



IVD

CE

25OH-Vitamin D total-RIA-CT

KIP1971 - KIP1974

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

25OH Vitamin D total -RIA-CT

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

A. **Proprietary name :** DIAsource 25OH Vitamin D total -RIA-CT Kit

B. **Catalog number :** KIP 1971 : 96 tests
KIP 1974 : 4 x 96 tests

C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet 2 , 1348 Louvain-La-Neuve , Belgium

For technical assistance or ordering information contact :

Tel : +32 (0) 10 84 99 00

Fax : +32 (0) 10 84 99 90

III. CLINICAL BACKGROUND

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

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

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

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

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

25OHVitamin D stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus and also bone resorption and mineralisation.

25OH Vitamin D might also be active in other tissues responsible for calcium transport (placenta, kidney, mammary gland...) and endocrine gland (parathyroid glands, beta cells...).

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

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

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

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

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

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


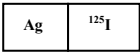
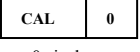
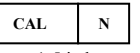
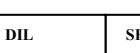
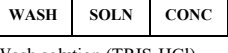

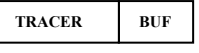

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

At first, calibrators, controls and samples (serum) are incubated with the incubation buffer, directly in coated tubes for 2 hours at room temperature (18-25°C), on a shaker, to release 25OH Vitamin D₃ and 25OH Vitamin D₂ from Vitamin D Binding Protein (DBP).

Then, without washing steps, a fixed amount of ¹²⁵I labelled 25OH Vitamin D is added in each tube to compete with the 25OH Vitamin D₃ and 25OH Vitamin D₂ from samples, controls or calibrators, for a fixed amount of a specific monoclonal antibody sites immobilized to the lower and inner surface of plastic tubes.

After 1 hour incubation at room temperature (18-25°C), on a tube shaker, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed twice and aspirated again. A calibration curve is plotted and the total 25 OH Vitamin D (D₃ and D₂) concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Tests Kit	4x 96 Tests Kit	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with Mab anti 25OH Vit D3 and D2	2 x 48	8 x 48	pink	Ready for use
 Ag ¹²⁵ I ¹²⁵ Iodine labelled 25OH Vit D (HPLC grade).	1 vial 168 kBq lyophilised	4 vials 168 kBq lyophilised	red	Add 10.5 ml of Tracer Buffer
 CAL 0 Calibrator 0: in horse serum and phosphate buffer with gentamycin.	1 vial lyophilised	1 vial lyophilised	yellow	Add 0.5 ml distilled water
 CAL N Calibrators 1-5 in horse serum (see exact values on vial labels)	5 vials lyophilised	5 vials lyophilised	yellow	Add 0.5 ml distilled water
 DIL SPE Specimen diluent in horse serum	1 vial lyophilised	2 vials lyophilised	black	Add 1 ml distilled water
 WASH SOLN CONC Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	4 vials 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 CONTROL N Controls - N = 2 in human plasma with Proclin (see exact values on vial labels)	2 vials lyophilised	2 vials lyophilised	silver	Add 0.5 ml distilled water
 TRACER BUF Tracer Buffer with casein, gentamycin and red dye	1 vial 11.5 ml	4 vials 11.5 ml	red	Ready for use
 INC BUF Incubation Buffer with casein and proclin.	1 vial 55 ml	2 vials 110 ml	green	Ready for use

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

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 25 µl, 100 µl, 500 µl and 1 ml (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Tube shaker (300 to 700 rpm)

- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system
- Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Calibrators :** Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water.
- Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Tracer:** Reconstitute the lyophilised tracer with 10.5 ml of the Tracer Buffer.
- Specimen diluent :**Reconstitute the lyophilised diluent with 1 ml distilled water.
- Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable, if kept in the original well-closed vial at 4°C for maximum one week or at -20°C (with one thawing) until the tracer expiry date.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- This kit is suitable for serum samples.
- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, samples storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

X. PROCEDURE

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 room temperature (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.
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.
Each tube can only be used once.

B. Procedure

The Incubation Buffer must be brought to room temperature (18-25°C), before beginning incubation.

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
- Dispense 25 µl of calibrator or control or sample.
- Dispense 500 µl of Incubation Buffer into each tube, except those for total counts.
- Incubate for 2 hours at room temperature (18-25°C) on a tube shaker (300 to 700 rpm).

Be careful : don't aspirate and don't wash tubes before dispensing the tracer.

- Dispense 100 µl of ¹²⁵Iodine labelled 25OH Vitamin D into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate for 1 hour at room temperature (18-25°C) on a tube shaker (300 to 700 rpm).
- Aspirate the content of each tube (except total counts). Be sure that the tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate. Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Wash tubes again with 2 ml Wash solution (except total counts) and aspirate.

- Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

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

- Plot the (B/B₀(%)) values for each calibrator point as a function of 25OH vitamin D concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
- Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample (B/B₀ (%)) values, determine the total 25OH vitamin D concentrations of the samples from the calibration curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 25 OH vitamin D (B₀/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

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

25OH Vitamin D total		cpm	B/Bo (%)
Total count		67320	
Calibrator	0.0 ng/ml	20520	100.0
	5.8 ng/ml	16288	79.4
	13 ng/ml	10274	50.0
	35 ng/ml	6398	31.2
	50 ng/ml	3926	19.1
	100 ng/ml	1190	5.8

Note : 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

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 Deviation of the distribution of these values.

The LOB was calculated to be 0.8 ng/ml.

The LOD (limit of detection) was calculated as the LOB + 1.65 Standard Deviation of a low concentration sample tested in 10 different runs.

The LOD was calculated to be 1.9 ng/ml.

The LOQ (Limit of Quantitation) was calculated by testing 5 samples of low values 10 times. The LOQ was calculated to be 2.6 ng/ml.

B. Specificity

The percentage of cross reaction was determined by testing sera with spiked and unspiked crossreactants. The results are summarized in the following table:

Compound	Cross-Reactivity (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	85
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	4.1
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	0.2
Vitamin D ₃	ND
Vitamin D ₂	0.1
3-epi-25 hydroxy Vitamin D ₃	0.4
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	23
25,26(OH) ₂ -Vitamin D ₃	26.5

ND : Not detectable

The assay performance is not affected by hemolysis (5 g/L hemoglobin tested) and by bilirubinemia (1 g/L bilirubin tested). Bilirubin conjugate (1g/L tested), triglycerides (2 g/L tested) and ascorbic acid (Vitamin C) (1 g/L) don't interfere with this assay.

