te vermijden.

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

## 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 Extractiesolvent	- - -	- - -	- 500 2000
Schudden Centrifugatie		1 uur aan 1200 rpm 5 minuten aan 800 g	
<b>SCHEIDING</b> Supernatant van extractiefase	-	-	1600
<b>PATROON</b> Supernatant Wassolvent Dichloromethaan Gedestilleerd water Centrifugatie Elutieoplossing Centrifugatie		1600 µl 1000 µl 300 µl 300 µl 5 minuten aan 800 g 400 µl 5 minuten aan 800 g <b>Vortex</b>	
<b>INCUBATIE</b> Kalibratoren Geëxtraheerde stalen Tracer	- - 500	150 - 500	- 150 500
Incubatie		overnacht bij 18-25°C	
Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding Werk-wasoplossing Scheiding	- - - - -	opzuigen (of decanteren) 2,0 ml opzuigen (of -decanteren) 2,0 ml opzuigen (of -decanteren)	
Telling		Tel buisjes gedurende 60 seconden	

CE

de

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 84.99.91**

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 D3 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-D3. Bevor 25-OH-D3 die Funktionen des Vitamins D in Darm, Niere und in den Knochen erfüllen kann, muss es weiter verstoffwechselt werden. Diese Reaktion findet beim nichträchtigen Säugetier ausschließlich in der Niere statt. Auf diese Weise wird 25-OH-D3 an der 1 $\alpha$ -Position weiter hydroxyliert, sodass 1 $\alpha$ ,25 Dihydroxyvitamin D3 (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3) 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>D3 herzustellen. 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3 stellt in Bezug auf die bekannten Funktionen die aktive Form des Vitamins D dar, während ausgeschlossen werden kann, dass das 25-OH-D3 sowie Vitamin D3 selbst physiologisch aktiv sind. Da das 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3 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>D3 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>D3 ist die Calcitroïdsäure, 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>D3 auch einer 24-Hydroxylierung, die zum 1,24,25-Trihydroxy-Vitamin D3 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>D3 in Plasma oder Serum 100- bis 1.000-fach geringer als die des 25-OH-D3 sind und wegen der Anwesenheit zahlreicher ähnlicher Metaboliten, erfordert die Bestimmung des 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3 eine Extraktion sowie eine Separation entweder durch HPLC oder Säulenchromatografie.

### B. Klinische Anwendung

Die Messung des zirkulierenden 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3 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  $1,25(\text{OH})_2$ -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  $^{125}\text{I}$  markiertem  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D um eine Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Nach Inkubation über Nacht bei 18-25°C, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die  $1,25(\text{OH})_2$  Vitamin-D -Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	48 Test Kit	Rekonstitution
Mit anti $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D beschichtete Röhrchen	1 x 48	Gebrauchsfertig
Ag $^{125}\text{I}$ Tracer : $^{125}\text{I}$ markiertes $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D (HPLC grade) in Phosphatpuffer mit Rindercasein und Gentamycin	1 Gefäß lyophilisiert 75 kBq	26 ml Rekonstitutionslösung zugeben
CAL N Kalibratoren $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin-D : N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Phosphatpuffer mit Rindercasein und Gentamycin	5 Gefäße lyophilisiert	2 ml Eluierungslösung zugeben
WASH SOLN CONC Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Gefäß 10 ml	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen.
CONTROL N Kontrollen : N = 1 oder 2 in Humanplasma und Gentamycin	2 Gefäße lyophilisiert	2 ml dest. Wasser zugeben
REC SOLN Rekonstitutionslösung: Phosphatpuffer mit Rindercasein und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 30 ml	Gebrauchsfertig
ELU SOLN Eluierungslösung: Phosphatpuffer mit Rindercasein, Methanol und Azid (<0,1%)	1 Gefäß 30 ml	Gebrauchsfertig
GEL	20	Bei 18-25°C aufbewahren
Bond Elut Silikakartuschen		

**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. Dichlormethan (p.a.)

**NB : Ein DIAsource-Extraktionskit, das alle diese Lösungsmittel enthält, ist unter der Referenznummer 3019700 erhältlich. Dieses Kit enthält die für die Extraktion der Kontrollen und Proben erforderlichen Mengen an Lösungsmitteln für 5 Kits mit  $1,25(\text{OH})_2$ -VIT.D-Elisa in Doppelmessungen.**

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. Vortexmixer
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  $^{125}\text{I}$  messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

#### VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 2 ml Eluierungslösung (**gerade vor dem Inkubationsschritt**).
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 2 ml dest. Wasser.
- C.  **$^{125}\text{I} 1,25(\text{OH})_2$ -Vitamin D:** Rekonstituieren Sie mit 26 ml Rekonstitutionslösung.
- D. **Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.
- E. **Extraktionslösungsmittel:** Es werden je Kontrolle bzw. Probe 2 ml benötigt.  
**Vorbereitung einer frischen Lösung** aus Diisopropyläther, Cyclohexan, Äthylacetat (50, 40, 10 V/V) entsprechend der Anzahl der Extraktionen vor, wie in der nachstehenden Tabelle angegeben.  
**Seien Sie vorsichtig: Der genaue Anteil jedes Lösungsmittels muss unbedingt eingehalten werden.**

Nb der Extraktion*	Diisopropyläther (ml)	Cyclohexan (ml)	Äthylacetat (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\* Patientenproben und Kontrollen

- F. **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) entsprechend der Anzahl der Extraktionen vor, wie in der nachstehenden Tabelle angegeben.  
**Seien Sie vorsichtig: Der genaue Anteil jedes Lösungsmittels muss unbedingt eingehalten werden.**

Nb der Extraktion*	Diisopropyläther (ml)	Cyclohexan (ml)	Äthylacetat (ml)	Äthanol (µl)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

\* Patientenproben und Kontrollen

#### 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 18-25°C 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 (heparinisiert 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 18-25°C. 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.

Achtung: Die Leistung des Kits wurde anhand von doppelt getesteten Proben definiert, daher ist es wichtig, das Kit wie in der Anleitung empfohlen zu verwenden. Aus diesem Grund reicht die im Kit enthaltene Menge an Kartuschen nur aus, um die Extraktion für eine Doppelbestimmung der Patientenproben durchzuführen.

### **B. Durchführung**

#### **I. Extraktionschritt: ! Nur für Kontrollen und Proben**

1. Beschriften Sie die Glasröhren (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 Röhren.
3. Geben Sie 2 ml Extraktionslösungsmitel in alle Röhren.
4. Röhren mit Verschluss schließen und 1 Stunde auf einem Schüttler (1200 rpm) inkubieren.
5. Zentrifugieren Sie alle Röhren 5 min. bei 18-25°C (800 g).
6. Verwenden Sie die Überstände für den nächsten Arbeitsschritt.

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

1. Label Glasröhren (16 x100 mm) oder (12 x 120 mm), oder Polypropylenröhren (Falcon 2097), für das Waschen der Kartuschen : 2 Kontrollen und bis zu 16 Proben.
2. Stecken Sie eine „Bond Elut“ Kartusche in jedes Röhren.
3. Tragen Sie 1,6 ml des Überstandes (2 x 0,8 ml) aus dem Extraktionschritt auf die Kartuschen.
4. Waschen Sie die Kartuschen mit 1 ml Waschlösungsmittel (Herstellung s.o.) ! Niemals Vakuum an die Kartuschen anlegen, sondern Lösungsmittel allein durch Schwerkraft passieren lassen.
5. Pipettieren Sie 300 µl Dichlormethan auf die Kartuschen; durch Schwerkraft passieren lassen.
6. Pipettieren Sie 300 µl dest. Wasser auf die Kartuschen.
7. Zentrifugieren Sie alle Röhren 5 min. bei 18-25°C (800 g).
8. Beschriften Sie die Glasröhren (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 Glasröhren.
9. 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 18-25°C (800 g).
10. Vortexmixen Sie die eluierte Fraktion.

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

### **III. Inkubationsschritt:**

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhren für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhren.
2. Vortexen Sie Kalibratoren (Verwenden Sie Eluierungslösung als Null-Kalibrator), extrahierte Proben und Kontrollen kurz und geben Sie 150 µl von jedem in ihre Röhren.
3. Geben Sie 0,5 ml des 125Iod markierten 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin-D in jedes Röhren, einschließlich der unbeschichteten Röhren für die Gesamtaktivität.
4. Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhren um Blasen zu entfernen.
5. Inkubieren Sie Über Nacht bei 18-25°C.
6. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrengangs ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrengangs erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.

7. Waschen Sie die Röhren mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
8. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrengangs ab (außer Gesamtaktivität).
9. Waschen Sie die Röhren mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab.
10. Lassen Sie nach dem letzten Waschen die Röhren 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitströpfchen ab.
11. Werten Sie die Röhren in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

## **XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE**

1. Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
  2. Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:
- $$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$
3. 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.
  4. 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.
  5. 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.
  6. 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	43937	
Kalibrator		
0,0 pg/ml	16687	100,0
6,0 pg/ml	15268	91,5
20,0 pg/ml	12345	74,0
63,0 pg/ml	8033	48,1
230,0 pg/ml	3554	21,3
430,0 pg/ml	2148	12,9

## **XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK**

### **A. Nachweisgrenze**

Das LOB (Grenzen von Leerwert) wurde durch mehrmaliges Messen des Leerwerts berechnet und als Mittelwert von 1,65 Standardabweichungen der Verteilung der besten Werte berechnet. Das LOB wurde mit 0,55 pg / ml berechnet.

Die LOD (Grenzen von Nachweis) wurde als LOB - 1.645 - Standardabweichung Einer Probe mit niedriger Konzentration, die in 10 verschiedenen Durchläufen Getestet wurde, berechnet. Die LOD wurde mit 2,88 pg / ml berechnet.

Die LOQ (Grenzen von Quantifizierung) wurde durch zehnmaliges Testen von 5 Proben mit niedrigen Werten berechnet. Die LOQ wurde mit 8,5 pg / ml berechnet.

### **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	92,31
25OH-Vitamin D3	0,001
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D3	0,005
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamin D3	0,20

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

Die Leistung des Tests wird nicht durch Hämolyse (5g/l Hämoglobin getestet), Bilirubinämie (1g/l Bilirubin getestet) oder Triglyceride (2,5 g/l getestet) beeinflusst.  
Ascorbinsäure (Vitamin C) (1g/l getestet) und Bilirubinkonjugat (1g/l getestet) interferieren nicht mit diesem Testsystem.

#### C. Präzision

##### INTRA-ASSAY PRÄZISION                    INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	$\text{} \pm \text{SD}$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	$37.9 \pm 2.6$	6.8	A	10	$13.6 \pm 1.7$	12.7
B	20	$98.2 \pm 7.3$	7.4	B	10	$32.3 \pm 3.6$	11.3

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

#### D. Genauigkeit

##### VERDÜNNUNGSTEST

Probenverdünnung	Theoretische Konzentration (pg/ml)	Gemessene Konzentration (pg/ml)	Wiederfindungsrate (%)
1/1	70,0	70,0	100%
1/2	35,0	35,7	102%
1/4	17,5	14,5	83%
1/8	8,8	7,8	89%
1/16	4,4	4,6	105%

Die Proben wurden mit Eluierungslösung verdünnt.

##### WIEDERFINDUNGSTEST

Hinzugefügtes 1,25(OH)2-Vit.D (pg/ml)	Gemessene 1,25(OH)2 Vit.D Konzentrationen		Wiederfindungsrate (%)
	Gesamt (pg/ml)	Gelöscht (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	46,3	23,8	95,2%
50,0	70,0	47,5	95,0%
100,0	122,7	100,2	100,2%

  

Hinzugefügtes 1,25(OH)2-Vit.D (pg/ml)	Gemessene 1,25(OH)2 Vit.D Konzentrationen		Wiederfindungsrate (%)
	Gesamt (pg/ml)	Gelöscht (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	52,1	29,6	118,4%
50,0	70,4	47,9	95,8%
100,0	112,9	90,4	90,4%

##### 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  $^{125}\text{I}$  (Halbwertzeit: 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 Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

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

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 volkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

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

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

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzbekleidung 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)	KALIBRA-TOREN (µl)	PROBE(N)-KONTROLLEN (µl)
<b>EXTRAKTION</b> Kalibratoren Proben, Kontrollen Extraktionslösungs-mittel	- - -	- - -	- 500 2000
Schütteln Zentrifugierung	1 Std. bei 1200 rpm 5 Minuten (800 g)		
<b>SEPARATION</b> Überstand aus dem Extraktionsschritt	-	-	1600
<b>KARTUSCHE</b> Überstand Waschlösungsmittel Dichloromethan Dest. Wasser Zentrifugierung Eluierungslösung Zentrifugierung	1600 µl 1000 µl 300 µl 300 µl 5 Minuten (800 g) 400 µl 5 Minuten (800 g) <b>Vortex</b>		
<b>INKUBATION</b> Kalibratoren Extrahierte Proben Tracer	- - 500	150 - 500	- 150 500
Inkubation	Über Nacht bei 18-25°C		
Separation Waschlösung Separation Waschlösung Separation	- - - - -	absaugen (oder dekant) 2 ml absaugen (oder dekant) 2 ml absaugen (oder dekant)	
Auswertung	Messen der Röhrchen 60 Sekunden		



it

**Leggere tutto il protocollo prima dell'uso**

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

## **I. USO PREVISTO**

Radioimmunosassaggio per la determinazione quantitativa *in vitro* della 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>-Vit.D) nel siero e nel plasma.

