



# VASOPRESSIN - RIA

*KIPERB319*

---

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.

## Vasopressin RIA

### I. INTENDED USE

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

For professional use within a laboratory.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource Vasopressin RIA
- B. Catalog number : KIPERB319 : 100 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

Vasopressin, or Antidiuretic Hormone (ADH) is a cyclic neuropeptide with a molecular weight of 1083. Its structure is very similar to that of oxytocin, differing in only two amino acids. Endogenous ADH has antidiuretic and pressor activity, both approaching 400 units per mg, with an antidiuretic-to-vasopressin ratio of 1, and a biphasic plasma half-life of 2.5 and 14.5 minutes. ADH is synthesized in the hypothalamic supraoptic nucleus and paraventricular nucleus of primates and transported via exonal flow to the posterior pituitary for storage and eventual release.

#### B. Clinical application

The clinical application of a vasopressin radioimmunoassay is in diabetes insipidus, psychogenic water intoxication, hyponatraemia, stress conditions, ADH as a neurotransmitter and hypertension studies. ADH values can be influenced by cigarettes, tea, coffee, alcohol and some drugs.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

#### V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	100 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
[Ab] Lyophilized anti-vasopressin	1 vial lyophilized	Blue	<b>Add</b> 22 mL distilled water
Ag $^{125}\text{I}$  TRACER: $^{125}\text{I}$ odine labelled vasopressin Specific activity: 62-77 MBq/nmol (1700-2100 $\mu\text{Ci}/\text{nmol}$ ).	1 vial lyophilized 28 kBq	Red	<b>Add</b> 25 mL distilled water
[DASP]  Double antibody solid phase Goat anti-rabbit IgG's bound to solid phase in phosphate buffer with Human serum albumin, NaCl, NaN <sub>3</sub> , EDTA and Tween 80.	1 vial 11 mL	Green	<b>Ready</b> for use
[ASS BUF]  Assay diluent Phosphate buffer with HSA, EDTA disodium salt, NaN <sub>3</sub> and aprotinin (Trasylol® or equivalent)	2 vials 50 mL	Black	<b>Ready</b> for use
[CAL]  Vasopressin Calibrator (see exact value on vial label)	1 vial lyophilized	Yellow	<b>Reconstitute</b> with distilled water by the volume stated on the vial label
[CONTROL N]  Controls - N = 1 or 2 ( see exact value on vial label)	2 vials lyophilized	Silver	<b>Add</b> 2 mL distilled water

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

Pipettes (100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ , 300  $\mu\text{L}$ , 1 mL, 2 mL, 5 mL)  
Repeating dispensers (100  $\mu\text{L}$ , 200  $\mu\text{L}$ )  
Measuring cylinder 25 mL  
Polystyrene RIA tubes (12 x 75 mm)  
Ethanol absolute (99%)  
Vortex  
Centrifuge  
Icebath  
Vac-concentrator  
Nitrogen gas  
Polystyrene or glass tubes for extraction (16 x 100 mm)  
Sep-pak C18  
Acetic acid 4%  
Methanol absolute (99%)  
1N HCl

#### VII. REAGENT PREPARATION

PREPARE ALL REAGENTS 15 MINUTES BEFORE USE !

- A. **Anti-vasopressin** : Reconstitute with 22 mL of distilled water. Mix gently. Store at -20°C for at least 3 months after reconstitution.

- B.  **$^{125}\text{I}$ - vasopressin** : Reconstitute with 25 mL of distilled water. Mix gently. Store at -20°C until expiry date.
- C. **Double antibody solid phase** : Ready for use. The separation reagent should be placed on a magnetic stirrer for 10 minutes at room temperature (18-25°C). Store at 2-8°C until expiry date. It is possible to pipette the reagent with a repeating dispenser.
- D. **Assay buffer** : Ready for use. Store at 2-8°C until expiry date.
- E. **Calibrator** : Reconstitute with distilled water by the volume stated on vial label. Mix gently. Store at -20°C for at least 3 months after reconstitution. Refer to table in section X. B for calibration curve preparation.
- F. **Controls** : Reconstitute with 2 mL of distilled water. Mix gently. Store at -20°C for at least 3 months after reconstitution. The value of the controls is found on the label of the vial (without extraction).

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

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt of the kit, all reagents should be stored at 2-8°C. The reconstituted reagents should be stored according to table in section VII. Reagent Preparation. The reconstituted reagents are stable according to table in section VII. Reagent Preparation, but no longer than the expiry date.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION

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

##### Vasopressin in plasma

- Draw blood from fasting patient into a chilled tube, containing EDTA or Heparin.
  - Centrifuge at 4°C to separate the plasma.
  - Freeze the sample in plastic tubes at -20°C until assayed.
- NOTE: Vasopressin (ADH) in plasma is stable at -20°C only for 4 weeks, or stable up to 3 months after addition of 500 KIU aprotinin (Trasylol® or equivalent) per mL blood; after extraction, Vasopressin is stable at -20°C for 6 months.

##### Vasopressin in urine

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

#### X. PROCEDURE

##### A. Sample preparation

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

- A1 : Sep-pak C18 extraction  
A2 : Ethanol extraction

##### A1: Sep-pak C18 extraction procedure

Column: Sep-pak C18 cartridge

DO NOT EXTRACT CALIBRATORS AND CONTROLS.