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	20	23.1 ± 1.1	4.7	A	12	21.0 ± 1.4	6.7
B	20	37.1 ± 1.7	4.7	B	12	36.6 ± 2.1	5.8

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST

Added 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Recovery (%)
25.4	82
14.3	81
7.8	104
Added 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Recovery (%)
13.8	92
9.0	85
4.2	81

DILUTION TEST

Sample dilution	Theoretical concentr. (ng/ml)	Measured concentr. (ng/ml)
1/1	95.1	95.1
1/2	47.6	43.1
1/4	23.8	24.3
1/1	61.8	61.8
1/2	30.9	31.7
1/4	15.4	14.0
1/1	76.8	76.8
1/2	38.4	37.9
1/4	19.2	17.9

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 20 and 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY

	0 minute (ng/ml)	20 minutes (ng/ml)	30 minutes (ng/ml)
Sample 1	12.2	8.9	9.7
Sample 2	27.9	31.6	28.6
Sample 3	44.2	45.6	45.3

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. Do not freeze-thaw more than twice.

Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. EXPECTED VALUES

Dietary intake, race, season and age are known to affect the normal levels of 25OH.Vit.D3.

Each laboratory should establish its own range based on their local population.

Recent literature has suggested the following ranges for the classification of 25 OH Vitamin D status: Deficiency: <10 ng/mL; Insufficiency: 10-29 ng/mL; Sufficiency: 30 to 100 ng/mL; Potential toxicity: >100 ng/mL.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLET W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004)
Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010)
Defining deficiency of vitamin D .
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.

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

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS μ l	CALIBRATORS μ l	SAMPLE (S) CONTROLS μ l
INCUBATION (in coated tubes)			
Calibrators	-	25	-
Samples / controls	-	-	25
Incubation Buffer	-	500	500
Incubation	2 hours at RT (18-25°C) on a shaker (300 to 700 rpm)		
	!Don't aspirate tubes		
Tracer	100	100	100
Incubation	1 hour at RT (18-25°C) on a shaker (300 to 700 rpm)		
Separation Working Wash solution	-	Aspirate 2 ml	
Separation Working Wash solution	-	Aspirate 2 ml Aspirate	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource's Instrumentation Service confirms that the kit is valid for use on the platform Stratec Riamat 300. If you need any additional information, please contact IVDIstrumentation@diasource.be

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

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

25OH Vitamin D total -RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GÉNÉRALES

- A. **Nom du produit:** DIAsource 25OH Vitamin D total -RIA-CT Kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1971 : 96 tests
KIP1974 : 4 x 96 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

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

L'homme produit naturellement de la vitamine D lorsque sa peau est exposée aux ultraviolets des rayons solaires. La vitamine D3 est métabolisée, principalement dans le foie, en 25-hydroxyvitamine D3 (25 OH D3) qui est la forme principale de la vitamine D circulante dans le corps.

La 25 OH D3 est un précurseur d'autres métabolites de la vitamine D et possède en elle-même une activité limitée. Le dérivé le plus actif est la 1,25-hydroxyvitamine D3 produite par le rein (ou le placenta) par 1 α -hydroxylation de la 25OHD3.

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

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

Une autre source de vitamine D3 et de vitamine D2 est l'alimentation ou la prise de suppléments diététiques. La vitamine D2 étant métabolisée par une voie similaire à la vitamine D3, les deux formes de la vitamine contribuent au statut général en vitamine D d'un individu.

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

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

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

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


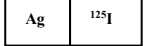
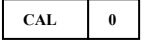
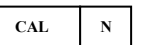

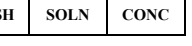
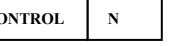
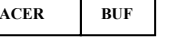
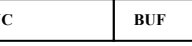
IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Pour commencer, les calibrateurs, les contrôles et les échantillons (sérum) sont incubés avec le tampon d'incubation directement dans les tubes tapissés pendant 2 heures à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur afin de relâcher la 25OH vitamine D₃ et la 25OH vitamine D₂ de la protéine de liaison de la vitamine D (DBP).

Ensuite, sans étape de lavage, une quantité fixe de 25OH vitamine D marquée à l'¹²⁵I est ajoutée à chacun des tubes. Elle entre en compétition avec la 25OH vitamine D₃ et la 25OH vitamine D₂ des échantillons, contrôles et calibrateurs vis-à-vis d'une quantité déterminée de sites d'un anticorps monoclonal spécifique fixés sur la paroi interne et inférieure des tubes en plastique.

Après une incubation de 1 heure à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur pour tubes, une étape d'aspiration termine la réaction de compétition. Les tubes sont ensuite lavés deux fois et à nouveau aspirés. Une courbe de calibration est tracée et les concentrations en 25OH vitamine D totale (D₃ et D₂) des échantillons sont déterminées par interpolation de la concentration sur la courbe de calibration.

V. RÉACTIFS FOURNIS

Réactifs	Trousse pour 96 analyses	Trousse pour 4x96 analyses	Code couleur	Reconstitution
 Tubes tapissés avec un AC monoclonal anti-25OH Vit D ₃ et D ₂ .	2 x 48	8 x 48	rose	Prêt à l'emploi
 25OH Vit D marquée à l'iode ¹²⁵ (de grade HPLC).	1 flacon 168 kBq lyophilisé	4 flacons 168 kBq lyophilisés	rouge	Ajouter 10,5 ml du Tampon du traceur
 Calibrateur 0: dans du sérum de cheval et un tampon phosphate avec de la gentamycine.	1 flacon lyophilisé	1 flacon lyophilisé	jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
 Calibrateurs 1 à 5 dans du sérum de cheval (voir les valeurs exactes sur les étiquettes des flacons).	5 flacons lyophilisés	5 flacons lyophilisés	jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
 Diluant de l'échantillon dans du sérum de cheval.	1 flacon lyophilisé	2 flacons lyophilisés	noir	Ajouter 1 ml d'eau distillée
 Solution de lavage (TRIS-HCl).	1 flacon 10 ml	4 flacons 10 ml	brun	Diluer 70 x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique)
 Contrôles - N = 2 dans du plasma humain avec du Proclin. (voir les valeurs exactes sur les étiquettes des flacons).	2 flacons lyophilisés	2 flacons lyophilisés	argenté	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
 Tampon du traceur avec de la caséine et de la gentamycine et un colorant rouge.	1 flacon 11,5 ml	4 flacons 11,5 ml	rouge	Prêt à l'emploi
 Tampon d'incubation avec de la caséine et du ProClin.	1 flacon 55 ml	2 flacons 110 ml	vert	Prêt à l'emploi

Note : Utiliser le diluant de l'échantillon pour la dilution des échantillons ayant des valeurs supérieures aux valeurs du calibrateur le plus élevé avant l'étape de prétraitement.
Des références internationales ne sont pas disponibles.