## *II. INFORMAZIONI GENERALI*

- A. Nome commerciale:** DIAsource 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT Kit  
**B. Numero di catalogo:** KIP1929 : 48 test  
**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 84.99.91**

### **III. INFORMAZIONI CLINICHE**

#### A. Attività biologiche

La vitamina D3 è sintetizzata principalmente a livello cutaneo a partire da 7-deidrocolesterolo e parzialmente ricavata dall'alimentazione. Nel fegato la vitamina D3 viene idrossilata sul carbonio 25 per produrre il necessario intermedio 25-OH-D3, il quale deve subire ulteriori modifiche prima di poter svolgere le funzioni della vitamina D a livello intestinale, renale e osseo. Nei mammiferi non gravidi, questa seconda reazione avviene solo nel rene. Pertanto, la 25-OH-D3 subisce un'ulteriore idrossilazione in posizione  $1\alpha$  a dare la  $1\alpha,25$ -diodrossi-vitamina D3 ( $1\alpha,25$ -(OH) $_2$ D $_3$ ).

Oltre al tessuto renale, la  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  può essere prodotta anche da parte della placenta di donne in gravidanza e, in presenza di sarcoidosi, dai macrofagi. La  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  rappresenta la forma attiva della vitamina D in relazione alle funzioni note, mentre la  $25-OH-D_3$  e la vitamina D3 stessa possono essere escluse in quanto fisiologicamente funzionali. Inoltre, poiché la  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  è prodotta dal rene ed esercita parte della propria azione a livello di ossa e intestino, va considerata un ormone. Tale ormone stimola l'assorbimento intestinale del calcio e del fosforo, oltre a favorire il riasorbimento e la mineralizzazione ossei, prevenendo dunque lo sviluppo di rachitismo e osteomalacia.

La  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  potrebbe essere attiva anche in altri tessuti responsabili del trasporto di calcio (placenta, rene, ghiandola mammaria, ...) e nelle ghiandole endocrine, quali le paratiroidi. La  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  è metabolizzata rapidamente e la sua permanenza nel plasma ammonta a circa 2-4 h. Il suo metabolita principale è l'acido calcitroico, un derivato carbossilico C-23, essenzialmente privo di attività biologica. Oltre a questa via, la  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  subisce un'idrossilazione in posizione 24 a dare la  $1,24,25$ -triidrossi-vitamina D<sub>3</sub>, caratterizzata da un'attività biologica minore rispetto al suo progenitore, pertanto questa viene considerata come una via metabolica minore.

I livelli di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D3 nel plasma o nel siero sono da 100 a 1000 volte inferiori a quelli della 25-OH-D3. Considerando la sua bassa concentrazione e la presenza di molti metaboliti simili, la misurazione di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D3 richiede l'estrazione e la separazione tramite HPLC o cromatografia su colonna.

#### **B. Applicazione clinica**

La misurazione dei livelli circolanti di 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3 è indicata in diversi disturbi che interessano il metabolismo del calcio quali: sarcoidosi, insufficienza renale, iper- e ipo-paratiroidismo, rachitismo, ipercalcemia associata a tumori, rachitismo vitamina D-resistente e trattamento con farmaci anticonvulsivanti.

#### IV. PRINCIPIO DEL METODO

Solo i campioni e i controlli, ma non i calibratori, vengono estratti utilizzando una miscela di solventi e vengono applicati su cartucce per separare la 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D dagli altri metaboliti della vitamina D. Dopo l'eluizione dei campioni e dei controlli, i calibratori, i campioni e i controlli vengono incubati in provette rivestite. Una quantità fissa di 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D marcata con <sup>125</sup>I compete con la 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D da misurare presente nel campione o nel calibratore per il legame a un numero fisso di siti sugli anticorpi immobilizzati sulla parete della provetta di polistirene. Dopo un'incubazione per tutta la notte a 18-25°C, la reazione di competizione viene interrotta tramite aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con soluzione di lavaggio e asciugate. Si costruisce una curva di calibrazione e tramite la sua interpolazione si calcola concentrazione di 1,25(OH)<sub>2</sub> Vitamina D presente nei campioni.

#### V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 48 test	Volume di ricostituzione
Provette rivestite con anticorpo anti-1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamina D	1 x 48	<b>Pronta</b> per l'uso
 Ag 	1 flacone, liofilizzato 75 kBq	<b>Aggiungere</b> 26 ml di Soluzione di ricostituzione
RADIOMARCATO: 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamina D marcato con <sup>125</sup> I (per HPLC), in tampone fosfato con caseina bovina e gentamicina		
CAL N	5 flaconcini, liofilizzati	<b>Aggiungere</b> 2 ml di Soluzione di eluizione
Calibratori – N = da 1 a 5 (i valori esatti sono riportati sull'etichetta dei flaconcini), in tampone fosfato con caseina bovina e gentamicina		
WASH SOLN CONC	1 flaconcino, 10 ml	<b>Diluire</b> 70 x con acqua distillata (usare un agitatore magnetico)
Soluzione di lavaggio concentrata (TRIS-HCl)		
CONTROL N	2 flaconcini, liofilizzati	<b>Aggiungere</b> 2 ml di acqua distillata
Controlli - N = 1 o 2, in plasma umano con gentamicina		
REC SOLN	1 flacone 30 ml	<b>Pronta</b> per l'uso
Soluzione di ricostituzione: tampone fosfato con caseina bovina e azoturo (<0,1%)		
ELU SOLN	1 flacone 30 ml	<b>Pronta</b> per l'uso
Soluzione di eluizione: tampone fosfato con caseina bovina, metanolo e azoturo (<0,1%)		
GEL	20	<b>Conservare</b> a temp. amb.
Cartucce di silice Bond Elut		

**Note :** Utilizzare la Soluzione di eluizione come 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.

- Acqua distillata
- Diisopropiletere (p.a.)
- Cicloesano (p.a.)
- Etilacetato (p.a.)
- Etanolo assoluto (p.a.)
- Diclorometano (p.a.)

**NB:** Un kit di estrazione DIAsource contenente tutti questi solventi è disponibile con il riferimento # 3019700. Questo kit contiene quantità di solventi necessari per estrarre i controlli e i campioni, per 5 kit di 1,25(OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT, in misurazioni duplicate.

- Pipette per erogare 200 µl, 500 µl, 1 ml e 2 ml (si raccomanda di utilizzare

pipette accurate con puntale di plastica monouso).

- Provette di vetro (12 x 75 mm) per l'estrazione e l'eluizione (chiuse con un tappo per la fase di estrazione).
- Provette di vetro (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm) o di polipropilene (Falcon 2097) per il lavaggio delle cartucce.
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Centrifuga funzionante a 800 g.
- Agitatore rotatorio (1200 rpm)
- Siringa automatica da 5 ml (tipo Cornwall) per i lavaggi.
- Sistema di aspirazione dei campioni (opzionale).
- Contatore gamma con finestra per <sup>125</sup>I (efficienza minima 70%).

#### VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratori:** ricostituire i calibratori con 2 ml di Soluzione di eluizione (**subito prima della fase di incubazione**).
- Controlli:** ricostituire i controlli con 2 ml di acqua distillata.
- 1<sup>25</sup> 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D:** ricostituire con 26 ml di Soluzione di ricostituzione.
- Soluzione di lavaggio diluita:** preparare la quantità necessaria di Soluzione di lavaggio diluita aggiungendo 69 volumi di acqua distillata a 1 volume di Soluzione di lavaggio concentrata (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavaggio va scartata al termine della giornata.
- Solvente di estrazione:** sono necessari 2 ml per ogni controllo o campione da controllare. **Preparare una soluzione fresca** di diisopropiletere, cicloesano, etilacetato, (50, 40, 10 v/v) in base al numero di estrazioni, come indicato nella tabella sottostante.  
**Fare attenzione: la proporzione esatta di ciascun solvente deve essere rigorosamente rispettata.**

Numero di estrazione *	Diisopropiletere (ml)	Cicloesano (ml)	Etilacetato (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\* Campioni e controlli del paziente

- Solvente di lavaggio:** è necessario 1 ml per ogni controllo o campione da analizzare.  
**Preparare una soluzione fresca** di diisopropiletere, cicloesano, etilacetato, etanolo assoluto (50, 40, 10, 1 v/v) in base al numero di estrazioni, come indicato nella tabella sottostante.  
**Fare attenzione: la proporzione esatta di ciascun solvente deve essere rigorosamente rispettata.**

Numero di estrazione *	Diisopropiletere (ml)	Cicloesano (ml)	Etilacetato (ml)	Etanolo assoluto (µl)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

\* Campioni e controlli del paziente

#### VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- Prima dell'apertura o della ricostituzione, tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata sulle rispettive etichette se mantenuti a 2-8°C, ad eccezione delle cartucce che vanno conservate a 18-25°C.
- I calibratori e i controlli sono molto instabili: vanno utilizzati subito dopo la ricostituzione e congelati immediatamente in aliquote e mantenuti a -20°C per 3 mesi. Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelamento.
- La Soluzione di lavaggio diluita va preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo l'apertura del flacone, il radiomarcato è stabile fino alla data di scadenza, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben chiuso.
- Il Solvente di estrazione e il Solvente di lavaggio vanno sempre preparati freschi e non vanno conservati.**
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

## **IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

- Conservare i campioni di siero e plasma a 2-8°C.
- Se il test non viene eseguito entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di aliquotare i campioni e conservarli a -20°C.
- Evitare cicli ripetuti di congelamento-scongelamento.
- Dopo lo scongelamento, i campioni vanno vortexati e centrifugati.
- Il siero e il plasma (eparina o EDTA) forniscono risultati simili.

## **X. PROCEDURA**

### **A. Note generali**

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza.

Non mescolare materiali di lotti di kit diversi.

Prima dell'uso portare tutti i reattivi a 18-25°C.

Mescolare bene tutti i reattivi e i campioni mediante delicata inversione o rotazione. Per evitare contaminazioni incrociate, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate o di pipette automatiche migliora la precisione del dosaggio.

Rispettare i tempi di incubazione.

Preparare una curva di calibrazione per ogni sessione di analisi, non riutilizzare i dati ottenuti da sessioni di analisi precedenti.

Attenzione: le prestazioni del kit sono state definite sulla base di campioni testati in duplice, è quindi importante utilizzare il kit come raccomandato nelle istruzioni. Per questo motivo, la quantità di cartucce fornite nel kit è sufficiente solo per eseguire l'estrazione per una determinazione in duplice dei campioni dei pazienti.

### **B. Procedura**

#### **I. Fase di estrazione: NB: 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. Erogare 2 ml di Solvente di estrazione in ogni provetta.
4. Chiudere le provette con un tappo e inserirle in un agitatore per 1 ora a 1200 rpm.
5. Centrifugare ogni provetta per 5 minuti a 18-25°C (a 800 g).
6. Per la successiva fase di separazione sono necessari i supernatanti.

#### **II. Fase di separazione: NB: solo per controlli e campioni**

1. Etichettare le provette di vetro (16 x 100 mm) o (12 x 120 mm) o di polipropilene (Falcon 2097) per il lavaggio delle cartucce: 2 controlli e 16 campioni al massimo.
2. Inserire una cartuccia "Bond Elut" in ogni provetta.
3. Applicare sulla cartuccia 1,6 ml di supernatante (2 x 0,8 ml) ottenuto dopo la fase di estrazione.
4. Quindi, lavare le cartucce con 1 ml di Solvente di lavaggio (vedere la preparazione dei reattivi). NB: fare attenzione a non applicare mai il vuoto alle cartucce, lasciare semplicemente che il solvente scenda per gravità.
5. Aggiungere 300 µl di dclorometano su ogni cartuccia, lasciare scendere per gravità.
6. Aggiungere 300 µl di acqua distillata su ogni cartuccia.
7. Centrifugare ogni provetta per 5 minuti a 18-25°C (a 800 g).
8. Etichettare le provette di vetro (12 x 75 mm) per l'eluzione della 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D. Dopo la centrifugazione, trasferire le cartucce nelle corrispondenti provette di vetro.
9. Applicare 400 µl di Soluzione di eluizione su ciascuna cartuccia per eluire 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D e centrifugare 5 minuti a 18-25°C (a 800 g).
10. Vortexare 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:**

1. Etichettare le provette rivestite necessarie per dosare in duplice ogni calibratore, campione e controllo. Etichettare 2 provette non rivestite per la determinazione dell'attività totale.
2. Vortexare brevemente i calibratori (utilizzare la Soluzione di eluizione come calibratore 0), i controlli e i campioni estratti ed erogare 150 µl di ognuno di essi nelle rispettive provette.
3. Erogare 500 µl di 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D marcata con <sup>125</sup>I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4. Scuotere delicatamente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria.
5. Incubare per tutta la notte a 18-25°C.
6. Aspirare (o far decantare) 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.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di Soluzione di lavaggio diluita e aspirare (o far decantare), evitando la formazione di schiuma.