1. Wash the column with 10 mL distilled water, 5 mL methanol and 10 mL distilled water, respectively.
2. Acidify 1 mL plasma sample with 150  $\mu\text{L}$  1N HCl.
3. Bring this acidified sample into the column.
4. Wash the column with 20 mL 4% acetic acid.
5. Elute with 4 mL methanol.
6. Dry the methanol under a stream of nitrogen or air.
7. Reconstitute the residue with 1 mL of assay buffer.
8. Follow the regular RIA manual.

To estimate recovery, add an aliquot (200  $\mu\text{L}$ )  $^{125}\text{I}$ -vasopressin tracer to a random plasma sample and submit the recovery sample for the same extraction procedure.

##### Recovery calculation

- a/ Prepare a Recovery estimation tube (R).
- Pipette 1 mL of a random plasma sample into the Recovery tube (R). The sample used for this recovery assay should have a protein matrix similar to the samples being tested.
  - Add 200  $\mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$ -vasopressin tracer into the tube (R) and mix.
  - Extract this sample along with samples in the above procedure.
- b/ Prepare a Total Recovery tube (TR).
- Pipette 200  $\mu\text{L}$   $^{125}\text{I}$ -vasopressin tracer into two Total Recovery tubes (TR).

- Add 100 µL assay buffer and mix.
- Cap and set aside these tubes to be counted for recovery calculation.
- c/ Reconstitute the dried Recovery sample (R) by adding 1 mL assay buffer and vortex thoroughly.
- d/ Pipette 300 µL of the reconstituted Recovery sample tube (R) into two assay tubes.
- e/ Count the Total Recovery (TR) and Recovery (R) tubes for at least two minutes in a gamma counter.

Calculate % recovery by dividing the cpm in the Recovery tubes (R) by cpm in the Total Recovery tubes (TR) and multiply by 3.33:

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

Extraction recoveries should score values of, at least, 60%.

#### A2: Ethanol extraction procedure

##### DO NOT EXTRACT CALIBRATORS AND CONTROLS.

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

#### Recovery calculation

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

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

Extraction recoveries should score values of, at least, 40%.

#### B. Procedure

##### Preparation of Calibrator solutions

Dilution	Vasopressin Calibrator (=Calibrator a)	Vasopressin Concentration 60 pmol/L
1000 µL of Vasopressin Calibrator a + 1000 µL assay buffer vortex	Calibrator b	30 pmol/L
1000 µL of Calibrator b + 1000 µL assay buffer vortex	Calibrator c	15 pmol/L

1000 µL of Calibrator c + 1000 µL assay buffer vortex	Calibrator d	7.5 pmol/L
1000 µL of Calibrator d + 1000 µL assay buffer vortex	Calibrator e	3.8 pmol/L
1000 µL of Calibrator e + 1000 µL assay buffer vortex	Calibrator f	1.9 pmol/L
	Assay buffer	0 pmol/L

1. After preparation of the Calibrator solutions, pipette 300 µL of each Calibrator, control, each extract from plasma, or diluted urine into the correspondingly labelled tubes.
2. Add 300 µL assay buffer to the max binding (0 pmol/L binding) tubes and 500µL assay buffer to the blank tubes (NSB).
3. Add 200 µL vasopressin antiserum to all tubes, except blank (NSB) and Total counts tubes.
4. Vortex all tubes and incubate at 2-8°C for 18-24 hours.
5. Add 200 µL <sup>125</sup>I-vasopressin to all tubes.
6. Vortex all tubes and incubate at 2-8°C for 18-24 hours.
7. While stirring continuously add 100 µL double antibody solid phase. to all tubes, except Total count tubes.
8. Vortex and incubate 30-60 minutes at 2-8°C .
9. Centrifuge all tubes for 15 min. at 1700 g at 4°C.
10. Decant or aspirate supernatant.
11. Count residue for 2-4 min.