VI. MATÉRIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 25 µl, 100 µl, 500 µl et 1 ml (il est recommandé d'utiliser des pipettes de précision avec des pointes en plastique à usage unique)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Agitateur pour tubes (300 à 700 rpm)
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Systèmes d'aspiration et de lavage.
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PRÉPARATION DES RÉACTIFS

- Calibrateurs :** Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Traceur :** Reconstituer le traceur lyophilisé avec 10,5 ml de Tampon du traceur.
- Diluant de l'échantillon :** Reconstituer le diluant lyophilisé avec 1 ml d'eau distillée.
- 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. Éliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES RÉACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à -20°C pendant 3 mois maximum. Éviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage de travail doit être utilisée le jour même.
- Après sa première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration s'il est conservé dans le flacon d'origine bien fermé à -20°C (avec une décongélation) ou pendant maximum une semaine ou à 4°C.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PRÉPARATION ET STABILITÉ DE L'ÉCHANTILLON

- Cette trousse convient pour des échantillons de sérum.
- Les échantillons de sérum 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
- Éviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPÉRATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante (18-25°C) avant utilisation.
Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation.
Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.
Chaque tube ne peut être utilisé qu'une seule fois.

B. Procédure

Le tampon d'incubation doit être porté à température ambiante (18-25°C) avant de commencer l'incubation.

- Étiqueter deux tubes tapissés pour chacun des calibrateurs, contrôles et échantillons. Étiqueter 2 tubes normaux pour la détermination des comptages totaux.
- Distribuer 25 µl de calibrateur ou de contrôle ou d'échantillon.
- Distribuer 500 µl de Tampon d'incubation dans chacun des tubes à l'exception de ceux pour le comptage total.

- Incuber pendant 2 heures à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur de tubes (300 à 700 tpm).

Attention : ne pas aspirer et ne pas laver les tubes avant d'avoir distribué le traceur.

- Distribuer 100 µl de 25OH vitamine D marquée à l'iode¹²⁵ dans chacun des tubes y compris dans les tubes non tapissés du comptage total.
- Secouer doucement à la main le porte-tubes pour libérer toutes les bulles d'air coincées dans les tubes.
- Incuber pendant 1 heure à température ambiante (18-25°C) sur un agitateur de tubes (300 à 700 tpm).
- Aspirer le contenu de chacun des tubes (excepté celui des comptages totaux). S'assurer que la pointe de l'aspirateur atteint bien le fond des tubes tapissés pour réussir à enlever tout le liquide.
- Laver les tubes avec 2 ml de Solution de lavage de travail (excepté ceux des comptages totaux) et aspirer. Éviter la formation de mousse lors de l'addition de la Solution de lavage de travail.
- Laver à nouveau les tubes avec 2 ml de Solution de lavage de travail (excepté ceux des comptages totaux) et aspirer.
- Laisser les tubes reposer en position verticale pendant deux minutes et aspirer les gouttes ou le liquide restant.
- Compter les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes.

XI. CALCUL DES RÉSULTATS

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

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

- Porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B₀(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en 25OH vitamine D, écarter les valeurs aberrantes.
- Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
- L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B₀(%)) détermine les concentrations en 25OH vitamine D totale à partir de la courbe d'étalonnage.
- Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 25OH vitamine D non marquée (B₀/T) doit être vérifié.

XII. DONNÉES TYPES

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

25OH Vitamine D total	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	67320	
Calibrateur		
0,0 ng/ml	20520	100,0
5,8 ng/ml	16288	79,4
13 ng/ml	10274	50,0
35 ng/ml	6398	31,2
50 ng/ml	3926	19,1
100 ng/ml	1190	5,8

Note : 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

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 correspond à la moyenne + 1,65 écart type de la distribution de ces valeurs. La LOB est calculée à 0,8 ng / ml.

La LOD (limite de détection) a été calculée comme étant le LOB + 1,65 écart-type d'un échantillon à faible concentration testé dans 10 essais différents. La LOD est calculée à 1,9 ng / 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 2,6 ng / ml.

B. Spécificité

Le pourcentage de réactivité croisée a été déterminé en analysant des sérums enrichis et non enrichis avec des substances pouvant provoquer une réactivité croisée. Les résultats sont résumés dans le tableau suivant:

Élément	Réactivité Croisée (%)
25OH-Vitamine D ₃	100
25OH-Vitamine D ₂	85
1,25(OH) ₂ -Vitamine.D ₃	4,1
1,25(OH) ₂ -Vitamine.D ₂	0,2
Vitamine D ₃	ND
Vitamine D ₂	0,1
3-épi-25 hydroxy Vitamine D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -Vitamine.D ₃	23
25,26(OH) ₂ -Vitamine D ₃	26,5

ND : Non détectable

La performance de l'essai n'est pas affectée par l'hémolyse (5 g/L d'hémoglobine a été testé) et par la bilirubinémie (1 g/L de bilirubine a été testé). La bilirubine conjuguée (1g/L été testé), les triglycérides (2 g/L été testé) et l'acide ascorbique (vitamine C) (1 g/L) n'interfèrent pas avec cet essai.

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Echantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Echantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	20	23,1 ± 1,1	4,7	A	12	21,0 ± 1,4	6,7
B	20	37,1 ± 1,7	4,7	B	12	36,6 ± 2,1	5,8

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION	
25OH-Vit.D ₃ ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
25,4	82
14,3	81
7,8	104
25OH-Vit.D ₂ ajoutée (ng/ml)	Récupération (%)
13,8	92
9,0	85
4,2	81

TEST DE DILUTION		
Dilution	Concent. théorique (ng/ml)	Concent. mesurée. (ng/ml)
1/1	95,1	95,1
1/2	47,6	43,1
1/4	23,8	24,3
1/1	61,8	61,8
1/2	30,9	31,7
1/4	15,4	14,0
1/1	76,8	76,8
1/2	38,4	37,9
1/4	19,2	17,9

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 20 ou 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI			
	0 minute (ng/ml)	20 minutes (ng/ml)	30 minutes (ng/ml)
Échantillon 1	12,2	8,9	9,7
Échantillon 2	27,9	31,6	28,6
Échantillon 3	44,2	45,6	45,3

XIV. CONTROLE DE QUALITÉ INTERNE

Si les résultats obtenus pour le contrôle 1 et/ou le contrôle 2 ne se trouvent pas dans la fourchette spécifiée sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins d'avoir donné une explication satisfaisante à la divergence.

S'il le souhaite, un laboratoire peut faire ses propres pools d'échantillons de contrôle. Ceux-ci doivent être aliquotés et congelés. Ne pas congeler-décongeler plus de deux fois.