8. Aspirare (o far decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.

9. Lavare ancora tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di Soluzione di lavaggio e aspirare (o far decantare).

10. Dopo l'ultimo lavaggio, lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.

11. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

### **XI. CALCOLO DEI RISULTATI**

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplice.

2. Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette dei calibratori 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette del calibratore zero (B0).

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

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D, tracciare la curva di calibrazione, scartando i valori palesemente discordanti.

4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatico. In tal caso, utilizzare una curva a 4 parametri.

5. Per interpolazione sulla curva di calibrazione dei rapporti di competizione dei campioni e dei controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D.

6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

### **XII. CARATTERISTICHE TIPICHE**

I dati sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di 1,25(OH)<sub>2</sub>-Vitamina D nei campioni e controlli al posto della curva di calibrazione eseguita al momento.

1,25(OH)2 VITAMINA D	cpm	B/B0 (%)
Attività totale	43937	
Calibratore		
0,0 pg/ml	16687	100,0
6,0 pg/ml	15268	91,5
20,0 pg/ml	12345	74,0
63,0 pg/ml	8033	48,1
230,0 pg/ml	3554	21,3
430,0 pg/ml	2148	12,9

### **XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO**

#### **A. Sensibilità**

Il LOB (limite del bianco) è stato calcolato misurando il bianco più volte ed è stato calcolato come media: 1,65 deviazioni standard della distribuzione dei valori migliori. Il LOB è stato calcolato in 0,55 pg / ml.

Il LOD (limite di rilevamento) è stato calcolato come le deviazioni standard di LOB - 1.645 di un campione a bassa concentrazione testato in 10 diverse prove. Il LOD è stato calcolato in 2,88 pg / ml.

Il LOQ (limite di quantificazione) è stato calcolato testando 5 campioni di valori bassi 10 volte. Il LOQ è stato calcolato pari a 8,5 pg / ml.

#### **B. Specificità**

Le percentuali di reattività incrociata stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione del 50% sono riportate nella tabella.

Composto	Reattività incrociata (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D3	100,00
1,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D2	92,31
25OH-Vitamina D3	0,001
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D3	0,005
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamina D3	0,20

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

Le prestazioni dell'analisi non sono influenzate dall'emolisi (emoglobina analizzata: 5 g/L), dalla bilirubinemia (bilirubina analizzata: 1 g/L) o dai trigliceridi (analizzati: 2,5 g/L).

L'acido ascorbico (Vitamina C, analizzati: 1g/L) e il coniugato della bilirubina (analizzati: 1g/L) non interferiscono con questa analisi.

## C. Precisione

### INTRA-SAGGIO

### INTER-SAGGIO

Siero	N	$\text{} \pm \text{DS}$ (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	$\text{} \pm \text{DS}$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	37,9 $\pm$ 2,6	6,8	A	10	13,6 $\pm$ 1,7	12,7
B	20	98,2 $\pm$ 7,3	7,4	B	10	32,3 $\pm$ 3,6	11,3

DS: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

## D. Accuratezza

### TEST DI DILUIZIONE

Diluizione del campione	Concentraz. teorica (pg/ml)	Concentraz. misurata (pg/ml)	Recupero (%)
1/1	70,0	70,0	100%
1/2	35,0	35,7	102%
1/4	17,5	14,5	83%
1/8	8,8	7,8	89%
1/16	4,4	4,6	105%

Il campione è stato diluito con la Soluzione di eluizione.

### TEST DI RECUPERO

1,25(OH)2-Vit.D aggiunta (pg/ml)	Concentraz. di 1,25(OH)2 Vit.D totale misurata		Recupero (%)
	Totale (pg/ml)	Con sottraz. bianco (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	46,3	23,8	95,2%
50,0	70,0	47,5	95,0%
100,0	122,7	100,2	100,2%

  

1,25(OH)2-Vit.D aggiunta (pg/ml)	Concentraz. di 1,25(OH)2 Vit.D totale misurata		Recupero (%)
	Totale (pg/ml)	Con sottraz. bianco (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	52,1	29,6	118,4%
50,0	70,4	47,9	95,8%
100,0	112,9	90,4	90,4%

#### 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 un calibratore di riferimento internazionale per questo parametro.

## XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti per il Controllo 1 e/o il Controllo 2 non rientrano nei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi non vanno utilizzati, salvo vi sia una giustificazione soddisfacente per tale discrepanza.
- Ciascun 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 dei campioni in doppio devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

## XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

L'intervallo analizzato è basato sui percentili da 2,5% a 97,5%.

Popolazione	Intervallo (pg/ml)	Media	DS	n
Soggetti sani	19,6 – 54,3	35,3	10,6	51

## XVI. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

### Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico *in vitro*.

Il kit contiene  $^{125}\text{I}$  (semivita: 60 giorni) che emette radiazioni X (28 keV) e  $\gamma$  (35,5 keV) ionizzanti. Questo prodotto radioattivo può essere inviato a e utilizzato solo da personale autorizzato. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti alle normative vigenti nel paese dell'utilizzatore finale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato a esseri umani o animali.

Tutte le manipolazioni di materiale radioattivo vanno eseguite in un'area riservata, lontano da vie di passaggio comuni. Nel laboratorio deve essere presente un registro di carico e scarico del materiale radioattivo aggiornato regolarmente. Le apparecchiature di laboratorio e la vetreria, potenzialmente contaminati da sostanze radioattive, devono essere dedicati all'uso esclusivo dei diversi isotopi, per evitare contaminazioni incrociate tra isotopi.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo bonificare immediatamente seguendo le procedure di sicurezza locali in materia di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le normative e le linee guida locali. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

I derivati da sangue umano presenti nel kit sono stati analizzati con metodi approvati da organismi di controllo europei o dalla FDA e si sono rivelati negativi per gli anticorpi HBs Ag, anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV2. Nessun metodo noto può offrire la certezza assoluta che un derivato da sangue umano non possa trasmettere epatite, AIDS o 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. È comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare qualsiasi contatto dell'epidermide con reattivi contenenti come conservante l'azoturo di sodio. L'azoturo di sodio può reagire con il piombo, il rame o l'ottone presenti nelle tubature di scarico, formando azoturi metallici esplosivi. 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 applicare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Utilizzare indumenti protettivi e guanti monouso.

## 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 PROTOCOLLO**

	Attività totale µl	Calibratori µl	Campioni Controlli µl
<b>ESTRAZIONE</b>			
Calibratore	-	-	-
Campioni, controlli	-	-	500
Solvente di estrazione	-	-	2000
Agitazione Centrifugazione		1 ora a 1200 rpm 5 minuti a 800 g	
<b>SEPARAZIONE</b>			
Supernatante dalla fase di estrazione	-	-	1600
<b>CARTUCCIA</b>			
Supernatante		1600 µl	
Solvente di lavaggio		1000 µl	
Diclorometano		300 µl	
Acqua distillata		300 µl	
Centrifugazione		5 minuti a 800 g	
Soluzione di eluizione		400 µl	
Centrifugazione		5 minuti a 800 g	
		<b>Vortexare</b>	
<b>INCUBAZIONE</b>			
Calibratore	-	150	-
Campioni estratti	-	-	150
Tracciatore radioattivo	500	500	500
Incubazione		Per tutta la notte a 18-25°C	
Separazione	-	Aspirare (o far decantare)	
Soluzione di lavaggio	-	2 ml	
Separazione	-	Aspirare (o far decantare)	
Soluzione di lavaggio	-	2 ml	
Separazione	-	Aspirare (o far decantare)	
Conteggio		Contare le provette per 1 minuto	



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 84.99.91

## III. INFORMACIÓN CLÍNICA

### A. Actividades biológicas

La vitamina D3 es principalmente sintetizada en la piel de 7- dehidrocolesterol y es parcialmente de origen dietético. En el hígado, la vitamina D3 es hidroxilada sobre el carbono 25 para producir el intermediario necesario 25-OH-D3. La 25-OH-D3 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-D3 es hidroxilada más en la posición 1α para producir la 1α,25 dihidroxivitamina D3 (1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3).

Además del tejido renal, la placenta de mujeres embarazadas y las células macrofágas en caso de sarcoidosis también pueden producir una cantidad de 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3. La 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3 es la forma activa de la Vitamina D en relación con las funciones conocidas, mientras que la 25-OH-D3 y la Vitamina D3 misma pueden ser excluidas como factores fisiológicamente funcionales. Visto que la 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3 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 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3 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 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3 es metabolizada rápidamente y la duración de su vida en plasma es aproximadamente 2-4 h. Su metabolito principal es el ácido calcitriocoico, un derivado carboxílico con 23 C sin actividad biológica particular. Además de esta vía, la 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3 experimenta una 24-hidroxilación para producir la 1,24,25-trihidroxivitamina D3. Este componente tiene menos actividad biológica que su antecesor y su metabolismo es considerado como una vía inferior.

Los niveles de la 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3 en plasma o en suero son 100 a 1000 veces menores que los de la 25-OH-D3. Debido a sus concentraciones bajas y a la presencia de muchos metabolitos similares, la medición de la 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3 necesita extracción y separación por HPLC o por cromatografía en columna.

### B. Aplicaciones clínicas

La medición de la 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D3 es indicada con unas enfermedades que afectan el metabolismo de calcio como : sarcoidosis, deficiencia renal, hiper y hipoparatiroidismo, 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(OH)<sub>2</sub> 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(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D marcada con I<sup>125</sup> compite con el 1,25(OH)<sub>2</sub> 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 18-25°C, 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(OH)<sub>2</sub> Vitamin-D de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 48 test	Reconstitución
Tubos recubiertos con anti 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D	1 x 48	Listo para uso
Ag 125I	1 vial liofilizados 75 kBq	Añadir 26 ml de solución de reconstitución
TRAZADOR:1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D marcado con I <sup>125</sup> (grado HPLC) en tampón fosfato con caseina bovina y gentamicina	5 viales liofilizados	Añadir 2 ml de Solución de elución
CAL N		
Calibradores 1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamin-D - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en tampón fosfato con caseina bovina y gentamicina		
WASH SOLN CONC	1 vial 10 ml	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
Solución de lavado (TRIS-HCl)		
CONTROL N	2 viales liofilizados	Añadir 2 ml de agua destilada
Controles - N = 1 o 2 en plasma humano y gentamicina		
REC SOLN	1 vial 30 ml	Listo para uso
Solución de reconstitución: tampón fosfato con caseina bovina y azida (<0,1%)		
ELU SOLN	1 vial 30 ml	Listo para uso
Solución de elución: tampón fosfato con caseina bovina, metanol y azida (<0,1%)		
GEL	20	Guardar a T.A.
Cartuchos Bond Elut Silica		

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 está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Diisopropiléter. (p.a.)
3. Ciclohexano. (p.a.)
4. Acetato de etilo. (p.a.)
5. Alcohol etílico puro. (p.a.)
6. Diclorometano. (p.a.)

**NB: Un kit de extracción DIAsource que contiene todos estos solventes está disponible bajo la referencia # 3019700. Este kit contiene las cantidades de solventes necesarios para extraer los controles y las muestras, para 5 kits de 1,25 (OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT, en mediciones duplificadas.**

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 I<sup>125</sup> (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. **I<sup>125</sup> 1,25(OH)<sub>2</sub>-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, acetato de etilo, (50, 40, 10 v/v) Según el número de extracciones, como se indica en la tabla a continuación.

**Tenga cuidado: la proporción exacta de cada solvente debe respetarse estrictamente.**

Número de extracción *	Diisopropiléter (ml)	Ciclohexano (ml)	Acetato de etilo (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\* Muestras de pacientes y controles.

- F. **Solvente de lavamiento :** 1 ml es necesario para cada muestra o control que debe ser probado.

**Prepare una solución fresca** de diisopropiléter, ciclohexano, acetato de etilo, alcohol etílico puro (50, 40, 10 ,1 v/v) Según el número de extracciones, como se indica en la tabla a continuación.

**Tenga cuidado: la proporción exacta de cada solvente debe respetarse estrictamente.**

Número de extracción *	Diisopropiléter (ml)	Ciclohexano (ml)	Acetato de etilo (ml)	Alcohol etílico puro (μl)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

\* Muestras de pacientes y controles.

#### 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 18-25°C.
- Los calibradores y controles son muy inestables, utilizar inmediatamente después de la reconstitución, congelar inmediatamente en alicuotas 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.
- Despues 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.
- Despues 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 despues de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente numero de lote. Llevar todos los reactivos a 18-25°C antes de su uso.

Agitar minuciosamente 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.