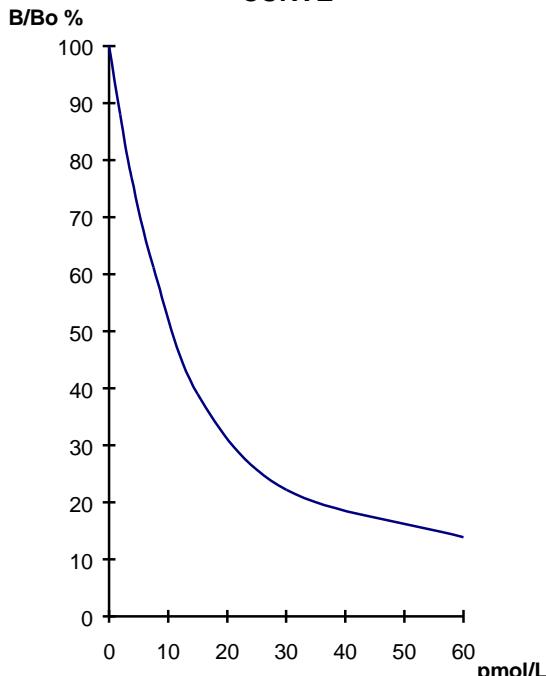
#### XI. CALCULATION OF RESULTS

- Subtract the average count rate (cpm) of the NSB from the average count rate (cpm) of the replicates of calibrators, controls and patient samples.
- A calibration curve can be generated by plotting cpm, % B/Bo or % B/T of precipitated bound fraction against the concentration of the vasopressin calibrators.
- To obtain the vasopressin concentration in the extracted patient samples and controls, their cpm, % B/Bo or % B/T of precipitated bound fractions are interpolated from the generated calibration curve.
- The calibration curve can also be constructed by computer methods. For automated data reduction, both logit/log and Spline methods can be used.
- Correct the urine values according to the dilution factor applied.  
Urine: calculate the 24 hour vasopressin excretion:  
Vasopressin pmol/L x dilution x 24 hours urine volume in L.  
This calculation provides vasopressin concentration in pmol/24 hours.
- Correct the plasma values for % extraction Recovery  
**For example:**  
Patient sample concentration measured from the curve: 10 pmol/L  
Extraction recovery measured after Ethanol extraction : 45%  
Patient sample concentration corrected :  $\frac{10 \times 100}{45} = 22.2 \text{ pmol/L}$

#### XII. TYPICAL DATA

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

## VASOPRESSIN STANDARD CURVE



### XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

Precision						
Within-run					Between-run	
	n	mean pmol/L	SD	% c.v.		
sample A	18	4.17	0.27	6.5	sample A	6
sample B	16	20.2	1.00	4.9	sample B	6

### Calibration

This assay is calibrated against the first international WHO standard 77/501

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

### Specificity

Vasopressin antiserum is raised in rabbits.

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

Peptide	% Cross reactivity
Arg <sup>8</sup> Vasopressin	100
Oxytocin	<0.1
Lys <sup>8</sup> -Vasopressin	<0.1
Desmopressin	<0.1
Arg <sup>8</sup> Vasotocin	80

### Sensitivity

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

### Interference

Samples displaying cloudiness, hemolysis, hyperlipemia or containing fibrin may give inaccurate results

### XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

### XV. REFERENCE INTERVALS

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

Plasma: up to 13 pmol/L

Urine: 57 ± 22 pmol/24 hours urine

### XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

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

This kit contains  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations. The radioactive material included may be received, acquired, possessed and used only by physicians, clinical laboratories or hospitals for in-vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulation of each country.

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

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

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

For more information, see Material Safety Data sheet (MSDS).

### XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.
2. Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.
3. Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone.

4. Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.
5. Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.
6. Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.
7. Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressine in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.
8. Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.
9. Von Zur Mülen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.
10. Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.
11. Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.
12. Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.
13. Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.
14. Goldschmidt S. (1981). Plasma Arginine Vasopressin in Hyponatremic Patients with Heartfailure. New Engl. J. of Med. 305, 1470-1471.
15. Weider, B. (1981). Plasma-ADH-Spiegel als perioperativer Stressparameter, 1. Mitteilung. Sonderdruck aus: Anästhesie, Intensivtherapie, Notfallmedizin Heft 6, Dez. 1981, 315-318.
16. Bormann, B.V. (1981). Plasma-ADH-Spiegel als perioperativer Stressparameter, 2. Mitteilung. Sonderdruck aus: Anästhesie, Intensivtherapie, Notfallmedizin Heft 6, Dez. 1981, 319-322.
17. Geysant. A. (1981). Plasma Vasopressin, Renin Activity, and Aldosterone Effect of Exercise and Training. Eur. J. Appl. Physiol. 46, 21-30.
18. Rowe, J. (1982). Age-Related Failure of Volume-Pressure Mediated Vasopressin Release. J. Clin. Endocrinol. Metab. 54, 661-663.
19. Freishausen (1976). The Development of a radioimmunoassay for ADH. Acta Endocrinologica 83, 50-63.
20. Miller (1972). Radioimmunoassay of Urinary Antidiurectic Hormone in Man: Response to Water Load and Dehydration in Normal Subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 537-545.
21. Rees (1974). Multiple Hormones in a Bronchial Tumor. J. Clin. Endocrin. metab. 38, 1090.

	Total count	NSB	Calibrators (0-6)	Controls	Samples
<b>Assay buffer</b>		<b>500 µl</b>			
<b>Calibrators</b>	-	-	<b>300 µl</b>	-	-
<b>Controls</b>	-	-	-	<b>300 µl</b>	-
<b>Samples</b>	-	-	-	-	<b>300 µl</b>
<b>Anti-vasopressin</b>	-	-			<b>200 µl</b>
<b>Vortex and incubate for 18-24 hours at 2-8°C.</b>					
<b><sup>125</sup>I Tracer</b>				<b>200 µl</b>	
<b>Vortex and incubate for 18-24 hours at 2-8°C.</b>					
<b>Double antibody solid phase</b>	-				<b>100 µl</b>
<b>Vortex and incubate for 30-60 min at 2-8°C.</b>					
<b>Centrifuge 15 min ( 1700 g; 4°C )</b>					
<b>Aspirate or decant the supernatant and count the residue for 2-4 minutes</b>					

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



es

Lea todo el protocolo antes de usar.

## Vasopresina RIA

### I. INDICACIONES

El kit de vasopresina de DIAsource contiene reactivos e instrucciones para la determinación cuantitativa de vasopresina en plasma u orina. Después de la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) o de la extracción con etanol, las concentraciones de vasopresina en plasma se miden por radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés). Las concentraciones de vasopresina en orina pueden determinarse directamente. Para uso profesional en un laboratorio.