Les critères d'acceptation des différences entre les résultats des échantillons analysés en double doivent répondre aux bonnes pratiques de laboratoire.

XV. VALEURS ATTENDUES

L'alimentation, la race, la saison et l'âge ont une influence sur les taux de 25OH.Vitamine D3 normaux.

Tous les laboratoires doivent établir leur fourchette à partir de leur population locale.

Des articles récents ont suggéré les fourchettes suivantes pour la classification de la teneur en 25OH vitamine D: déficience <10 ng/mL; insuffisance 10-29 ng/mL; suffisance 30 à 100 ng/mL; toxicité potentielle >100 ng/mL.

XVI. PRÉCAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de ^{125}I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35,5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

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

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

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

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

Pour plus d'informations, consultez la fiche signalétique (MSDS).

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.

3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.

4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

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

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

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

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

XVIII. RÉSUMÉ DU PROTOCOLE

	COMPTAGES TOTAUX	CALIBRATEURS	ÉCHANTILLON(S) CONTRÔLES
	μl	μl	μl
INCUBATION (dans des tubes tapissés)			
Calibrateurs	-	25	-
Échantillons / contrôles	-	-	25
Tampon d'incubation	-	500	500
Incubation	2 heures à T° amb. (18-25°C) sur un agitateur (300 à 700 tpm)		
	!Ne pas aspirer les tubes		
Traceur	100	100	100
Incubation	1 heure à T° amb. (18-25°C) sur un agitateur (300 à 700 tpm)		
Séparation	-		Aspirer
Solution de lavage de travail			2 ml
Séparation	-		Aspirer
Solution de lavage de travail			2 ml
Comptage	Compter les tubes pendant 60 secondes		

Le service d'instrumentation de DIAsource confirme que le kit est valide pour une utilisation sur la plateforme Stratec Riamat 300.

Si vous avez besoin d'informations supplémentaires, veuillez contacter IVDIstrumentation@diasource.be



Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

25OH-Vitamin D total-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von 25-Hydroxy Vitamin D3 und D2 (25-OH-D3 und 25-OH-D2) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung: DIAsource 25OH-Vitamin D total-RIA-CT Kit

B. Katalognummer:
KIP1971 : 96 Tests
KIP1974 : 4 x 96 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 84.99.00

Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. KLINISCHER HINTERGRUND

Vitamin D ist der allgemeine Ausdruck zur Bezeichnung von Vitamin D3, oder Cholecalciferol und Vitamin D2, oder Ergocalciferol.

Menschen produzieren Vitamin D3 auf natürliche Weise, wenn die Haut ultravioletten Sonnenstrahlen ausgesetzt wird. Hauptsächlich wird Vitamin D3 in der Leber in 25-Hydroxyvitamin D3 (25 OH D3) metabolisiert, welches die Hauptform von im Körper zirkulierendem Vitamin D darstellt.

25 OH D3 ist ein Vorläufer für andere Vitamin D Metaboliten und ist in begrenztem Umfang selbst aktiv.

Das am meisten aktive Derivat ist 1,25- Hydroxyvitamin D3, welches in den Nieren (oder in der Plazenta) durch eine 1 α - Hydroxylierung produziert wird. 25 OH Vitamin D stimuliert die intestinale Absorption von Kalzium und Phosphor und auch die Knochenresorption und -Mineralisierung. 25 OH Vitamin D kann auch in anderen Geweben aktiv für den Kalziumtransport verantwortlich sein (Plazenta, Nieren, Milchdrüsen,...) und für die Endokrinen Drüsen (Nebenschilddrüse, Beta Zellen,...).

Vitamin D3 und Vitamin D2 werden ebenfalls über die Nahrung oder diätische Ergänzungsmittel verfügbar gemacht.

Da Vitamin D2 auf ähnliche Weise metabolisiert wird wie Vitamin D3, tragen auch beide zum Vitamin D Gesamtstatus einer Person bei. Das ist der Grund, warum eine Bestimmung der beiden Formen von 25 OH Vitamin D für eine korrekte Diagnose des Vitamin D Mangels, der Insuffizienz oder der Intoxikation so wichtig ist.

Vitamin D Mangel ist ein wichtiger Risikofaktor für Rachitis, Knochenerweichung, altersbedingte Osteoporose, Krebs und Schwangerschaftsvorfällen. Die Messung von beiden Formen von 25 OH Vitamin D ist ebenso erforderlich zur Bestimmung der Ursachen von anormalen Konzentrationen von Serum Kalzium Spiegeln bei Patienten.

Vitamin D Intoxikationen verursachen Nieren und Gewebeschäden.


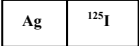
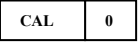
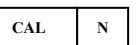
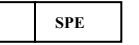
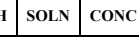
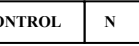

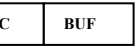
IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Zuerst werden die Kalibratoren, Kontrollen und (Serum) Proben direkt in beschichteten Röhrchen mit Inkubationspuffer für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Schüttler inkubiert, um 25OH Vitamin D₃ und 25OH Vitamin D₂ aus dem Bindungsprotein (DBP) freizusetzen.

Dann wird, ohne Waschschrte, eine festgelegte Menge von ¹²⁵I markiertem 25OH Vitamin D zu jedem Röhrchen gegeben, um mit dem 25OH Vitamin D₃ und 25OH Vitamin D₂ der Proben, Kontrollen oder Kalibratoren um eine festgelegte Menge eines spezifischen monoklonalen Antikörpers zu konkurrieren, der an die innere Wand der Plastikröhrchen gebunden ist.

Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Röhrchenschüttler beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend zweimal gewaschen und erneut abgesaugt. Es wird eine Kalibrationskurve erstellt und die Gesamtkonzentrationen von 25 OH Vitamin D (D₃ und D₂) der Proben durch Dosis Interpolation aus der Kalibrationskurve abgelesen.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenzien	96 Tests pro Kit	4 x 96 Tests pro Kit	Farbcode	Wiederherstellung
 Röhrchen beschichtet mit Mab anti 25OH Vit D ₃ und D ₂	2 x 48	8 x 48	Rosa	Gebrauchsfertig
 ¹²⁵ Iod markiertes 25OH Vitamin D (HPLC Grad)	1 Röhrchen 168 kBq lyophilisiert	4 Röhrchen 168 kBq lyophilisiert	Rot	10,5 ml des Tracerpuffer hinzufügen
 Kalibrator 0: Pferdeserum und Phosphatpuffer mit Gentamycin	1 Röhrchen lyophilisiert	1 Röhrchen lyophilisiert	Gelb	0,5 ml destilliertes Wasser hinzufügen
 Kalibratoren 1-5 in Pferdeserum (exakte Werte befinden sich auf den Röhrchenetiketten)	5 Röhrchen lyophilisiert	5 Röhrchen lyophilisiert	Gelb	0,5 ml destilliertes Wasser hinzufügen
 Probenverdünnung in Pferdeserum	1 Röhrchen lyophilisiert	2 Röhrchen lyophilisiert	Schwarz	1 ml destilliertes Wasser hinzufügen
 Waschlösung (TRIS-HCl)	1 Röhrchen 10 ml	4 Röhrchen 10 ml	Braun	70 x verdünnen mit destilliertes Wasser (Magnetrührer benutzen)
 Kontrollen -N = 2 in Humanplasma mit Proclin (exakte Werte befinden sich auf den Röhrchenetiketten)	2 Röhrchen lyophilisiert	2 Röhrchen lyophilisiert	Silber	0,5 ml destilliertes Wasser hinzufügen
 Tracerpuffer mit Kasein und Gentamycin und roter Farbe	1 Röhrchen 11,5 ml	4 Röhrchen 11,5 ml	Rot	Gebrauchsfertig
 Inkubationspuffer mit Kasein und Proclin	1 Röhrchen 55 ml	2 Röhrchen 110 ml	Grün	Gebrauchsfertig

Bemerkung: Benutzen Sie Probenverdünnung vor dem Vorbehandlungsschritt zur Verdünnung der Proben, die Werte oberhalb des höchsten Kalibrators aufweisen.

Es sind keine internationalen Referenzen vorhanden.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 25 µl, 100 µl, 500 µl und 1 ml (die Benutzung von genauen Pipetten mit Einmalspitzen ist vorgeschrieben)
3. Vortexmixer
4. Magnetrührer
5. Röhrchenschüttler (300 bis 700 upm)
6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaugsystem
8. Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. (minimal Yield 70%)

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen :** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. Tracer:** Rekonstituieren Sie den lyophilisierten Tracer mit 10,5 ml des Tracerpuffer.
- D. Probenverdünner:** Rekonstituieren Sie die lyophilisierte Verdünnung mit 1 ml destilliertes Wasser.
- E. 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.

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.
- Nach der Rekonstitution sind Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8 °C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden for maximum 3 months ,für maximal 3 Monate. Vermeiden Sie wiederholte Einfrier-Auftau Zyklen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Nach dem Erstgebrauch ist der Tracer bis zum Verfallsdatum stabil, wenn er in der gut verschlossenen Originalflasche bei -20°C (mit einmal Auftauen) aufbewahrt wird, oder bei 4°C: maximal eine Woche.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Dieser Kit ist für Serumproben geeignet.
- Serumproben 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 wiederholte Einfrier- Auftau Zyklen.

X. DURCHFÜHRUNG

- A. Bemerkungen zur Durchführung**
Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum.
Mischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur (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.
Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.
Jedes Röhrchen kann nur einmal verwendet werden.

B. Vorgehen

Der Inkubationspuffer muss vor der Verwendung auf Raumtemperatur(18-25°C) gebracht werden.

1. Beschriften Sie beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und Probe. Zur Bestimmung der Gesamtzählung beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Dispensieren Sie 25 µl Kalibrator , Kontrolle oder Probe.
3. Dispensieren Sie 500 µl Inkubationspuffer in jedes Röhrchen, außer in die für die Gesamtzählung vorgesehenen.

- Inkubieren Sie für 2 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Röhrenschüttler (300 bis 700 upm)

ACHTUNG: Waschen oder saugen Sie die Röhren nicht ab, ehe Sie den Tracer dispensieren.

- Dispensieren Sie 100 µl mit ¹²⁵Iod markiertes 25OH Vitamin D in jedes Röhren, einschließlich der unbeschichteten Röhren für die Gesamtzählung.
- Schütteln Sie den Röhrenständer vorsichtig von Hand, um eingeschlossene Luftblasen freizusetzen.
- Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) auf einem Röhrenschüttler (300 bis 700 upm)
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrens ab (Ausnahme: Röhren für die Gesamtzählung). Stellen Sie sicher, dass die Spitze des Absaugers den Boden der beschichteten Röhren erreicht, um alle Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhren mit 2 ml Waschlösung (Ausnahme: Gesamtzählung) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei der Zugabe der Waschlösung.
- Waschen Sie die Röhren erneut mit 2 ml Gebrauchswaschlösung (Ausnahme: Gesamtzählung) und saugen Sie ab.
- Lassen Sie die Röhren für 2 Minuten aufrecht stehen und saugen Sie den verbleibenden Tropfen Flüssigkeit ab.
- Zählen Sie die Röhren in einem Gamma Counter für 60 Sekunden.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Gesamtzählung (Kalibrator oder Proben)}}{\text{Gesamtzählung (Null Kalibrator)}} \times 100$$

- Tragen Sie die (B/B₀(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 25-OH Vitamin D Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4-Parameter“-Kurvenfunktion.
- Bestimmen Sie die gesamt 25-OH Vitamin D Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B₀(%) der Kalibrationskurve.
- Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 25-OH Vitamin D (B₀/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

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

25OH Vitamin D komplett	Cpm	B/Bo(%)
Gesamtaktivität	67320	
Kalibrator		
0,0 ng/ml	20520	100,0
5,8 ng/ml	16288	79,4
13 ng/ml	10274	50,0
35 ng/ml	6398	31,2
50 ng/ml	3926	19,1
100 ng/ml	1190	5,8

Bemerkung: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Die Leerwert-Grenze (LOB) wurde durch mehrmaliges Messen des Leerwerts berechnet und ist definiert als Mittelwert, abzüglich der 1,65-fachen Standardabweichung der Mehrfachmessung des Leerwertes. Das LOB wird mit 0,8 ng / ml berechnet.

Die LOD (Nachweisgrenze) wurde als LOB + 1,65 Standardabweichung einer Probe mit niedriger Konzentration, die in 10 verschiedenen Assays getestet wurde, berechnet. Die LOD wird mit 1,9 ng / ml berechnet.

Die Bestimmungsgrenze (LOQ) wurde durch zehnmaliges Testen von 5 Proben mit niedrigen Werten berechnet. Die Bestimmungsgrenze wurde mit 2,6 ng / ml berechnet.

B. Spezifität

Der Prozentanteil der Kreuzreaktion wurde durch Testen von Seren mit zugefügten und ohne zugefügte Kreuzreaktanten bestimmt.