Atención: El rendimiento del kit se definió en base a muestras analizadas por duplicado, por lo que es importante utilizar el kit como se recomienda en las instrucciones. Por este motivo, la cantidad de cartuchos proporcionados en el kit solo es suficiente para realizar la extracción para una determinación por duplicado de las muestras de los pacientes.

### 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 18-25°C (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 18-25°C (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. Despues 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 18-25°C (a 800 g).
10. **Vortexar** la fracción.

**Nota :** Depués 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. Despues del ultimo lavado, dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el liquido 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:
3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B<sub>0</sub>) de cada calibrador frente a las contracciones 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<sub>0</sub>) 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 (B<sub>0</sub>/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/B <sub>0</sub> (%)
Cuentas Totales	43937	
Calibrador		
0,0 pg/ml	16687	100,0
6,0 pg/ml	15268	91,5
20,0 pg/ml	12345	74,0
63,0 pg/ml	8033	48,1
230,0 pg/ml	3554	21,3
430,0 pg/ml	2148	12,9

## XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

### A. Límite de detección

El LOB (límite de blanco) se calculó midiendo el blanco varias veces y se calculó como la media: 1.65 desviaciones estándar de la distribución de los mejores valores. Se calculó que el LOB era de 0,55 pg / ml.

El LOD (límite de detección) se calculó como el LOB: 1.645 desviaciones estándar de una muestra de baja concentración analizada en 10 ejecuciones diferentes. Se calculó que el LOD era de 2,88 pg / ml.

El LOQ (límite de cuantificación) se calculó analizando 5 muestras de valores bajos 10 veces. Se calculó que el LOQ era de 8,5 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	92,31
25OH-Vitamina-D3	0,001
24,25(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D3	0,005
25,26(OH) <sub>2</sub> -Vitamina.D3	0,20

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

El rendimiento del ensayo no está afectado por la hemólisis (5 g/l de hemoglobina analizada), bilirrubinemia (1 g/l de bilirrubina analizada) o triglicéridos (2,5 g/l analizado).

Ácido ascórbico (Vitamina C)(1 g/l analizado) y bilirrubina conjugada (1 g/l analizada) no interfieren con este ensayo.

## Precision

### PRECISION INTRA-ENSAYO

### PRECISION INTER-ENSAYO

Suero	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	$\bar{X} \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	37,9 ± 2,6	6,8	A	10	13,6 ± 1,7	12,7
B	20	98,2 ± 7,3	7,4	B	10	32,3 ± 3,6	11,3

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

## D. Exactitud

### TEST DILUCIÓN

Dilución de la muestra	Concentración Teórica (pg/ml)	Concentración medida (pg/ml)	Recuperación (%)
1/1	70,0	70,0	100%
1/2	35,0	35,7	102%
1/4	17,5	14,5	83%
1/8	8,8	7,8	89%
1/16	4,4	4,6	105%

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrador r ó muestra)}}{\text{Cuentas ( Calibrador Cero)}} \times 100$$

Las muestras fueron diluidas con la Solución de elución

### TEST DE RECUPERACIÓN

1,25(OH)2-Vit.D añadida (pg/ml)	Concentración medida de 1,25(OH)2 Vit.D		Recuperación (%)
	Total (pg/ml)	Neta (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	46,3	23,8	95,2%
50,0	70,0	47,5	95,0%
100,0	122,7	100,2	100,2%

  

1,25(OH)2-Vit.D añadida (pg/ml)	Concentración medida de 1,25(OH)2 Vit.D		Recuperación (%)
	Total (pg/ml)	Neta (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	52,1	29,6	118,4%
50,0	70,4	47,9	95,8%
100,0	112,9	90,4	90,4%

### 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 percentilos 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 contenido substancias 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 pipetejar 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. RESUMEN DEL PROTOCOLO**

	CUENTAS TOTALES (μl)	CALIBRADORES (μl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (μl)
<b>EXTRACCIÓN</b>			
Calibradores	-	-	-
Muestras, controles	-	-	500
Solvente de Extracción	-	-	2000
Agitación Centrifugación	1 hora a 1200 rpm 5 minutos a 800 g		
<b>SEPARACIÓN</b>			
Supernatante de la fase de extracción	-	-	1600
<b>CARTUCHO</b>			
Supernatante	1600 μl		
Solvente de lavamiento	1000 μl		
Diclorometano	300 μl		
Agua destilada	300 μl		
Centrifugación	5 minutos a 800 g		
Solución de elución	400 μl		
Centrifugación	5 minutos a 800 g		
	<b>Vortexar</b>		
<b>INCUBACIÓN</b>			
Calibradores	-	150	-
Muestras extraídas	-	-	150
Trazador	500	500	500
Incubación	Una noche a 18-25°C		
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		



pt

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 84.99.91  
Ou o representante local

## III. SIGNIFICADO CLÍNICO

### A. Actividades Biológicas

A Vitamina D3 é maioritariamente sintetizada na pele a partir do 7-dehidrocolesterol e é obtida parcialmente através da dieta. No fígado, a Vitamina D3 é hidroxilada em carbono 25 para produzir o seu intermediário obrigatório, o 25-OH-D3. O 25-OH-D3 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-D3 é novamente hidroxilado na posição 1 $\alpha$ - para produzir a dihidroxivitamina D3 1 $\alpha$ , 25 (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3).

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>D3. A 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D3 é a forma activa da Vitamina D, tendo em conta as suas funções conhecidas, ao passo que a 25-OH-D3 e a própria Vitamina D3 podem ser excluídas como sendo fisiologicamente funcionais. Para além disto, uma vez que a 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3 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>D3 também poderá actuar noutros tecidos responsáveis pelo transporte de cálcio (placenta, rim, glândula mamária, ...) e noutras glândulas endócrinas com as glândulas paratiroideas. A 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D3 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 calcitrioco, um derivado carboxílico do C-23, sem qualquer tipo de actividade biológica. Para além deste percurso, a 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D3 passa por 24 hidroxilações para produzir a 1,24,25-trihidróxi-Vitamina D3. 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>D3 no plasma ou no soro são entre 100 a 1000 vezes menores do que os de 25-OH-D3. Devido às suas baixas concentrações e à presença de muitos metabolitos semelhantes, as análises da 1 $\alpha$ , 25-(OH)<sub>2</sub>D3 requerem a sua extração 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>D3 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(OH)<sub>2</sub> 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(OH)<sub>2</sub>, marcada com <sup>125</sup>I, compete com a Vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub> 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 18-25°C, a reacção 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(OH)<sub>2</sub> nas amostras são determinadas por interpolação da dose a partir da curva de calibração.

#### V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 48 Testes	Reconstituição
Tubos revestidos com anti Vitamina D 1,25(OH) <sub>2</sub>	1 x 48	<b>Pronto para utilizar</b>
Ag <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">125I</span>	1 recipiente liofilizado 75 kBq	<b>Adicione</b> 26 ml de solução de reconstituição
Marcador: Vitamina D 1,25(OH) <sub>2</sub> marcado com <sup>125</sup> I (grau HPLC) em tampão fosfato com caseína bovina e gentamicina		
CAL N	5 recipientes liofilizados	<b>Adicione</b> 2 ml de Solução de Eluição
Calibradores Vitamina D 1,25(OH) <sub>2</sub> N = 1 para 5 (ver os valores exactos nos rótulos do recipiente) em tampão fosfato com caseína bovina e gentamicina		
WASH SOLN CONC	1 recipiente 10 ml	<b>Dilua</b> 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
Solução de lavagem (TRIS-HCl)		
CONTROL N	2 recipientes liofilizados	<b>Adicione</b> 2 ml de água destilada
Controlos - N = 1 ou 2 No plasma humano e gentamicina		
REC SOLN	1 recipiente 30 ml	<b>Pronto para utilizar</b>
Solução de Reconstituição: em tampão fosfato com caseína bovina e azida (<0,1%)		
ELU SOLN	1 recipiente 30 ml	<b>Pronto para utilizar</b>
Solução de Eluição: em tampão fosfato com caseína bovina, metanol e azida (<0,1%)		
GEL	20	<b>Armazenar</b> à T.A.
Cartuchos Bond Elut Silica		

**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:

- Água destilada
- Diisopropiléter. (p.a.)
- Ciclohexano. (p.a.)
- Acetato de etilo. (p.a.)
- Etanol absoluto. (p.a.)
- Diclorometano (p.a.)

**NB:** Um kit de extração de DIAsource contendo todos esses solventes está disponível sob a referência # 3019700. Este kit contém quantidades de solventes necessários para extraír os controlos e amostras, para 5 kits de 1,25 (OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT, em medidas duplicadas.

- Pipetas automáticas: 200 µl, 500 µl, 1 ml e 2 ml (recomenda-se a utilização de pipetas precisas, com pontas descartáveis)
- Tubos de vibro (12 x 75 mm) para proceder à extração e eluição (fechados com uma tampa durante o processo de extração).
- Tubos de vidro (16 x 100 mm) ou (12 x 120 mm), ou tubos em polipropileno (falcon 2097), para a lavagem dos cartuchos.
- Misturador de vórtice
- Agitador magnético
- Centrifugadora a 800 g
- Agitador de tubos (1200 rpm)
- Pipeta automática de 5 ml para lavagem (tipo Cornwall)
- Sistema de aspiração (opcional)
- Qualquer contador de raios gama capaz de medir <sup>125</sup>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.
- I<sup>125</sup> Vitamina D 1,25(OH)<sub>2</sub>:** 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 extração:** 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) de acordo com o número de extrações, conforme indicado na tabela abaixo.  
**Tenha cuidado: a proporção exata de cada solvente deve ser estritamente respeitada.**

Número de extração *	Diisopropiléter (ml)	Ciclohexano (ml)	Acetato de etilo (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\* Amostras e controles do paciente

- 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) de acordo com o número de extrações, conforme indicado na tabela abaixo.  
**Tenha cuidado: a proporção exata de cada solvente deve ser estritamente respeitada.**

Número de extração *	Diisopropiléter (ml)	Ciclohexano (ml)	Acetato de etilo (ml)	Etanol (µl)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

\* Amostras e controles do paciente

#### 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 18-25°C.
- Os calibradores e os controlos são muito instáveis, utilize-os imediatamente após a sua reconstituição, congele-os logo de seguida em aliquotas e mantenha-os à temperatura de -20°C durante três meses. Evite realizar ciclos de congelação 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 extração 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 18-25°C (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.

Atenção: O desempenho do kit foi definido com base em amostras testadas em duplicata, por isso é importante usar o kit conforme recomendado nas instruções. Por esse motivo, a quantidade de cartuchos fornecida no kit é suficiente apenas para realizar a extração para determinação em duplicata das amostras do paciente.

#### **B. Procedimento**

##### **I. Procedimento de extração: ! Apenas para controlos e amostras.**

1. Tubos de vidro graduados (12x75 mm) para proceder à extração 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 extração 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 18-25°C (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 flutuante (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 18-25°C (a 800 g).
8. Rotule os tubos de vaso 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 18-25°C (a 800 g).
10. Agite a fração 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 18-25°C
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:

$$\text{B/B0 (\%)} = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

3. Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log trace os valores (B/B0(%)) 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/B0(%)), 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> (B0/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/Bo (%)
Contagens total	43937	
Calibrador		
0,0 pg/ml	16687	100,0
6,0 pg/ml	15268	91,5
20,0 pg/ml	12345	74,0
63,0 pg/ml	8033	48,1
230,0 pg/ml	3554	21,3
430,0 pg/ml	2148	12,9

## **XIII. DESEMPENHOS E LIMITES**

#### **A. Limite de detecção**

O LOB (Limite de Branco) foi calculado medindo o branco várias vezes e foi calculado como a média - 1,65 desvios padrão da distribuição dos melhores valores. O LOB foi calculado como sendo 0,55 pg / ml.

O LOD (limite de detecção) foi calculado como o LOB - 1.645 desvios padrão de uma amostra de baixa concentração testada em 10 execuções diferentes. O LOD foi calculado como sendo 2,88 pg / ml.

O LOQ (Limite de Quantificação) foi calculado testando 5 amostras de valores baixos 10 vezes. O LOQ foi calculado como sendo 8,5 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>	92,31
Vitamina D3 25OH	0,001
Vitamina D3 24,25(OH) <sub>2</sub>	0,005
Vitamina D3 25,26(OH) <sub>2</sub>	0,20

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

O desempenho do ensaio não é afetado pela hemólise (5 g / L de hemoglobina testado), bilirrubinemia (1 g / L de bilirrubina testados) ou triglicéridos (2,5 g / L testado).

Ácido ascórbico (vitamina C) (1 g / L testado) e conjugado de bilirrubina (1 g / L testado) não interferem com este ensaio.

#### C. Precisão

##### PRECISÃO INTRA-ENSAIO

##### PRECISÃO INTER-ENSAIO

Soro	N	$\bar{X} \pm DP$ (pg/ml)	CV (%)	Soro	N	$\bar{X} \pm DP$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	37,9 ± 2,6	6,8	A	10	13,6 ± 1,7	12,7
B	20	98,2 ± 7,3	7,4	B	10	32,3 ± 3,6	11,3

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

#### D. Exactidão

##### TESTE DE DILUIÇÃO

Diluição da amostra	Concentração teórica	Concentração medida	Recuperado
	(pg/ml)	(pg/ml)	(%)
1/1	70,0	70,0	100%
1/2	35,0	35,7	102%
1/4	17,5	14,5	83%
1/8	8,8	7,8	89%
1/16	4,4	4,6	105%

As amostras foram diluídas com Solução de Eluição.