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre comercial:** DIAsource Vasopressin RIA
- B. **Número de catálogo:** KIPERB319: 100 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para recibir asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con:

Tel: +32 (0) 10 84.99.11 Fax: +32 (0) 10 84.99.91

### III. ANTECEDENTES CLÍNICOS

#### A. Actividades biológicas

La vasopresina o hormona antidiurética (ADH) es un nanopéptido cíclico con un peso molecular de 1083. Su estructura es muy similar a la de la oxitocina, diferenciándose únicamente en dos aminoácidos. La ADH endógena tiene una actividad antidiurética y presora, en ambos casos cercana a las 400 unidades por mg, con una proporción antidiurética-vasopresina de 1, y una semivida plasmática bifásica de 2,5 y 14,5 minutos. La ADH se sintetiza en el núcleo supraóptico hipotalámico y en el núcleo paraventricular de los primates y se transporta por flujo exonal a la pituitaria posterior para su almacenamiento y eventual liberación.

#### B. Aplicación clínica

La aplicación clínica de un radioinmunoensayo de vasopresina es en la diabetes insípida, la intoxicación hídrica psicógena, la hiponatremia, las condiciones de estrés, la ADH como neurotransmisor y los estudios de hipertensión. El tabaco, el té, el café, el alcohol y algunos fármacos pueden influir en los valores de ADH.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Después de la extracción en fase sólida (SPE) o de la extracción con etanol de las muestras de plasma, la vasopresina se analiza a través de un inmunoensayo competitivo. La vasopresina urinaria puede medirse directamente. Este ensayo utiliza un antisero de conejo contra la vasopresina y un trazador <sup>125</sup>I de vasopresina radioyodado. Las fases unida y libre se separan mediante un segundo anticuerpo unido a partículas de fase sólida, y posteriormente se realiza un paso de centrifugación. Se determina la radiactividad en las fracciones unidas y se puede generar una curva típica de calibración. Los valores de las muestras extraídas se corren para la recuperación de la extracción.

#### V. REACTIVOS PROPORCIONADOS

Reactivos	Kit con 100 pruebas	Código de color	Reconstitución
[Ab] Antivasopresina liofilizada	1 vial liofilizado	Azul	<b>Añadir</b> 22 ml de agua destilada
Ag <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><sup>125</sup>I</span>  TRAZADOR: Vasopresina marcada con yodo <sup>125</sup> I Actividad específica: 62-77 MBq/nmol (1700-2100 µCi/nmol).	1 vial liofilizado 28 kBq	Rojo	<b>Añadir</b> 25 ml de agua destilada
[DASP]  Fase sólida de doble anticuerpo IgG de cabra anti-conejo unido a la fase sólida en tampón fosfato con albúmina de suero humano, NaCl, NaN <sub>3</sub> , EDTA y Tween 80.	1 vial 11 ml	Verde	<b>Listo para usar</b>
[ASS   BUF]  Diluyente de ensayo Tampón fosfato con HSA, sal disódica de EDTA, NaN <sub>3</sub> y aprotinina (Trasylol® o equivalente)	2 viales 50 ml	Negro	<b>Listo para usar</b>
[CAL]  Calibrador de vasopresina <b>(Véase el valor exacto en la etiqueta del vial)</b>	1 vial liofilizado	Amarillo	<b>Reconstituir</b> con agua destilada en el volumen indicado en la etiqueta del vial
[CONTROL   N]  Controles - N = 1 o 2 <b>( Véase el valor exacto en la etiqueta del vial)</b>	2 viales liofilizado	Plata	<b>Añadir</b> 2 ml de agua destilada

#### VI. SUMINISTROS NO PROPORCIONADOS

El material siguiente es necesario pero no se proporciona en el kit:

Pipetas (100 µL, 200 µL, 300 µL, 1 mL, 2 mL, 5 mL)

Dispensadores repetitivos (100 µL; 200 µL)

Cilindro de medición de 25 mL

Tubos RIA de poliestireno (12 x 75 mm)

Etanol absoluto (99%)

Vórtex

Centrifugar

Baño de hielo

Concentrador de vacío

Gás nitrógeno

Tubos de poliestireno o de vidrio para la extracción (16 x 100 mm)

Sep-pak C18

Ácido acético 4%

Metanol absoluto (99%)

1N HCl

#### VII. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

¡PREPARE TODOS LOS REACTIVOS 15 MINUTOS ANTES DE USAR!

- A. **Antivasopresina:** Reconstituir con 22 mL de agua destilada. Mezclar suavemente. Conservar a -20°C durante al menos 3 meses después de la reconstitución.
- B. **<sup>125</sup>I- vasopresina:** Reconstituir con 25 mL de agua destilada. Mezclar suavemente. Conservar a -20 °C hasta la fecha de caducidad.
- C. Fase sólida de doble anticuerpo: Lista para usar. El reactivo de separación debe colocarse en un agitador magnético durante 10 minutos a temperatura ambiente (18-25°C). Conservar a 2 - 8 °C hasta la fecha de caducidad. Es posible pipetear el reactivo con un dispensador repetitivo.
- D. **Tampón de ensayo:** Listo para usar. Conservar a 2 - 8 °C hasta la fecha de caducidad.
- E. **Calibrador:** Reconstituir con agua destilada en el volumen indicado en la etiqueta del vial. Mezclar suavemente. Conservar a -20°C durante al menos 3 meses después de la reconstitución. Consulte la tabla de la sección X. B para preparar la curva de calibración.
- F. **Controles:** Reconstituir con 2 mL de agua destilada. Mezclar suavemente. Conservar a -20°C durante al menos 3 meses después de la reconstitución. El valor de los controles se encuentra en la etiqueta del vial (sin extracción).