Substanz	Kreuz-Reaktivität (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	85
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	4,1
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₂	0,2
Vitamin D ₃	ND
Vitamin D ₂	0,1
3-epi-25 hydroxy Vitamin D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	23
25,26(OH) ₂ -Vitamin D ₃	26,5

ND : Nicht nachweisbar

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

C. Präzision

INTRA-ASSAY

INTER-ASSAY

Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	20	23,1 ± 1,1	4,7	A	12	21,0 ± 1,4	6,7
B	20	37,1 ± 1,7	4,7	B	12	36,6 ± 2,1	5,8

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST	
Zugeg. 25-OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
25,4	82
14,3	81
7,8	104
Zugeg. 25-OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
13,8	92
9,0	85
4,2	81

VERDÜNNUNGSTEST		
Probeverdünung	Theoretische Konzent. (ng/ml)	Gemessene Konzent. (ng/ml)
1/1	95,1	95,1
1/2	47,6	43,1
1/4	23,8	24,3
1/1	61,8	61,8
1/2	30,9	31,7
1/4	15,4	14,0
1/1	76,8	76,8
1/2	38,4	37,9
1/4	19,2	17,9

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 20 oder 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhren zugefügt wird.

ZEITABSTAND			
	0 Minuten (ng/ml)	20 Minuten (ng/ml)	30 Minuten (ng/ml)
Probe 1	12,2	8,9	9,7
Probe 2	27,9	31,6	28,6
Probe 3	44,2	45,6	45,3

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Liegen die erhaltenen Ergebnisse der Kontrolle 1 und/oder der Kontrolle 2 nicht innerhalb des, auf dem Fläschchen Etikett, festgelegten Bereichs, kann das Ergebnis so lange nicht verwendet werden, bis eine zufriedenstellende Erklärung für die Diskrepanz gefunden wurde.

Wenn gewünscht, kann jedes Labor eigene Pools von Kontrollproben erstellen, die aliquotiert eingefroren werden. Diese Proben sollten nicht häufiger als zweimal eingefroren und aufgetaut werden.

Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Doppelergebnissen der Proben sollten auf den Regeln für gute Laborpraxis beruhen

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Nahrungsaufnahme, Rasse, Jahreszeit und Alter haben einen Einfluss auf die Normalwerte des 25-OH-Vitamin D3.

Jedes Labor sollte seinen eigenen Bereich, basierend auf der lokalen Bevölkerung, etablieren.

Die gegenwärtige Literatur schlägt die folgenden Bereiche zur Klassifizierung des 25OH Vitamin D Status vor: Mangel: <10 ng/ml; Ungenügend: 10-29 ng/ml; Normal: 30 bis 100 ng/ml; Potentielle Giftigkeit: >100 ng/ml.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (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 vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

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

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte 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 Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

Weitere Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt (MSDS).

XVII. LITERATUR

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004)
Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010)
Defining deficiency of vitamin D .
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M. , VIETH R.(2010)
The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-ZÄHLUNG	KALIBRATOREN	PROBEN-KONTROLLEN
	μ l	μ l	μ l
INKUBATION (in beschichteten Röhrcchen) Kalibratoren Proben/Kontrollen Inkubationspuffer	- - -	25 - 500	- 25 500
Inkubation	2 Stunden bei RT (18-25°C) auf einem Schüttler (300 bis 700 Upm) Röhrcchen nicht absaugen !!		
Tracer	100	100	100
Inkubation	1 Stunde bei RT (18-25°C) auf einem Schüttler (300 bis 700 Upm)		
Trennung Waschlösung Trennung Waschlösung	- - -	Absaugen 2 ml Absaugen 2 ml Absaugen	
Zählung	Zählen Sie die Röhrcchen für 60 Sekunden		

Der Instrumentation Service von DIAsource bestätigt, dass das Kit für die Verwendung auf der Plattform Stratec Riamat 300 gültig ist. Wenn Sie weitere Informationen benötigen, wenden Sie sich bitte an IVDInstrumentation@diasource.be



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

25OH Vitamin D total -RIA-CT

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource 25OH Vitamin D total -Ria-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1971 : 96 tests
KIP1974 : 4 x 96 tests
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La carenza di Vitamina D è un importante fattore di rischio per rachitismo, osteomalacia, osteoporosi senile, cancro ed esiti di una gravidanza. La misurazione di entrambe le forme di 25-OH-Vitamina D è indispensabile anche quando è necessario determinare la causa di un'anomala concentrazione sierica di calcio in un paziente.

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


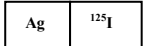
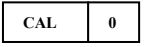
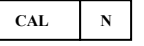
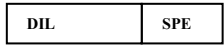

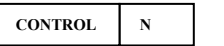
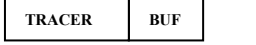
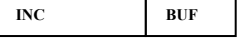
IV. PRINCIPIO DEL METODO

Inizialmente i calibratori, i controlli e i campioni (siero) vengono incubati con il Tampone di incubazione, direttamente nelle provette rivestite, per 2 ore a temperatura ambiente (18-25°C), su un agitatore, per rilasciare la 25-OH-Vitamina D₃ e la 25-OH-Vitamina D₂ dalla proteina legante la Vitamina D (DBP).

Quindi, senza nessuna fase di lavaggio, a ogni provetta si aggiunge una quantità fissa di 25-OH-Vitamina D marcata con ¹²⁵I che compete con la 25-OH-Vitamina D₃ e la 25-OH-Vitamina D₂ all'interno di campioni, controlli o calibratori, per il legame a una quantità fissa di siti specifici sull'anticorpo monoclonale immobilizzato sulla superficie inferiore e interna delle provette di plastica.

Dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente (18-25°C) in un agitatore per provette, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione. Le provette vengono quindi lavate due volte e nuovamente sottoposte ad aspirazione. Si costruisce poi una curva di calibrazione e si calcolano le concentrazioni totali delle 25-OH-Vitamine D (D₃ e D₂) mediante interpolazione della dose sulla curva di calibrazione.

V. REATTIVI FORNITI

Reagenti	Kit da 96 test	4x Kit da 96 test	Codice colore	Ricostituzione
 Provette rivestite con mAb anti-25-OH-Vit D ₃	2 x 48	8 x 48	rosa	Pronte per l'uso
 25-OH-Vit D marcata con ¹²⁵ Iodio (per HPLC)	1 flaconcino 168 kBq liofilizzata	4 flaconcini 168 kBq liofilizzata	rosso	Aggiungere 10,5 ml del Tampone del Tracciante
 Calibratore 0: in siero di cavallo e tampone fosfato con gentamicina.	1 flaconcino liofilizzato	1 flaconcino liofilizzato	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
 Calibratori 1-5 in siero di cavallo (vedi valori esatti sull'etichetta dei flaconcini)	5 flaconcini liofilizzati	5 flaconcini liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
 Diluente dei campioni in siero di cavallo	1 flaconcino liofilizzato	2 flaconcini liofilizzato	nero	Aggiungere 1 ml di acqua distillata
 Soluzione di lavaggio (TRIS-HCl)	1 flaconcino 10 ml	4 flaconcini 10 ml	marrone	Diluire 70 x con acqua distillata (usare un agitatore magnetico)
 Controlli - N = 2 in plasma umano con Proclin (vedi valori esatti sull'etichetta dei flaconcini)	2 flaconcini liofilizzati	2 flaconcini liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
 Tampone del Tracciante con caseina e gentamicina e colorante rosso	1 flaconcino 11,5 ml	4 flaconcini 11,5 ml	rosso	Pronto per l'uso
 Tampone di incubazione con caseina e proclina	1 flaconcino 55 ml	2 flaconcini 110 ml	verde	Pronto per l'uso

Nota: Usare il Diluente dei campioni per diluire i campioni con valori superiori a quelli del calibratore più alto prima della fase di pre-trattamento. Non è disponibile alcun materiale di riferimento internazionale.