##### TESTE DE RECUPERAÇÃO

Adicionado 1,25(OH)2-Vit.D (pg/ml)	Concentrações Medidas 1,25(OH)2 Vit.D		Recuperado (%)
	Total (pg/ml)	Em branco (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	46,3	23,8	95,2%
50,0	70,0	47,5	95,0%
100,0	122,7	100,2	100,2%

  

Adicionado 1,25(OH)2-Vit.D (pg/ml)	Concentrações medidas 1,25(OH)2 Vit.D		Recuperado (%)
	Total (pg/ml)	Em branco (pg/ml)	
0,0	22,5		
25,0	52,1	29,6	118,4%
50,0	70,4	47,9	95,8%
100,0	112,9	90,4	90,4%

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  $^{125}\text{I}$  (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e  $\gamma$  (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.

Evide 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 auxilio 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)	CALIBRA-DORES (µl)	CONTROLOS DAS AMOSTRAS (µl)
<b>EXTRACÇÃO</b> Calibradores Controlos, Amostras Solvete de extracção	- - -	- - -	- 500 2000
Mistura Centrifugação	1 hora a 1200 rpm 5 minutos a 800 g		
<b>SEPARAÇÃO</b> Matéria flutuante resultante do procedimento de extração	-	-	1600
<b>CARTUCHO</b> Matéria flutuante Solvete de Lavagem Diclorometano Água destilada Centrifugação Solução de Eluição Centrifugação	1600 µl 1000 µl 300 µl 300 µl 5 minutos a 800 g 400 µl 5 minutos a 800 g <b>Vórtice</b>		
<b>INCUBAÇÃO</b> Kalibratoren Amostras extraídas Tracer	- - 500	150 - 500	- 150 500
Incubação	De um dia para o outro à 18-25°C		
Separação Solução de lavagem de trabalho Separação Solução de lavagem de trabalho Separação	- - - - -	aspirar (ou decante) 2,0 ml aspirar (ou decante) 2,0 ml aspirar (ou decante)	
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

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: Kit 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 84.99.91

### III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

- A. Βιολογική δράση  
Η βιταμίνη D<sub>3</sub> συντίθεται κυρίως στο δέρμα από την 7- δεύδροχοληστερόλη και έχει εν μέρει διατροφική προέλευση. Στο ήπαρ, η βιταμίνη D<sub>3</sub> υδροχυλίνεται στον άνθρακα 25 και παράγει την αναγκαστικά ενδιάμεση ένωση 25-OH-D<sub>3</sub>. Η 25-OH-D<sub>3</sub> 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 κύησης. Έτσι, η 25-OH-D<sub>3</sub> υδροχυλίνεται περαιτέρω στην 1α-θέση και παράγει την 1α,25 διυδροχυτιαμίνη D<sub>3</sub> (1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Εκτός του νεφρικού ιστού, ο πλακούντας εγκύων γυναικών και τα μακροφάγα κύτταρα, σε περίπτωση σάρκοειδών, μπορούν επίσης να παράγουν κάποια ποσότητα 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Η 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> είναι η δραστική μορφή της Βιταμίνης D σε σχέση με τις γνωστές λειτουργίες, ενώ η 25-OH-D<sub>3</sub> και η ίδια η βιταμίνη D<sub>3</sub> μπορούν να εξαιρεθούν εφόσον είναι φυσιολογικά λειτουργικές. Επιπλέον, εφόσον η 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 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 οστική αναρρόφηση τόσο του ασθεστίου όσο και του ωφελόρου. Επίσης διεγείρει την οστική αναρρόφηση και προσθήκη μεταλλικών στοιχείων προλαμβάνοντας έτσι την ανάπτυξη ραχίτιδας και οστεομαλακίας.  
Η 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> θα μπορούσε επίσης να είναι δραστική σε άλλους ιστούς υπεύθυνους για τη μεταφορά του ασθεστίου (πλακούντας, νεφρός, θηλαστικός αδένας, ...) και ενδοκρινείς αδένες όπως οι παραθυρεοειδείς αδένες. Η 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 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>D<sub>3</sub> υπόκειται σε 24-υδροχυλίωση και παράγει 1,24,25-τριυδροχυ-Βιταμίνη D<sub>3</sub>. Η ένωση αυτή έχει μικρότερη βιολογική δράση από την πρόδρομη ένωση και αυτός ο μεταβολισμός θεωρείται ως ελάσσονας οδός.  
Τα επίπεδα της 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> στο πλάσμα ή τον ορό είναι 100 έως 1000 λιγότερο από εκείνα της 25-OH-D<sub>3</sub>. Λόγω των χαμηλών συγκεντρώσεών της και της παρουσίας πολλών παρόμοιων μεταβολιτών, η μέτρηση της 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> απαιτεί εκχύλιση και διαχωρισμό είτε με HPLC είτε με χρωματογραφία στήλης.
- B. Κλινική εφαρμογή  
Η μέτρηση της κυκλοφορούσας 1α,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ενδείκνυται σε αρκετές διαταραχές που επηρεάζουν το μεταβολισμό του ασθεστίου 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  $^{125}\text{I}$ -Βιταμίνης-D από άλλους μεταβολίτες της Βιταμίνης D. Μετά από έκλουση των δείγμάτων και των ορών ελέγχου, οι βαθμονομητές, τα δείγματα και οι οροί ελέγχου εποδέχονται σε επιστρωμένα σωληνάρια. Μετά σταθερή ποσότητα  $^{125}\text{I}$ -Βιταμίνης D που θα μετρηθεί, η οποία υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου πολυυπορεύεται. Μετά από επώαση καθ' όλη τη διάρκεια της νύκτας σε  $18\text{--}25^\circ\text{C}$ , η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με διάλυμα πλύσης και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις  $^{125}\text{I}$ -Βιταμίνης D των δείγμάτων με αναγογή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

#### V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 48 προσδιορισμών	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντί $^{125}\text{I}$ -Βιταμίνη D	1 x 48	Έτοιμο για χρήση
Ag <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><math>^{125}\text{I}</math></span>	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο 75 kBq	Προσθέστε 26 ml διάλυμας ανασύστασης
IXNHΘΕΤΗΣ: $^{125}\text{I}$ -Βιταμίνη D σημασμένη με $^{125}\text{I}$ οδίνη (tόπου HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βάσει καζεΐνη και γενταμυκίνη.		
CAL N	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	Προσθέστε 2 ml Διάλυμα έκλουσης
Βαθμονομητές - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές στις επικέτες των φιαλιδίων) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βάσει καζεΐνη και γενταμυκίνη		
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	Αριθμήστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	Προσθέστε 2 ml απεσταγμένου νερού
Oροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με γενταμυκίνη		
REC SOLN	1 φιαλίδιο 30 ml	Έτοιμο για χρήση
Διάλυμα ανασύστασης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βάσει καζεΐνη και αζίδιο (<0,1%)		
ELU SOLN	1 φιαλίδιο 30 ml	Έτοιμο για χρήση
Διάλυμα έκλουσης: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βάσει καζεΐνη, μεθανόλη και αζίδιο (<0,1%)		
GEL	20	Φύλαξη σε θερμ. δωματίου
Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut		

Σημείωση: Χρησιμοποιήστε διάλυμα έκπλυσης για τον μηδενικό βαθμονομητή και για την αραίωση των δείγμάτων για τιμές υψηλότερες από αυτές του υψηλότερου βαθμονομητή (αραίωστε μετά το στάδιο της διαχορίσμου).

#### VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Διυστροπολικός αιθέρας. (p.a.)
- Κυκλοεξάνιο (p.a.)
- Οξικός αιθυλεστέρας. (p.a.)
- Αιθανόλη 100% (p.a.)
- Διγλωρομεθάνιο (p.a.)

Σημείωση: Ένα κιτ εξαγωγής DIAsource που περιέχει όλους αυτούς τους διαλύτες διατίθεται με την αναφορά # 3019700. Αυτό το κιτ περιέχει ποσότητες διαλυτών που είναι απαραίτητες για την εκχύλιση των μαρτύρων και των δείγμάτων για 5 κιλά  $^{125}\text{I}$ -Βιταμίνη D-VIT.D-RIA-CT, σε διπλές μετρήσεις.

- Πιπέτες για διανομή: 200 μl, 500 μl, 1 ml και 2 ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Γυάλινα σωληνάρια (12 x 75 mm) για εκχύλιση και έκλουση. (κλειστά με πόμα για το βήμα της εκχύλισης)
- Υάλινα σωληνάρια (16 x 100 mm) ή (12 x 120 mm) ή σωληνάρια από πολυπροπυλένιο (falcon 2097) για την πλύση των φυσίγγων.
- Αναμείκητης στροβιλίσμου
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Συσκευή φυγοκέντρισης στα 800 g.
- Συσκευή ανάδευσης σωληναρίων (1200 rpm)
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (tόπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναφρόσης (προαιρετικό)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ποιοισδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της  $^{125}\text{I}$  (ελάχιστη απόδοση 70%).

#### VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΑΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές: Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 2 ml Διάλυμα έκλουσης (ακριβώς πριν το βήμα επώασης).
- Οροί ελέγχου: Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 2 ml απεσταγμένο νερού.
- $^{125}\text{I}$ -Βιταμίνη D: Ανασυστήστε με 26 ml διαλύματος ανασύστασης.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας: Προετοιμάστε επαρκή όγκου διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.
- Ειδιαλύτης εκχύλισης: Απαιτείται 2 ml για κάθε ορό ελέγχου ή δείγμα που πρόκειται να υποβληθεί σε προσδιορισμό. **Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα** από διυστροπολιαθέρα, κυκλοεξάνη, αιθυλακετικό, απόλυτη αλκοόλη (50, 40, 10, 10 v/v) σύμφωνα με τον αριθμό των εκχύλισεων, όπως αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

Προσέξτε: πρέπει να τηρείται αυστηρά η ακριβής αναλογία κάθε διαλύτη.

Εξαγωγή*	δυισοπροπολιαθέρα (ml)	κυκλοεξάνη (ml)	αιθυλακετικό (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\* Δείγματα και έλεγχοι ασθενών

ΣΤ. Διαλύτης πλύσης: Απαιτούνται 1 ml για κάθε ορό ελέγχου ή δείγμα που πρόκειται να υποβληθεί σε προσδιορισμό.

Προετοιμάστε ένα φρέσκο διάλυμα από διυστροπολιαθέρα, κυκλοεξάνη, αιθυλακετικό, απόλυτη αλκοόλη (50, 40, 10, 10 v/v) σύμφωνα με τον αριθμό των εκχύλισεων, όπως αναφέρεται στον παρακάτω πίνακα.

Προσέξτε: πρέπει να τηρείται αυστηρά η ακριβής αναλογία κάθε διαλύτη.

Εξαγωγή*	δυισοπροπολιαθέρα (ml)	κυκλοεξάνη (ml)	αιθυλακετικό (ml)	απόλυτη αλκοόλη (μl)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

\* Δείγματα και έλεγχοι ασθενών

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

- σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως  $8^\circ\text{C}$ . Εξαιρούνται οι φύσιγγες, οι οποίες πρέπει να φυλάσσονται σε  $18\text{--}25^\circ\text{C}$ .
- Οι βαθμονομητές και οι οροί ελέγχου είναι πολύ ασταθείς. Χρησιμοποιείτε τα αμέσως μετά την ανασύσταση, καταγγέλτε αμέσως σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και διατηρείτε τα στους  $-20^\circ\text{C}$  επί 3 μήνες. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους καταγγυξης-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  $8^\circ\text{C}$ .
- Χρησιμοποιήστε φρέσκο διαλύτη εκχύλισης και διαλύτη πλύσης, μην τους φυλάσσετε.

- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν ασθεία 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 την επακόλουθη κούλους κατάνυξης-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. ΛΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- 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 18-25°C πριν από τη χρήση.  
Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση.  
Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστήριου και δείγματος προκειμένου να απορρύγετε την επιμόλυνση.  
Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπέτων υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξπλόσιου διανομής με πιπέτες.  
Τηρείτε τους χρόνους επώασης.  
Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.  
Προσοχή! Η απόδοση του κιτ καθορίστηκε με βάση δείγματα που δοκιμάστηκαν εις διπλούν, επομένως είναι σημαντικό να χρησιμοποιείτε το κιτ όπως συνιστάται στις οδηγίες. Για το λόγο αυτό, η ποσότητα των φυσιγγίων που παρέχονται στο κιτ επαρκεί μόνο για την εκτέλεση της εξαγωγής για έναν διπλό προσδιορισμό των δειγμάτων ασθενών.