#### VIII. CONSERVACIÓN Y FECHA DE CADUCIDAD DE LOS REACTIVOS

Este kit es estable hasta la fecha de caducidad indicada si se conserva como se especifica.

Una vez recibido el kit, todos los reactivos deben conservarse a 2-8° C.

Los reactivos reconstituidos deben conservarse según la tabla de la sección VII. Preparación de los reactivos.

Los reactivos reconstituidos son estables según la tabla de la sección VII. Preparación de los reactivos, pero no por más tiempo que la fecha de caducidad.

#### IX. RECOGIDA DE MUESTRAS

Se recomienda una estandarización cuidadosa de la preparación para el paciente y de las condiciones de muestreo.

##### Vasopresina en plasma

- Extraer la sangre del paciente en ayunas en un tubo refrigerado, que contenga EDTA o heparina.

- Centrifugar a 4° C para separar el plasma.

- Congelar la muestra en tubos de plástico a -20° C hasta su ensayo.

NOTA: La vasopresina (ADH) en plasma es estable a -20° C solo durante 4 semanas, o estable hasta 3 meses después de añadir 500 KIU de aprotinina (Trasylol® o equivalente) por mL de sangre; después de la extracción, la vasopresina es estable a -20° C durante 6 meses.

##### Vasopresina en orina

La vasopresina puede determinarse directamente, en orina humana no extraída.

- Recoger una muestra de orina durante 24 horas.

- Registre el volumen de orina.

- Medir la osmolaridad urinaria.

- Si la muestra no se analiza inmediatamente, conservar una alícuota a -20° C.

- Medir las muestras de orina sin diluir y en diluciones de 1:2, 1:4 o superiores.

#### X. PROCEDIMIENTO

##### A. Preparación de la muestra

Antes de proceder al procedimiento de RIA se pueden utilizar dos métodos diferentes de preparación de la muestra:

A1 : Extracción de Sep-pak C18

A2 : Extracción de etanol

##### A1: Procedimiento de extracción de Sep-pak C18

Columna: cartucho Sep-pak C18

##### NO EXTRAIGA LOS CALIBRADORES Y LOS CONTROLES.

1. Lave la columna con 10 mL de agua destilada, 5 mL de metanol y 10 mL de agua destilada, respectivamente.
2. Acidifique 1 mL de muestra de plasma con 150 µL de HCl 1N.
3. Introduzca esta muestra acidificada en la columna.
4. Lave la columna con 20 mL de ácido acético al 4%.
5. Eluya con 4 mL de metanol.
6. Seque el metanol bajo una corriente de nitrógeno o aire.
7. Reconstituya el residuo con 1 mL de tampón de ensayo.
8. Siga el manual habitual para RIA.

Para calcular la recuperación, añada una alícuota (200 µL) del trazador de  $^{125}\text{I}$ -vasopresina a una muestra de plasma aleatoria y someta la muestra de recuperación al mismo procedimiento de extracción.

#### Cálculo de la recuperación

- a/ Prepare un tubo de recuperación de estimación (R).
- Pipete 1 mL de una muestra de plasma aleatoria en el tubo de recuperación (R). La muestra utilizada para este ensayo de recuperación debe tener una matriz proteica similar a la de las muestras analizadas.
- Añada 200 µL de trazador de  $^{125}\text{I}$ -vasopresina en el tubo (R) y mezcle.
- Extraiga esta muestra junto con las muestras del procedimiento anterior.
- b/ Prepare un tubo de recuperación total (TR).
- Pipete 200 µL de trazador de  $^{125}\text{I}$ -vasopresina en dos tubos de recuperación total (TR).
- Añada 100 µL de tampón de ensayo y mezcle.
- Tape y reserve estos tubos para calcular la recuperación.
- c/ Reconstituya la muestra seca de recuperación (R) añadiendo 1 mL de tampón de ensayo y mezcle bien en el vórtex.
- d/ Pipete 300 µL del tubo de la muestra de recuperación reconstituida (R) en dos tubos de ensayo.
- e/ Haga un recuento de los tubos de recuperación total (TR) y de recuperación (R) durante al menos dos minutos en un contador gamma.

Calcule el % de recuperación dividiendo las cpm de los tubos de recuperación (R) entre las cpm de los tubos de recuperación total (TR) y multiplique por 3,33:

$$\% \text{ Recuperación: } \frac{\text{cpm del tubo de recuperación (R)}}{\text{cpm del tubo de recuperación total (TR)}} \times 3,33 \times 100\%$$

Las recuperaciones de las extracciones deben marcar valores del 60% como mínimo.

#### A2: Procedimiento de extracción con etanol

NO EXTRAIGA LOS CALIBRADORES Y LOS CONTROLES.