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata
2. Pipette per dispensare 25 µl, 100 µl, 500 µl e 1 ml (si raccomanda l'uso di pipette accurate con puntali di plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex
4. Agitatore magnetico
5. Agitatore per provette (da 300 a 700 rpm)
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi
7. Dispositivo di aspirazione e lavaggio.
8. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%).

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** ricostituire i calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. Tracciante:** ricostituire il tracciante liofilizzato con 10,5 ml del Tampone del Tracciante.
- D. Diluente del campione:** ricostituire il diluente liofilizzato con 1 ml di acqua distillata.
- E. Soluzione di lavaggio diluita:** preparare la quantità necessaria di soluzione di lavaggio diluita aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di soluzione di lavaggio concentrata (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavaggio diluita va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8 °C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 1 settimana a 2-8 °C e, suddivisi in aliquote a -20 °C, per periodi più lunghi, fino a un massimo di 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.
- La soluzione di lavaggio diluita deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo il primo utilizzo, il tracciante è stabile se mantenuto nel suo flaconcino originale ben chiuso a 4 °C per un periodo massimo di una settimana o a -20°C (sottoponendolo a un solo scongelamento) fino alla data di scadenza indicata.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Questo kit è adatto per campioni di siero.
- Conservare i campioni di siero a 2-8 °C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20 °C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18-25°C).

Mescolare delicatamente i campioni per 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 e riproducibili o di sistemi di pipettatura automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.

Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

Ogni tubo può essere utilizzato una sola volta.

B. Procedura

Prima di iniziare l'incubazione, il Tampone di incubazione va portato a temperatura ambiente (18-25°C).

1. Etichettare le provette rivestite, calcolandone un numero in duplicato per ciascun calibratore, controllo e campione. Per la determinazione delle conte totali, etichettare 2 provette normali.
2. Erogare 25 µl di calibratore o controllo o campione.
3. Erogare 500 µl di Tampone di incubazione in ogni provetta, eccetto quelle destinate alle conte totali.
4. Incubare per 2 ore a temperatura ambiente (18-25°C) su un agitatore per provette (300—700 rpm).

Attenzione : non aspirare e non lavare le provette prima di introdurvi il traccianti.

- Erogare 100 µl di 25-OH-Vitamina D marcata con ¹²⁵Iodio in ogni provetta, incluse quelle non rivestite per le conte totali.
- Agitare delicatamente a mano il supporto delle provette per liberare eventuali bolle d'aria.
- Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (18-25°C) su un agitatore per provette (300—700 rpm).
- Aspirare il contenuto di ogni provetta (eccetto quelle destinate alle conte totali). Controllare che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo della provetta rivestita per rimuovere tutto il liquido.
- Lavare le provette (eccetto quelle destinate alle conte totali) con 2 ml di Soluzione di lavaggio diluita e aspirare. Evitare la formazione di schiuma durante l'aggiunta della Soluzione di lavaggio diluita.
- Lavare ancora le provette (eccetto quelle destinate alle conte totali) con 2 ml di Soluzione di lavaggio diluita e aspirare.
- Lasciar riposare le provette in posizione verticale per 2 minuti, quindi aspirare le gocce di liquido rimanenti.
- Introdurre le provette nel contatore gamma per 60 secondi per il calcolo delle conte.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore o campioni)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

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

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

25-OH-Vitamina D totale	cpm	B/Bo (%)
Attività totale	67320	
Calibratore		
0,0 ng/ml	20520	100,0
5,8 ng/ml	16288	79,4
13 ng/ml	10274	50,0
35 ng/ml	6398	31,2
50 ng/ml	3926	19,1
100 ng/ml	1190	5,8

Nota: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Il LOB (limite bianco) è stato calcolato misurando il bianco più volte e corrisponde alla media + 1,65 deviazione standard della distribuzione di questi valori. Il LOB è calcolato a 0,8 ng / ml.

Il LOD (limite di rilevamento) è stato calcolato come la LOB + la deviazione standard 1,65 di un campione a bassa concentrazione testato in 10 diversi dosaggi. LOD è calcolato a 1,9 ng / ml.

Il limite di quantificazione (LOQ) è stato calcolato testando 5 campioni di valori bassi 10 volte. Il limite di quantificazione è stato calcolato a 2,6 ng / ml.

B. Specificità

La percentuale di reattività incrociata è stata determinata analizzando i sieri con l'aggiunta o meno di reagenti a reattività incrociata. I risultati sono riassunti nella tabella seguente.

Composto	Reattività incrociata(%)
25-OH-Vitamina D ₃	100
25-OH-Vitamina D ₂	85
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₃	4,1
1,25(OH) ₂ -Vitamina D ₂	0,2
Vitamina D ₃	ND
Vitamina D ₂	0,1
3-epi-25-idrossi-Vitamina D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -Vitamina D ₃	23
25,26(OH) ₂ -Vitamina D ₃	26,5

ND : Non rilevabile

Le prestazioni del saggio non sono influenzate dall'emolisi (5 g/L di emoglobina analizzati) e dalla bilirubinemia (1 g/L di bilirubina analizzati). Bilirubina coniugata (1g/L analizzato), trigliceridi (2 g/L analizzati) e acido ascorbico (Vitamina C) (1 g/L) non interferiscono con questo saggio.