### 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. Διανείμετε 2 ml διαλύντη εκχύλισης σε κάθε σωληνάριο.
4. Τα σωληνάρια είναι κλειστά με πόδια και τοποθετούνται σε συσκευή ανάδευσης επί 1 ώρας στις 1200 rpm.
5. Φυγοκεντρίστε κάθε σωληνάριο επί 5 λεπτά σε 18-25°C (στα 800 g).
6. Απαιτούνται υπερκείμενα για το επόμενο βήμα του διαχωρισμού.

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

1. Σημάνετε τα υάλινα σωληνάρια των 16 x 100 mm ή των 12 x 120 mm ή τα σωληνάρια πολύπρωτων (falcon 2097) για της φύσιγγες πλύσης: 2 οροί ελέγχου και έως 16 δείγματα.
2. Βάλτε μια φωνήγα "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 αντιδραστηρίου). ! Προσέξτε να μην εισάγαγετε ποτέ κενό στις φύσιγγες, απλώς αφήστε το διαλύτη να κυλήσει μέσω της βαρύτητας.
5. Προσθέτε 300 μl διγλωρομεθανίου σε κάθε φύσιγγα, αφήστε το να κυλήσει με τη βαρύτητα.
6. Προσθέτε 300 μl απεσταγμένου νερού σε κάθε φύσιγγα.
7. Φυγοκεντρίστε κάθε σωληνάριο επί 5 λεπτά σε 18-25°C (στα 800 g).
8. Σημάνετε τα υάλινα σωληνάρια (12 x 75 mm) για έκλουση της 1,25(OH)<sub>2</sub>-Βιταμίνης D. Μετά τη φυγοκεντρίση, μεταφέρετε τις φύσιγγες σε αντίστοιχα υάλινα σωληνάρια.
9. Βάλτε 400 μl διαλύματος έκλουσης σε κάθε φύσιγγα για να γίνει έκλουση της 1,25(OH)<sub>2</sub>-Βιταμίνης D και φυγοκεντρίστε επί 5 λεπτά σε 18-25°C (στα 800 g).
10. Υποβάλλετε το εκλουσθέν 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 βαθμονόμητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του  $^{125}\text{I}$  ("total"), σημάνετε 2 κουνά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
2. Αναμειξτε για λίγο (με αναμείκητη στροβιλισμού τύπου vortex) τους εκχυλισμένους ορούς ελέγχου και τα δείγματα και διανείμετε 150 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια (Χρησιμοποιήστε διάλυμα έκλουσης ως μηδενικό βαθμονόμητο ).
3. Διανείμετε 500 μl 1,25(OH)<sub>2</sub>-Βιταμίνης D σημασμένης με  $^{125}\text{I}$  σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του  $^{125}\text{I}$  ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επωάστε όλη τη νύχτα σε 18-25°C.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του  $^{125}\text{I}$  ("total")). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πιθανόν του επιστρωμένον 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  $^{125}\text{I}$  ("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  $^{125}\text{I}$  ("total")).
9. Πλύνετε τα σωληνάρια και πάλι με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του  $^{125}\text{I}$  ("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 δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονόμητη (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B / B0(%) = \frac{\text{Κρούσεις(BΒαθμονομήτης ή δείγμα)}{\text{Κρούσεις(ΜΜηδενικούβαθμονομητής)}} \times 100$$

3. Με χρήση ημιλογαριθμικού χαρτιού γραφικής ή χαρτιού γραφικής logit-log 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0(%)) για κάθε σημείο βαθμονόμητης συνάρτησης της  $^{125}\text{I}$ -Βιταμίνης D για κάθε σημείο βαθμονόμητης. 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 αναγώγη των τιμών των δειγμάτων (B/B0 (%)), 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 των συνολικού  $^{125}\text{I}$  που δεσμεύεται εν τη απονίσια μη σημασμένης 1,25(OH)<sub>2</sub>-Βιταμίνης D (B/B0%).

## XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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/B0 (%)
Κρούσεις του $^{125}\text{I}$ ("total")	43937	
Βαθμονόμητης		
0,0 pg/ml	16687	100,0
6,0 pg/ml	15268	91,5
20,0 pg/ml	12345	74,0
63,0 pg/ml	8033	48,1
230,0 pg/ml	3554	21,3
430,0 pg/ml	2148	12,9

## XIII. ΑΠΟΛΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

### A. Όριο ανίχνευσης

Το LOB (Όριο κενών) υπολογίστηκε με τη μέτρηση του τυφλού χιτώνα αρκετές φορές και υπολογίστηκε ως η μέση - 1,65 τυπικές αποκλίσεις της κατανομής των καλύτερων τιμών. Η LOB υπολογίστηκε ότι είναι 0,55 pg / ml.

Το LOD (όριο ανίχνευσης) υπολογίστηκε ως τυπικές αποκλίσεις LOB - 1.645 ενός δείγματος χαμηλής συγκέντρωσης που δοκιμάστηκε σε 10 διαφορετικές δοκιμές. Η LOD υπολογίστηκε ότι είναι 2,88 pg / ml.

Το LOQ (Όριο ποσοτικοποίησης) υπολογίστηκε με δοκιμή 5 δειγμάτων χαμηλών τιμών 10 φορές. Η LOQ υπολογίστηκε ότι είναι 8,5 pg / ml.

### B. Ειδικότητα

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

Ένωση	Διασταυρούμενη αντιδραση (%)
1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη D <sub>3</sub>	100
1,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη D <sub>3</sub>	92,31
25OH-Βιταμίνη-D3	0,001
24,25(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη-D <sub>3</sub>	0,005
25,26(OH) <sub>2</sub> -Βιταμίνη-D <sub>3</sub>	0,20

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

Η απόδοση του προσδιορισμού δεν επηρεάζεται από αιμόλυνση (ελέγχθηκαν 5 g/L αιμοστραίνης), χολερυθρίνα (ελέγχθηκε 1 g/L χολερυθρίνης) ή τριγλυκερίδια (ελέγχθηκαν 2,5 g/L).

Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (ελέγχθηκε 1g/L) και το σύζευγμα χολερυθρίνης (ελέγχθηκε 1g/L) δεν προκαλούν παρεμβολή σε αυτόν τον προσδιορισμό.

## G. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ  
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	$\text{C}_{\text{X}} \pm \text{T.A.}$ (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	$\text{C}_{\text{X}} \pm \text{T.A.}$ (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	37.9 ± 2.6	6.8	A	10	13.6 ± 1.7	12.7
B	20	98.2 ± 7.3	7.4	B	10	32.3 ± 3.6	11.3

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

## D. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Αραιώση δείγματος	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρημένη συγκέντρωση (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
1/1	70,0	70,0	100%
1/2	35,0	35,7	102%
1/4	17,5	14,5	83%
1/8	8,8	7,8	89%
1/16	4,4	4,6	105%

Το δείγμα αραιώθηκε με διάλυμα έκλουσης.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Προσθήκη 1,25(OH)2-βιτ.Δ (pg/ml)	Μετρημένες συγκεντρώσεις 1,25(OH)2 βιτ.Δ Συνολική (pg/ml)	Με αναφορά τυφλού (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
0,0	22,5		
25,0	46,3	23,8	95,2%
50,0	70,0	47,5	95,0%
100,0	122,7	100,2	100,2%
Προσθήκη 1,25(OH)2-βιτ.Δ (pg/ml)	Μετρημένες συγκεντρώσεις 1,25(OH)2 βιτ.Δ Συνολική (pg/ml)	Με αναφορά τυφλού (pg/ml)	Ανάκτηση (%)
0,0	22,5		
25,0	52,1	29,6	118,4%
50,0	70,4	47,9	95,8%
100,0	112,9	90,4	90,4%

### Συντελεστής μετατροπής:

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

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

## 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 ασυμφονία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα 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 παραπρηθέν πεδίο τιμών, με βάση τα ποσοστά επί τους 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

### Ασφαλείας

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το κιτ αυτό περιέχει το  $^{125}\text{I}$  (Χρόνος ημιζωνής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονιζόντα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αντό 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 χρησιμεύεται 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 μολύνθονται με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊστόποτων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφαλείας 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 ασφαλείας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

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

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

Αποφένετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αξιόδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αξιόδιο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αξιόδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την απογέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αξιόδιου.

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

	ΚΡΟΥΣΕΙΣ "TOTAL" μl	ΒΑΘΜΟΝΟ- ΜΗΤΕΣ 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 πλάσης 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 στροβιλισμού
<b>ΕΠΙΩΑΣΗ</b> Βαθμονομητές Εκχύλισμένα δείγματα Ιχνηθέτης	- - 500	150 - 500	- 150 500
Επώαση		Όλη τη νύχτα σε 18-25°C	
Διαχωρισμός Διάλυμα πλάσης Διαχωρισμός Διάλυμα πλάσης 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.	

**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)2-witaminy D (1,25(OH)2-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 84.99.91**

### ***III. INFORMACJE KLINICZNE***

#### A. Aktywność biologiczna

Witamina D3 jest syntetyzowana głównie w skórze z 7-dehydrocholesterolu, oraz częściowo pochodzi ze składników pokarmowych. W wątrobie, cała witamina D3 ulega hydroksylacji przy 25 atomie węgla, tworząc 25-OH-D3. Związek 25-OH-D3, zanim zacznie wykazywać biologiczną aktywność witaminy D w jelcie cienkim, nerkach i kości, musi ulec dalszym przemianom metabolicznym. U ssaków niecieżarnych, takie przemiany zachodzą wyłącznie w nerkach. Witamina 25-OH-D3 ulega dalszej hydroksylacji w pozycji 1 $\alpha$ , tworząc 1 $\alpha$ ,25 dihydroksywitaminę D3 (1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3).

Oprócz tkanki nerkowej, pewne ilości  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  są wytwarzane w łożyskach kobiet ciężarnych oraz w makrofagach w stanach zapalenia tkanki mięsakowatej (sarcoiditis). Znane funkcje witaminy D3 odnoszą się do postaci  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ , podczas gdy  $25-OH-D_3$  i sama witamina D3 nie przejawia istotnej aktywności fizjologicznej. Ponadto, z uwagi na wytwarzanie  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  w nerkach, oraz działanie tego związku w tkance kostnej i jelitie cienkim, należy traktować  $1\alpha,25-(OH)_2D_3$  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 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> może również być aktywny w innych tkankach odpowiedzialnych za transport wapnia (żołądko, nerki, gruczoł sutkowy,...), oraz w gruczołach endokrynowych, takich jak przytarczyce. 1 $\alpha$ ,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 kalcytrylowy, 23-węglowa pochodna, która nie przejewia żadnej aktywności biologicznej. Oprócz tej drogi metabolicznej, 1 $\alpha$ ,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 przejewia mniejszą aktywność biologiczną niż jego prekursor, a ten szlak metaboliczny odgrywa mniejsze znaczenie.

Poziomy 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3 w osoczu lub w surowicy wynoszą od 100 do 1000 i są niższe od poziomów 25-OH-D3. Ze względu na niskie stężenia i obecność wielu podobnych metabolitów, pomiar 1 $\alpha$ ,25-(OH)<sub>2</sub>D3 wymaga ekstrakcji i separacji albo za pomocą HPLC, albo chromatografii kolumnowej.

#### B. Zastosowania kliniczne

Pomiary krającej  $1\alpha,25-(OH)D_3$  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, kalibrator, próbki i kontrole są inkubowane w opaszczonej probówkach. Stała ilość 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminy D znakowanej 125I współzawodniczy z 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitaminą D obecną w badanej próbce lub w kalibratorze o stałą ilość miejsc na przeciwniakach, unieruchomionych na ściankach probówki polistyrenowej. Po całodniowej inkubacji w 18-25°C, wykonanie aspiracji przerywa reakcję kompetencyjną. Następnie próbki są płukane za pomocą roztworu do płukania i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitaminy D są określone na podstawie odniesienia dawki z krzywej kalibracyjnej.

#### V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 48 oznać	Rekonstytucja
Probówki opłaszczone anty-1,25(OH) <sub>2</sub> -vitamina D	1 x 48	<b>Gotowe</b> do zastosowania.
Ag 125I	1 fiolka materiał liofilizowany 75 kBq	<b>Daj</b> 26 ml roztworu do rekonstytucji.
ZNACZNIK IZOTOPOWY: 1,25(OH) <sub>2</sub> -vitamina D oznakowany jodem <sup>125</sup> (poziom HPLC) w buforze fosforanowym wraz z kazeiną bydlęcą i gentamycyną.		
CAL N	5 fiolek materiał liofilizowany	<b>Daj</b> 2 ml roztworu do elucji
Kalibrator - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w buforze fosforanowym wraz z kazeiną bydlęcą i gentamycyną..		
WASH SOLN CONC	1 fiolka 10 ml	<b>Rozcieńczy</b> 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
Roztwór pluczający (TRIS HCl)		
CONTROL N	2 fiołki materiał liofilizowany	<b>Dodać</b> 2 ml wody destylowanej
Kontrole - N = od 1 do 2 w osoczu ludzkiej z gentamycyną		
REC SOLN	1 fiolka 30 ml	<b>Gotowe</b> do zastosowania.
Roztwór do rekonstytucji : bufor fosforanowy z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%)		
ELU SOLN	1 fiolka 30 ml	<b>Gotowe</b> do zastosowania.
Roztwór do elucji: bufor fosforanowy z kazeiną bydlęcą, metanolem i azydkiem (<0,1%)		
GEL	20	<b>Przechowywać</b> w 18-25°C.
Pojemniki Bond Elut Silica		

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:

- Woda destylowana
- Dwuzopropyloeter. (p.a.)
- Cykloheksan. (p.a.)
- Octan etylu. (p.a.)
- Etanol absolutny. (p.a.)
- Dwuchlorometan. (p.a.)