1. Etiquete un tubo de extracción por cada muestra del paciente. Etiquete un tubo adicional para calcular la recuperación de la extracción.
2. Coloque los tubos de extracción y el etanol en hielo.
3. Pipete 0,8 mL de cada muestra en los tubos de extracción correctamente etiquetados.
4. Prepare un tubo de recuperación de estimación (R).
  - Pipete 0,8 mL de una muestra de plasma aleatoria en el tubo de recuperación (R). La muestra utilizada para este ensayo de recuperación debe tener una matriz proteica similar a la de las muestras analizadas.
  - Añada 200 µL de trazador de  $^{125}\text{I}$ -vasopresina en el tubo de recuperación (R) y mezcle.
  - Extraiga esta muestra junto con las muestras del paso 6.
5. Prepare un tubo de recuperación total (TR).
  - Pipete 200 µL de trazador de  $^{125}\text{I}$ -vasopresina en dos tubos de recuperación total (TR).
  - Añada 100 µL de tampón de ensayo y mezcle.
  - Tape y reserve estos tubos para su recuento para el cálculo de la recuperación.
6. Añada 4 mL de etanol refrigerado a cada muestra y al tubo de recuperación (R).
7. Mezcle y agite en el vórtex durante 2 minutos.
8. Centrifugue todos los tubos de extracción (muestras y R) a 2000 g durante 15 minutos a 4°C.
9. Decante el sobrenadante de cada tubo de extracción en tubos de 16 x 100 mm previamente preparados, limpíos y etiquetados correctamente.
10. Evapore los sobrenadantes bajo una corriente de nitrógeno hasta que se sequen (a un máximo de 37°C), o evapore utilizando un concentrador de vacío.
11. Reconstituya las muestras secas añadiendo 0,8 mL de tampón de ensayo y mezcle bien en el vórtex.
12. Continúe con el procedimiento de RIA inmediatamente o conserve las muestras extraídas a -20°C hasta dos semanas antes de utilizarlas en el ensayo.
13. Reconstituya la muestra seca de recuperación (R) añadiendo 0,8 mL de tampón de ensayo y mezcle bien en vórtex.
14. Pipete 300 µL del tubo de la muestra de recuperación reconstituida (R) en dos tubos de ensayo.
15. Haga un recuento de los tubos de recuperación total (TR) y de recuperación (R) durante al menos dos minutos en un contador gamma.

#### Cálculo de la recuperación

Calcule el % de recuperación dividiendo las cpm de los tubos de recuperación (R) entre las cpm de los tubos de recuperación total (TR) y multiplique por 2,67:

$$\% \text{ Recuperación: } \frac{\text{cpm del tubo de recuperación (R)}}{\text{cpm del tubo de recuperación total (TR)}} \times 2,67 \times 100\%$$

Las recuperaciones de las extracciones deben marcar valores del 40% como mínimo.

#### B. Procedimiento

##### Preparación de las soluciones de calibración

Dilución	Calibrador de vasopresina (=Calibrador a)	Vasopresina Concentración 60 pmol/L
1000 µL de vasopresina de Calibrador a + 1000 µL de tampón de ensayo vórtex	Calibrador b	30 pmol/L
1000 µL de Calibrador b + 1000 µL de tampón de ensayo vórtex	Calibrador c	15 pmol/L
1000 µL de Calibrador c + 1000 µL de tampón de ensayo vórtex	Calibrador d	7,5 pmol/L
1000 µL de Calibrador d + 1000 µL de tampón de ensayo vórtex	Calibrador e	3,8 pmol/L
1000 µL de Calibrador e + 1000 µL de tampón de ensayo vórtex	Calibrador f	1,9 pmol/L
	Tampón de ensayo	0 pmol/L

1. Despues de preparar las soluciones del Calibrador, pipetee 300 µL de cada Calibrador, de control, de cada extracto de plasma o de orina diluida en los tubos etiquetados.
2. Añada 300 µL de tampón de ensayo a los tubos de unión máx. (unión de 0 pmol/L) y 500µL de tampón de ensayo a los tubos blancos (NSB).
3. Añada 200 µL de antisero de vasopresina a todos los tubos, excepto a los tubos blancos (NSB) y de recuento total.
4. Mezcle en vórtex todos los tubos e incube a 2-8°C durante 18-24 horas.
5. Añada 200 µl de  $^{125}\text{I}$ -vasopresina a todos los tubos.
6. Mezcle en vórtex todos los tubos e incube a 2-8°C durante 18-24 horas.
7. Mientras agita continuamente añada 100 µL de fase sólida de doble anticuerpo a todos los tubos, excepto a los de recuento total.
8. Mezcle en el vórtex e incube durante 30-60 minutos a 2-8°C.
9. Centrifuge todos los tubos durante 15 min. a 1700 g a 4°C.
10. Decante o aspire el sobrenadante.
11. Recunte el residuo durante 2-4 minutos.

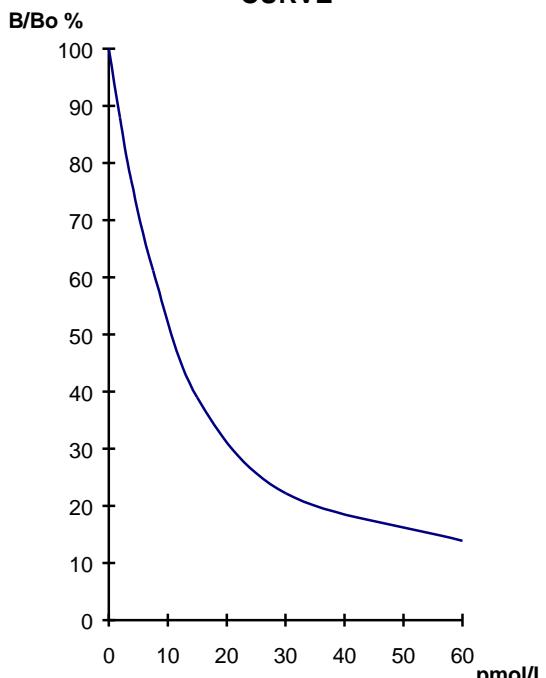
#### XI. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

- Reste la tasa de recuento media (cpm) del NSB de la tasa de recuento media (cpm) de las réplicas de los calibradores, controles y muestras del paciente.
- Se puede generar una curva de calibración graficando las cpm, el % B/Bo o el % B/T de la fracción unida precipitada contra la concentración de los calibradores de vasopresina.
- Para obtener la concentración de vasopresina en las muestras extraídas del paciente y los controles, sus cpm, % B/Bo o % B/T de las fracciones unidas precipitadas se interpolan a partir de la curva de calibración generada.
- La curva de calibración también puede generarse por métodos informáticos. Para la reducción automatizada de los datos, se pueden utilizar los métodos logit/log y Spline.
- Corrija los valores de la orina según el factor de dilución aplicado. Orina: calcule la excreción de vasopresina durante 24 horas: Vasopresina pmol/L x dilución x volumen de orina de 24 horas en L. Este cálculo permite obtener la concentración de vasopresina en pmol/24 horas.
- Corrija los valores del plasma para el % de recuperación de la extracción **Ejemplo:** Concentración de la muestra del paciente medida a partir de la curva: 10 pmol/l Recuperación de la extracción medida después de la extracción con etanol: 45 % Concentración de la muestra del paciente corregida:  $\frac{10}{45} = 22,2 \text{ pmol/L}$

## XII. DATOS TÍPICOS

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

## VASOPRESSIN STANDARD CURVE



## XIII. EFICACIA Y LIMITACIONES

Precisión									
Intraserial					Entre distintas series				
	n	mean de pmol/l	SD	% c.v.		n	mean de pmol/l	SD	% c.v.
muestra A	18	4,17	0,27	6,5	muestra A	6	4,38	0,26	6,0
muestra B	16	20,2	1,00	4,9	muestra B	6	21,4	1,48	6,9

## Calibración

Este ensayo se calibra con referencia a al primer patrón internacional 77/501 de la OMS

## Recuperación

Dos muestras diferentes se adicionan con diferentes cantidades de vasopresina del calibrador

Muestra	Conc. esperada (pmol/L)	Conc. observada (pmol/L)	% Recuperación
A1 A2	9,2 14,3	9,8	106
		14,4	101
B1 B2	9,6 15,3	10,0	104
		15,1	98

## Especificidad

El antisero de vasopresina se cría en conejos.

Se determinaron las siguientes reactividades cruzadas al 50% de unión (B/Bo)

Péptido	% reactividad cruzada
Arg <sup>8</sup> -vasopresina	100
Oxitocina	<0,1
Lys <sup>8</sup> -vasopresina	<0,1
Desmopresina	<0,1
Arg <sup>8</sup> -vasotocina	80

## Sensibilidad

La sensibilidad interpretada como un cambio de 3 desviaciones estándar respecto al calibrador cero es de 0,5 pmol/L

## Interferencia

Las muestras que presenten turbidez, hemólisis, hiperlipemia o que contengan fibrina pueden dar resultados inexactos

## XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Los controles deben realizarse en cada ensayo. Se incluyen dos controles en el kit, cuyo valor (sin procedimiento de extracción) se indica en la etiqueta de los viales. Utilice también los controles recomendados por el fabricante del plasma de control y según la práctica de los laboratorios de referencia para supervisar la exactitud y la precisión de los reactivos y las técnicas. Cada laboratorio debe establecer su propia recuperación de la extracción en sus propias condiciones experimentales.

## XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

Plasma: hasta 13 pmol/L

Orina: 57 ± 22 pmol/orina de 24 horas

## XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Los materiales derivados de la sangre humana y utilizados en la preparación de este kit fueron analizados y dieron un resultado negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), anticuerpos contra el VHC y para anticuerpos contra VIH-1 y VIH-2. Sin embargo, manipule todos los componentes como una posible fuente de infección.

Este kit contiene 125I (semivida: 60 días), que emite radiaciones ionizantes X (28 keV) y γ (35,5 keV). Solo médicos, laboratorios clínicos u hospitales pueden recibir, adquirir, poseer y utilizar el material radiactivo incluido para pruebas clínicas o de laboratorio in vitro que no impliquen la administración interna o externa del material, o de la radiación del mismo, a seres humanos o animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia quedan sujetos a la normativa de cada país.

El cumplimiento de las normas básicas sobre seguridad radiológica debe proporcionar la protección adecuada.

- No comer, beber, fumar ni utilizar productos cosméticos donde se vaya a utilizar material radioactivo.
- No pipetee soluciones radiactivas por vía oral.

- Evite el contacto directo con todos los materiales radiactivos utilizando prendas de protección como batas de laboratorio y guantes desechables.
- Todo el trabajo radiológico debe realizarse en un área designada.
- Los materiales radiactivos deben almacenarse en los contenedores originales en un área designada.
- Los equipos y el material de vidrio de laboratorio, que están expuestos a contaminación, deben separarse para prevenir la contaminación cruzada de radioisótopos diferentes.
- Los vertidos radiactivos deben tratarse inmediatamente de conformidad con los procedimientos establecidos.
- Todos los materiales radiactivos deben desecharse de conformidad con la normativa y las recomendaciones vigentes de las autoridades con jurisdicción sobre el laboratorio.