NB: Zestaw do ekstrakcji DIAsource zawierający wszystkie te rozpuszczalniki jest dostępny pod numerem referencyjnym # 3019700. Zestaw zawiera ilości rozpuszczalników niezbędnych do ekstrakcji

#### kontroli i próbek dla 5 zestawów 1,25 (OH)<sub>2</sub>-VIT.D-RIA-CT, w dwóch powtórzeniach.

- Pipety do dozowania: 200 µl, 500 µl, 1 ml i 2 ml (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi).
- Probówki szklane (12 x 75 mm) do ekstrakcji i elucji. (zamknięte korkiem do etapu ekstrakcji).
- Probówki szklane (16 x 100 mm) lub (12 x 120 mm), lub probówki polipropylenu (falcon 2097), do płukania pojemników.
- Mieszadło wirowe
- Mieszadło magnetyczne
- Wirowka 800 g
- Wytrząsarka próbówek (1200 rpm)
- Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
- Układ do aspiracji (opcjonalnie)
- Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru <sup>125</sup>I (minimalny uzysk 70%)

#### VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Kalibrator:** Kalibrator rozpuścić za pomocą 2 ml roztworu do elucji (bezpośrednio przed etapem inkubacji).
- Kontrole:** Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 2 ml wody destylowanej.
- 1<sup>25</sup> 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D:** Rozpuścić za pomocą 26 ml roztworu do rekonstytucji.
- Roboczy roztwór pluczający:** Właściwą objętość roboczego roztworu pluczającego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu pluczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór pluczający należy wylać pod koniec dnia.
- Rozpuszczalnik do ekstrakcji:** Potrzeba 2 ml na każdą badaną kontrolę lub próbkę. Przygotuj świeży roztwór diizopropyloeteru, cykloheksanu, octanu etylu (w proporcji 50, 40, 10) zgodnie z liczbą ekstrakcji, jak wskazano w poniższej tabeli.  
**Uważaj: dokładna proporcja każdego rozpuszczalnika musi być ścisłe przestrzegana.**

Liczba ekstrakcji *	Diizopropyloeteru (ml)	Cykloheksanu (ml)	Octanu etylu (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

\* Próbki pacjentów i kontrole

- Rozpuszczalnik do płukania:** Potrzeba 1 ml na każdą badaną kontrolę lub próbkę. Przygotuj świeży roztwór diizopropyloeteru, cykloheksanu, octanu etylu, bezwodnego etanolu (w proporcji 50, 40, 10, 1) zgodnie z liczbą ekstrakcji, jak wskazano w poniższej tabeli.  
**Uważaj: dokładna proporcja każdego rozpuszczalnika musi być ścisłe przestrzegana.**

Liczba ekstrakcji *	Diizopropyloeteru (ml)	Cykloheksanu (ml)	Octanu etylu (ml)	Bezwodnego etanolu (µl)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

\* Próbki pacjentów i kontrole

#### VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C; z wyjątkiem pojemników, które muszą być przechowywane w 18-25°C.
- Kalibrator 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.
- Świeże przygotowany roboczy roztwór pluczający powinien być wykorzystywany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znaczek izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiolce 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**

- Próbki 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 upłynięciu podanej daty ważności.

Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.

Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.

Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia.

Przestrzegać czasów inkubacji.

Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

**Uwaga:** Wydajność zestawu została określona na podstawie próbek przetestowanych w dwóch powtórzeniach, dlatego ważne jest, aby używać zestawu zgodnie z zaleceniami instrukcji. Z tego powodu ilość wkładów znajdujących się w zestawie jest wystarczająca tylko do przeprowadzenia ekstrakcji w celu podwójnego oznaczenia próbek pacjentów.

### **B. Procedura**

#### **I. Ekstrakcja: ! Dotyczy wyłącznie kontroli i próbek.**

1. Oznaczyć szklane próbówki (12 x 75 mm) do ekstrakcji: 2 kontrole i do 16 próbek.
2. Dodać 0,5 ml kontroli lub próbki do odpowiedniej próbówki.
3. Dodać do każdej próbówki 2 ml rozpuszczalnika do ekstrakcji.
4. Probówki są zamknięte korkiem i umieszczane w wytrząsarce na 1 godzinę przy 1200 obr/min.
5. Wirować każdą próbówkę przez 5 minut w 18-25°C (przy 800 g).
6. Supernatanty są potrzebne do dalszych etapów separacji.

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

1. Oznaczyć próbówki szklane (16 x 100 mm) lub (12 x 120 mm), lub próbówki polipropylenowe (falcon 2097), do płukania pojemników: 2 kontrole i do 16 próbek.
2. W każdej próbówce 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 spływać siłami grawitacji.
5. Na każdy pojemnik dodać po 300 µl dwuchlorometanu, pozostawić do spłygnięcia siłami grawitacji.
6. Na każdy pojemnik dodać po 300 µl wody destylowanej.
7. Wirować każdą próbówkę przez 5 minut w 18-25°C (800 g).
8. Oznaczyć szklane próbówki (12 x 75 mm) do elucji 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminy D, Po odwirowaniu, przenieść pojemniki do odpowiednich szklanych próbówek.
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 18-25°C (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 opłaszczonej próbówce, aby uniknąć degradacji.

### **III. Inkubacja :**

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standarde probówki.
2. Od razu wymieszać (na worteksie) kalibrator (jako kalibrator zerowy wykorzystać roztwór do elucji), ekstrahowane kontrole i próbki oraz dodać po 150 µl do odpowiednich próbówek.
3. Do każdej próbówki, w tym do próbówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 500 µl 1,25(OH)<sub>2</sub>-witamina D oznakowanego jodem125.
4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwięzionych pęcherzyków powietrza.
5. Inkubować przez jedną noc w 18-25°C.

6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
7. Przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
8. Aspirować (lub osuszyć) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania).
9. Ponownie przepłukać próbki za pomocą 2 ml roztworu do płukania (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania) a następnie aspirować (lub osuszyć).
10. Po ostatnim płukaniu, pozostawić próbki odwrócone przez 2 minuty a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
11. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

## **XI. OBLCZANIE 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 półogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B(0%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminy 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(0 %)) próbki należy określić stężenia 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminy D w próbce z krzywej kalibracyjnej.
6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakanego 1,25(OH)<sub>2</sub>-witaminy D (B0/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	43937	
Kalibrator	0,0 pg/ml 6,0 pg/ml 20,0 pg/ml 63,0 pg/ml 230,0 pg/ml 430,0 pg/ml	16687 15268 12345 8033 3554 2148
		100,0 91,5 74,0 48,1 21,3 12,9

## **XIII. DZIAŁANIE I OGРАNICZENIA**

### **A. Granica wykrywania**

LOB (Limit pustego) obliczono mierząc półfabrykat kilka razy i obliczono jako średnią - 1,65 odchylenia standardowego rozkładu najlepszych wartości. Obliczono, że LOB wynosi 0,55 pg / ml.

LOD (granica wykrywalności) została obliczona jako odchylenie standardowe LOB - 1,645 dla próbki o niskim stężeniu testowanej w 10 różnych seriach. Obliczono LOD na 2,88 pg / ml.

LOQ (Limit ilościowy) obliczono, testując 5 próbek o niskiej wartości 10 razy. Obliczono LOQ na 8,5 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	92,31
25OH-witamina D3	0,001
24,25(OH) <sub>2</sub> -witamina D3	0,005
25,26(OH) <sub>2</sub> -witamina D3	0,20

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

Na wynik oznaczenia nie wpływa hemoliza (przetestowano dla stężenia 5 g/l hemoglobiny), bilarubinemia (przetestowano dla stężenia 1 g/l bilarubiny) ani trójgliceridy (przetestowano dla stężenia 2,5 g/l).

Kwas askorbinowy (witamina C; przetestowano dla stężenia 1 g/l) ani koniugaty bilarubiny (przetestowano dla stężenia 1 g/l) nie wpływają na wynik oznaczenia.

#### C. Precyza

PRECYZJA W SERII PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Surowica	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)	Surowica	N	$\text{\langle X \rangle \pm SD$ (pg/ml)	CV (%)
A	20	37,9 ± 2,6	6,8	A	10	13,6 ± 1,7	12,7
B	20	98,2 ± 7,3	7,4	B	10	32,3 ± 3,6	11,3

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

#### D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA

Rozcieńczenie próbki	Stężenie teoretyczne (pg/ml)	Stężenie zmierzone (pg/ml)	Odzysk (%)
1/1	70,0	70,0	100%
1/2	35,0	35,7	102%
1/4	17,5	14,5	83%
1/8	8,8	7,8	89%
1/16	4,4	4,6	105%

Próbka została rozcieńczona za pomocą roztworu do elucji.

BADANIE ODZYSKU

Dodana 1,25(OH)2-Vit.D (pg/ml)	Zmierzona stęż. 1,25(OH)2 Vit.D Łącznie (pg/ml)	Zaślepione (pg/ml)	Odzysk (%)
0,0	22,5		
25,0	46,3	23,8	95,2%
50,0	70,0	47,5	95,0%
100,0	122,7	100,2	100,2%

  

Dodana 1,25(OH)2-Vit.D (pg/ml)	Zmierzona stęż. 1,25(OH)2 Vit.D Łącznie (pg/ml)	Zaślepione (pg/ml)	Odzysk (%)
0,0	22,5		
25,0	52,1	29,6	118,4%
50,0	70,4	47,9	95,8%
100,0	112,9	90,4	90,4%

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 fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiornice 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  $^{125}\text{I}$  (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i  $\gamma$  (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. Wypożyczenie 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 oczyszczane zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

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

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

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierającymi azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołówkiem 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**

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ µl	KALIBRATORY µl	PRÓBKI KONTROLE µl
<b>EKSTRAKCJA</b>			
Kalibratory	-	-	-
Próbki / kontrole	-	-	500
Rozpuszczalnik do ekstrakcji	-	-	2000
Wytrząsanie Wirowanie	1 godzina 1200 obr/min 5 minut przy 800 g		
<b>ROZDZIelenie</b> Supernatant z etapu ekstrakcji	-	-	1600
<b>POJEMNIk</b>	Supernatant Rozpuszczalnik do plukania Dwuchlorometan Woda destylowana Wirowanie Roztwór do elucji Wirowanie <b>Mieszanie przy pomocy mieszadła typu worteks</b>		
<b>INKUBACJA</b>			
Kalibratory	-	150	-
Próbki ekstrahowane	-	-	150
Znacznik izotopowy	500	500	500
Inkubacja	Przez jedną noc w 18-25°C		
Rozdzielenie Roboczy roztwór pluczacy	-	Aspiracja (lub odlewanie) 2,0 ml	
Rozdzielenie Roboczy roztwór pluczacy	-	Aspiracja (lub odlewanie) 2,0 ml	
Rozdzielenie	-	Aspiracja (lub odlewanie)	
Zliczanie	Zliczanie probówek przez 60 sekund w liczniku gamma		

# DIAsource 1.25(OH)2-VIT D-RIA [체외진단의료기기]

## I. 제품개요

순번	항 목	내 용
1	품목명	골구성물질대사측정검사시약
2	제품명	DIAsource 1.25(OH)2-VIT D-RIA
3	허가번호	체외수인 15-279 호
4	사용목적	사람의 혈청 및 혈장 내 1.25(OH)2-VIT D 정량측정
5	포장단위	48 테스트/키트
6	저장방법	2-8°C, 제조일로부터 70일
7	사용기한	2-8°C, 제조일로부터 70일

## II. 측정원리

표준용액을 제외한 검체와 정도관리용액만이 용매를 혼합하여 추출하고 다른 Vitamin-D 대사산물로부터 1.25(OH)2 Vitamin-D를 분리하기 위해 카트리지를 사용한다. 검체와 정도관리용액의 추출 후, 표준용액, 검체와 정도관리용액이 피복 시험관 내에서 배양된다. 고정된 양의  $^{125}\text{I}$  표지 1.25(OH)2 Vitamin D가 배양 시험관 내면에 피복된 고정된 양의 특이 항체에 대해서 표준용액이나 추출된 검체 내의 1.25(OH)2 Vitamin D와 경합한다. 하룻밤동안의 배양 후, 경합반응을 중지하고 세척 단계에 이어 흡입 단계가 실시된다.

## III. 제공되는 시약

번호	명칭	구성	재구성
1	Coated tubes (코팅된 시험관)	1 X 48	즉시 사용 가능
2	Tracer $^{125}\text{I}$ labeled 1.25(OH)2-Vitamin D	1 vial, 동결건조	재구성용액 26ml 첨가
3	Calibrators 1 - 5	5 vials, 동결건조	용출용액 2ml 첨가
4	Wash solution	1 vial, 10ml	증류수로 70배 희석 (자력교반기 사용)
5	Control I & II (정도관리용액 I & II)	2 vials, 동결건조	증류수 2ml 첨가
6	Reconstitution solution (재구성용액)	1 vial, 3ml	즉시 사용 가능
7	Elution solution (용출용액)	1 vial, 30ml	즉시 사용 가능
8	Silica Cartridge (실리카 카트리지)	20	실온에 보관

비고: 용출용액은 Calibrator 0 및 가장 높은 Calibrator 보다 높은 값의 검체를 희석할 때 사용한다. 희석은 분리 단계 이후에 한다.

## IV. 측정절차

### 1. 검체 준비

- (1) 혈청과 혈장은 2-8°C에 보관한다.
- (2) 측정이 24시간 이내에 이루어지지 않는다면 검체는 -20°C에 냉동 저장해야 한다.
- (3) 반복적인 냉동/해동은 피한다.
- (4) 해동 후의 검체는 원심분리 시킨다.
- (5) 혈청, 해파린 또는 EDTA 혈장으로 비슷한 결과값이 나온다.

### 2. 시약조제

- (1) Calibrators 표준용액: 2ml의 용출용액으로 재구성한다.  
Incubation 단계 바로 직전에 재구성한다.
- (2) Controls 정도관리 용액: 2ml의 증류수로 재구성한다.
- (3) Tracer: 26ml의 재구성용액으로 재구성한다.
- (4) 세척용액: 적절한 양의 희석된 세척용액을 준비하기 위해 세척용액 대 증류수의 양을 69 대 1로(70배 희석) 한다. 균질화하기 위해 자력교반기를 이용한다. 재구성한 세척용액은 사용 후 폐기한다.
- (5) 추출용매: 검사에 사용될 control 또는 검체에는 각각 2ml의 추출용매가 필요하다. 아래의 비율로 사용 직전 추출용매를 준비한다.

디이소프로필에테르:시클로헥산:에틸아세테이트=50:40:10

주의 사항: 용매의 비율은 절대적으로 따라야 하며 다음 표를 참고한다.

검체 및 control의 수	디이소프로필에테르 (ml)	시클로헥산 (ml)	에틸아세테이트 (ml)
1	1.1	0.9	0.2
8	8.8	7.0	1.8
18	19.8	15.8	4.0

(6) 세척용매: 검사에 사용될 control 또는 검체에는 각각 1ml의 세척용매가 필요하다. 아래의 비율로 사용 직전 세척용매를 준비한다.

디이소프로필에테르:시클로헥산:에틸아세테이트:에탄올=50:40:10:1

주의 사항: 용매의 비율은 절대적으로 따라야 하며 다음 표를 참고한다.

검체 및 control의 수	디이소프로필에테르 (ml)	시클로헥산 (ml)	에틸아세테이트 (ml)	에탄올 (ul)
1	0.5	0.4	0.1	11
8	4.4	3.5	0.9	88
18	9.9	7.9	1.98	198

### 3. 검사방법

#### (1) 추출 단계: 정도관리용액과 검체에만 적용한다.

- ① 추출용 유리 시험관(12 x 75mm)에 라벨을 부착한다  
: 정도관리용액 2개, 검체는 16개까지
- ② 각각의 시험관에 정도관리용액이 또는 검체 0.5ml씩 첨가한다.
- ③ 각 시험관에 추출용매 2ml씩 분주한다. 추출용매 제조 방법 참고한다.
- ④ 모든 시험관을 마개로 막고 1200rpm에 설정된 shaker에 1시간 동안 반응 시킨다.
- ⑤ 각 시험관을 18-25°C에 5분 동안 원심분리(800g에 설정) 시킨다.
- ⑥ 상층액은 다음의 분리단계에서 필요하다.

#### (2) 분리 단계: 정도관리용액과 검체에만 적용한다.

- ① 세척용 카트리지를 위해 유리 시험관 또는 폴리프로필렌 시험관에 라벨을 부착한다.  
: 정도관리용액 2개, 검체는 16개까지
- ② 각 시험관에 "Bond Elut" 카트리지를 넣는다.
- ③ 추출 단계에서 엉어진 상층액 1.6ml(2x0.8ml)을 카트리지에 바른다.
- ④ 세척용매 1ml로 카트리지를 세척한다. 세척용매 제조 방법 참고한다.  
카트리지에 진공 방법은 금하며 중력으로 끌려 나가도록 한다.
- ⑤ 각 카트리지에 증류수 300ul씩 첨가한다.
- ⑥ 각 시험관을 18-25°C에 5분 동안 원심분리(800g에 설정) 시킨다.
- ⑧ 1.25(OH)2 Vitamin D의 용출을 위해 유리 시험관(12x75mm)에 라벨을 부착한다. 원심분리 후 각 카트리지를 해당 유리 시험관에 옮긴다.
- ⑨ 1.25(OH)2 Vitamin D의 용출을 위해 각 카트리지에 용출용액 400ul씩 바른 후 18-25°C에 5분 동안 원심분리(800g에 설정) 시킨다.
- ⑩ 용출된 유분을 vortex한다.

비고: 이 단계 후, 검체는 분해/변질을 피하기 위해 코팅된 시험관에 바로 배양 시켜야 한다.

#### (3) Incubation 단계: \* 자동화 장비: Gamma Pro

- ① 각 calibrator, control 및 검체를 위해 코팅된 시험관 2개씩 준비하여 라벨을 부착한다. Total count를 위해서는 일반 시험관 2개를 준비하여 라벨을 부착한다.
- ② 모든 calibrator, 추출한 control 및 검체를 vortex으로 간단히 섞는다. 용출용액(Elution Solution)을 0번 calibrator로 사용한다. Calibrator, control, 및 검체 150ul씩 해당 시험관에 분주한다.
- ③ Total count를 포함한 모든 시험관에 tracer 500ul씩 분주한다.
- ④ 시험관 랙을 손으로 부드럽게 흔들어 갇혀 모든 기포를 제거한다.
- ⑤ 하룻밤 동안 18-25°C에 반응 시킨다.
- ⑥ Total count를 제외한 모든 시험관의 내용물을 흡입하여 제거한다. 흡입기의 끝 부분이 바닥에 닿아서 모든 액체가 제거 될 수 있도록 한다.
- ⑦ Total count를 제외한 모든 시험관을 재구성한 세척용액 2ml로 세척한다. 재구성한 세척용액을 첨가 할 때 거품이 생기지 않도록 한다.
- ⑧ Total count를 제외한 모든 시험관의 내용물을 흡입하여 제거한다.
- ⑨ Total count를 제외한 모든 시험관을 재구성한 세척용액 2ml로 다시 세척한 후 내용물을 흡입하여 제거한다.
- ⑩ 마지막 세척 단계 후 약 2분 동안 시험관을 똑바로 세우고 남은 액체를 모두 흡입하여 제거한다.
- ⑪ 60초 동안 Gamma counter로 cpm을 측정한다.

## 4. 결과 산출

### (1) 자료정리

- ① 두 번 측정한 값의 평균값을 구한다.
- ② 아래의 공식을 이용하여 결합된 방사능을 계산한다.

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

- ③ 각 calibrator po (OH)2-Vitamin D 농도의 함수로 표시하여 3 cycle 반로그도표 또는 logit-log 그래프로 표준곡선을

# DIAsource 1.25(OH)2-VIT D-RIA [체외진단의료기기]

그린다. 이상치는 제외한다.

- ④ 자동으로 계산할 경우 4-Parameter Logistic Function 곡선적합(curve fitting)을 권장한다.
- ⑤ 각 검체의 1.25(OH)2-Vitamin D 농도는 보간법으로 표준곡선에서 산출한다.
- ⑥ 각 검사마다 B0/T (%)를 확인해야 한다.

## (2) 참고치

대상	범위 (pg/ml)	평균	SD	n
정상 검체	19.6 - 54.3	35.3	10.6	51

## 5) 표준 데이터

다음 자료는 예시일 뿐. 실제 표준곡선을 대신하여 사용해서는 안 된다.

1.25(OH)2-Vitamin D	cpm	B/Bo (%)
Total count	43937	
Calibrator 0.0 pg/ml	16687	100.0
6.0 pg/ml	15268	91.5
20.0 pg/ml	12345	74.0
63.0 pg/ml	8033	48.1
230.0 pg/ml	3554	21.3
430.0 pg/ml	2148	12.9

## 6) 환산계수

pg/ml에서 pmol/L: x 2.4

pmol/L에서 pg/ml: x 0.42

## V. 완제품 시험규격

### 1. 외관검사

제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고, 확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.

- (1) 문서번호 ITPKKIP1929에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다
- (2) 제품 구성표의 lot와 키트안의 구성품이 일치하는지 확인
- (3) 구성품과 키트의 유효기간을 확인
- (4) 구성품의 라벨상태를 확인
- (5) 구성품의 포장상태(용량, 물질 등)를 확인
- (6) 서류가 맞게 있는지 확인 (사용설명서, 품질서류 등)
- (7) 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인
- (8) 검사 후 담당자는 확인양식(FTP K004)에 기입하고 서명한다.

### 2. 성능시험

제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.

- (1) 총 계수는 허용범위 (35,000-60,000 cpm )내에 있어야 한다
- (2) 표준용액 0의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다(37.1-50.0%)
- (3) 표준용액 1의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다 (84.8-95.0%)
- (4) 표준용액 5의 결합률은 허용범위내에 있어야 한다 (8.0-18.9%)
- (5) 키트 정도관리용액에서 얻어진 값이 허용범위 내에 있어야 한다  
Control I 31.5-58.5 pg/ml  
Control II 80.5-149.5 pg/ml

- (6) 표준물질은 허용범위 내에 있어야 한다

Calibrator 1 : 4.2-7.8 pg/ml  
Calibrator 2 : 14-26 pg/ml  
Calibrator 3 : 42-78 pg/ml  
Calibrator 4 : 175-325 pg/ml  
Calibrator 5 : 385-715 pg/ml

비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역 측정을 위한 표준지침서

(문서번호 CACQKIP1929)에 기록되어 있다.

(허용범위는 평균값의 ±3SD를 기준으로 측정된다)

## VI. 사용시 주의사항

1. 체외진단용으로만 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.

### 2. 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.

- (1) 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.
  - (2) 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)
  - (3) 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펜팅 하지 않는다.
  - (4) 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.
  - (5) 유출된 모든 물질은 즉시 닦아 낸 후 폐기 또는 취급에 관련된 소관 법령에 따라 처리하여야 하며, 방사성 물질의 오염이나 방사성 물질 등의 분실은 관련 법령에 정한 규정된 절차에 따라 처리한다.
3. 검사를 실시하기 전에 모든 제품(구성품 포함)은 해당 제품별 검사 온도 조건에 따라 실시한다.
4. 그밖에 방사성동위원소의 보관, 이동, 사용 및 폐기 등 취급에 관한 사항은 관련 법규 또는 규정에 따른다.
5. 본 kit 내의 혈액성분은 시험을 거쳤고, HbsAg, 항HIV 1와 항 HIV 2에 대한 반응은 없었다. 알려져 있는 어떠한 방법으로도 간염, AIDS, 감염성혈액 성분 같은 감염성 물질의 부재를 확신시킬 수 없다 그러므로 시약과 환자 검체의 취급은 병원내의 안전절차에 따라야 한다.
  6. 시약이 피부에 접촉되지 않게 하라(요오드화나트륨 방부제). 본 kit 내의 요오드화합물은 배관계통의 납과 구리와 반응하여 큰 폭발성을 가진 요오드화금속으로 변화할 수 있다. 세척 단계에서 요오드화합물의 생성을 막기 위해 흐르는 물로 배수관을 씻어 내도록 한다.
  7. 방사성물질의 취득과 저장에 대한 일지는 실험실 내에 보관되어야 한다. 방사성 물질로 오염될 수 있는 서로 다른 방사성물질에 의한 교차 오염을 예방하기 위해 실험실 기구와 유리제품은 서로 분리 되어져야 한다.
  8. 방사성 물질이 쏟아진 경우에는 방사선안전 절차에 따라 즉시 제염하여야 한다. 방사성 폐기물은 특정 규정과 실험실의 관할권을 가지고 있는 신고당국의 지침에 따라 처리되어야 한다. 방사선안전에 대한 기본 규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.
  9. 주의: 키트의 성능은 이중으로 테스트한 샘플을 기반으로 정의되었으므로 지침에서 권장하는 대로 키트를 사용하는 것이 중요합니다. 이러한 이유로 키트에 제공된 카트리지의 양은 환자 샘플의 중복 측정을 위한 주출을 수행하는 데만 충분합니다.