Los reactivos de este kit contienen azida sódica (0,05%). El contacto con tubos de desagüe de cobre o plomo puede dar lugar a la formación acumulada de depósitos de azida altamente explosivos. Al desechar los reactivos en el alcantarillado, se debe lavar siempre con abundante agua, lo que evita la formación de azida metálica. Las tuberías que se sospeche que están contaminadas con estos depósitos explosivos deben enjuagarse a fondo con una solución de hidróxido de sodio al 10%.

Para más información, consulte la ficha de datos de seguridad del material (FDS).

## XVII. BIBLIOGRAFÍA

1. Sakamoto, M.I. (1987). Atrial Natriuretic Peptide and Vasopressin in Human Plasma Peptides 9, 187-191.
2. Durr, J.A. (1987). Diabetes Insipidus in Pregnancy Associated with abnormally high circulating Vasopressinase activity. New Engl. J. Med. 316, 1070-1074.
3. Vokes, T.J. (1988). Disorders of antidiuretic hormone. Endocr. Metab. Clin. North. Am. 17(2) 281.
4. Miller, M. (1970). Potentiation of Vasopressin Action by Chlorpropamide in Vivo. Endocrinology 86, 1024-1027.
5. Beardwell, C.G. (1971). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Endocr. 33, 254-260.
6. Roberson, Gary L. (1973). Development and Clinical Application of a New method for the Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Plasma. J. Clin. Invest. 52, 2340-2352.
7. Uhlich, E. (1975). Radioimmunoassay of Arginine Vasopressine in Human Plasma. Hormon. Metab. res 7, 501-507.
8. Wagner, H. (1977). Improved Method and its Clinical Application of a Radioimmunoassay of Arginine Vasopressin in Human Serum. Horm. Metab. Res. 9, 223-227.
9. Von Zur Mülen, A. (1977). Untersuchung zur Stimulation der Vasopressin Sekretion bei Gesunden und Patienten mit Diabetes Insipidus. Schweiz med. Wschr. 107, 1097-1100.
10. Pullan, P.T. (1979). Plasma Vasopressin and Human Neurophysins in Physiological and Pathological States Associated with Changes in Vasopressin Secretion. J. of Clin. Endocrin. metab. 49, 580-578.
11. Rowe, J.W. (1980). Evidence in Man that Cigarette Smoking induces Vasopressin Release via an Airway-Specific mechanism. J. Clin. Endocrin. Metab. 51, 170-171.
12. Zerbe, R.A. (1981). Comparison of Plasma Vasopressin Measurements with a Standard Indirect Test in the Differential Diagnosis of Polyuria. New England. J. Med. 305.
13. Zipser, D. (1981). Dual Effects of Antidiuretic Hormone of Urinary Prostaglandin E2 Excretion in Man. J. Clin. Endocr. Metabolism 65, 522-526.
14. Goldschmidt S. (1981). Plasma Arginine Vasopressin in Hyponatremic Patients with Heartfailure. New Engl. J. of Med. 305, 1470-1471.
15. Weider, B. (1981). Plasma-ADH-Spiegel als perioperativer Stressparameter, 1. Mitteilung. Sonderdruck aus: Anästhesie, Intensivtherapie, Notfallmedizin Heft 6, Dez. 1981, 315-318.

16. Bormann, B.V. (1981). Plasma-ADH-Spiegel als perioperativer Stressparameter, 2. Mitteilung. Sonderdruck aus: Anästhesie, Intensivtherapie, Notfallmedizin Heft 6, Dez. 1981, 319-322.
17. Geysant, A. (1981). Plasma Vasopressin, Renin Activity, and Aldosterone Effect of Exercise and Training. Eur. J. Appl. Physiol. 46, 21-30.
18. Rowe, J. (1982). Age-Related Failure of Volume-Pressure Mediated Vasopressin Release. J. Clin. Endocrinol. Metab. 54, 661-663.
19. Freishausen (1976). The Development of a radioimmunoassay for ADH. Acta Endocrinologica 83, 50-63.
20. Miller (1972). Radioimmunoassay of Urinary Antidiuretic Hormone in Man: Response to Water Load and Dehydration in Normal Subjects. J. Clin. Endocrinol. Metab. 34, 537-545.
21. Rees (1974). Multiple Hormones in a Bronchial Tumor. J. Clin. Endocrin. metab. 38, 1090.

## XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	Recuento total	NSB	Calibradores (0-6)	Controles	Muestras
Tampón de ensayo		500 µl			
Calibradores	-	-	300 µl	-	-
Controles	-	-	-	300 µl	-
Muestras	-	-	-	-	300 µl
Antivasopresina	-	-			200 µl
Mezcle en el vórtex e incube durante 18-24 horas a 2 - 8 °C.					
Trazador 125I					200 µl
Mezcle en el vórtex e incube durante 18-24 horas a 2 - 8 °C.					
Fase sólida de doble anticuerpo	-				100 µl
Mezcle en el vórtex e incube durante 30-60 minutos a 2-8 °C.					
Centrifugue 15 min. (1700 g; 4°C)					
Aspire o decante el sobrenadante y haga un recuento de los residuos durante 2-4 minutos					

Otras traducciones de estas instrucciones de uso disponibles para su descarga en nuestra página web:  
<https://www.diasource-diagnostics.com/>