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Campio ne	N	<X> ± DS (ng/ml)	C.V. (%)	Campio ne	N	<X> ± DS (ng/ml)	C.V. (%)
A	20	23,1 ± 1,1	4,7	A	12	21,0 ± 1,4	6,7
B	20	37,1 ± 1,7	4,7	B	12	36,6 ± 2,1	5,8

DS: Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO	
25OH-Vit.D ₃ aggiunta (ng/ml)	Recupero (%)
25,4	82
14,3	81
7,8	104
25OH-Vit.D ₂ aggiunta (ng/ml)	Recupero (%)
13,8	92
9,0	85
4,2	81

TEST DI DILUZIONE		
Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)
1/1	95,1	95,1
1/2	47,6	43,1
1/4	23,8	24,3
1/1	61,8	61,8
1/2	30,9	31,7
1/4	15,4	14,0
1/1	76,8	76,8
1/2	38,4	37,9
1/4	19,2	17,9

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 20 e 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO			
	0 minuti (ng/ml)	20 minuti (ng/ml)	30 minuti (ng/ml)
Campione 1	12,2	8,9	9,7
Campione 2	27,9	31,6	28,6
Campione 3	44,2	45,6	45,3

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

Se i risultati ottenuti per il Controllo 1 e/o il Controllo 2 non rientrano nell'intervallo specificato sull'etichetta del flaconcino, i risultati non possono essere utilizzati salvo nel caso in cui sia possibile trovare una spiegazione soddisfacente per tale discrepanza.

Se opportuno, ogni laboratorio può creare pool propri dei campioni di controllo, che devono essere aliquotati e mantenuti in congelatore. Non congelare/scongelerare per più di due volte.

I criteri di accettazione della differenza tra i risultati in duplicato dei campioni si devono basare sui principi di Buona Pratica di Laboratorio.

XV. VALORI ATTESI

È noto che l'apporto dietetico, l'etnia, la stagione e l'età influiscono sui normali livelli di 25-OH-Vitamina D₃.

Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento in base alla propria popolazione locale.

Di recente in letteratura sono stati suggeriti i seguenti intervalli per la classificazione dello stato della 25-OH-Vitamina D:

Carenza: <10 ng/mL; Insufficienza: 10-29 ng/mL; Sufficienza: da 30 a 100 ng/mL; Potenziale tossicità: >100 ng/mL.

XVI. PRECAUZIONI E AVVERTIMENTI

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti.

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

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

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

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

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti azoturo di sodio come conservante. L'azoturo di sodio può reagire con piombo, rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare azoturi di metallo 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 usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

Per ulteriori informazioni, consultare la scheda di sicurezza (MSDS).

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. ZERWEKH J.E. (2008)

Blood biomarkers of Vitamin D status.

Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.

2. HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
3. HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
4. DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
5. BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
6. HOLICK M.F.(2004)
Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
7. HEANEY R.P. (2010)
Defining deficiency of vitamin D .
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.
8. HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.
9. TAHA N. M. , VIETH R.(2010)
The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	CONTE TOTALI µl	CALIBRA- TORI µl	CAMPIONE/I (CONTROLLI) µl
INCUBAZIONE (in provette rivestite)			
Calibratori	-	25	-
Campioni / controlli	-	-	25
Tampone di incubazione	-	500	500
Incubazione	2 ore a RT (18-25°C) su un agitatore (300—700 rpm) NON ASPIRARE IL LIQUIDO NELLE PROVETTE!		
Tracciante	100	100	100
Incubazione	1 ora a RT (18-25°C) su un agitatore (300—700 rpm)		
Separazione	-		Aspirare
Soluzione di lavaggio dil.			2 ml
Separazione			Aspirare
Soluzione di lavaggio dil.	-		2 ml
			Aspirare
Conta	Contare le provette per 60 secondi		

Il servizio di strumentazione di DIAsource conferma che il kit è valido per l'uso sulla piattaforma Stratec Riamat 300. Se hai bisogno di ulteriori informazioni, contatta IVDInstrumentation@diasource.be



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

25OH Vitamin D total -RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource 25OH- Vitamin D total -Ria-CT
- B. Número de Catálogo:** KIP1971 : 96 test
KIP1974 : 4 x 96 test
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas e información sobre pedidos contactar:

Tel : +32 (0)10 84.99.00

Fax : +32 (0)10 84.99.90

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

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

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

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

25 OH D3 es la precursora para otros metabolitos de la vitamina D y tiene una actividad limitada por sí sola. El derivado más activo es la 1,25-Hidroxivitamina D3, producida en el riñón (o placenta) por la 1 α -hidroxilación de 25OHD3.

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

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

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

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

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

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

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

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


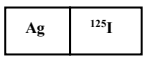
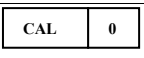
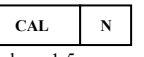
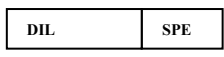

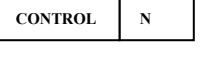
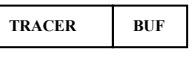
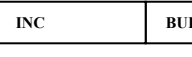
IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Al inicio, los calibradores, controles y muestras (suero) se incuban con el tampón de incubación, directamente en tubos recubiertos durante 2 horas a temperatura ambiente (18-25°C), en un agitador, para liberar 25OH Vitamina D₃ y 25OH Vitamina D₂ de la proteína fijadora de la Vitamina D (DBP).

A continuación y antes de lavar, se añade una cantidad fija de 25OH Vitamina D marcada con ¹²⁵I en cada tubo para competir con la 25OH Vitamina D₃ y la 25OH Vitamina D₂ de las muestras controles o calibradores, por una cantidad fija de sitios de un anticuerpo monoclonal inmovilizado en la zona interna inferior de los tubos de plástico.

Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de tubos, una etapa de aspiración termina la reacción de competencia. Luego los tubos se lavan dos veces y se aspiran nuevamente. Se dibuja una curva de calibración y el total de las concentraciones de las 25 OH Vitaminas D (D₃ y D₂) de las muestras se determinan por interpolación de dosis usando la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit de 96 pruebas	Kit de 4x 96 pruebas	Código de color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con el anticuerpo monoclonal anti 25OH Vit D ₃ y D ₂	2 x 48	8 x 48	rosa	Listo para uso
 25OH Vit D marcada con ¹²⁵ Yodo (grado HPLC).	1 vial 168 kBq liofilizado	4 viales 168 kBq lío filizado	rojo	Añadir 10,5 ml del tampón Trazador
 Calibrador 0: en suero equino y tampón de fosfato con gentamicina	1 vial lío filizado	1 vial lío filizado	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 Calibradores 1-5 en suero equino (ver el valor exacto en la etiqueta del vial)	5 viales lío filizado	5 viales lío filizado	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 Diluyente de la muestra diluido en suero de caballo	1 vial lío filizado	2 viales lío filizado	negro	Añadir 1 ml de agua destilada
 Solución de lavado (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	4 viales 10 ml	marrón	Diluir x70 con agua destilada (utilizar un agitador magnético)
 Controles - N = 2 en plasma humano con proclina (ver el valor exacto en la etiqueta del vial)	2 viales lío filizado	2 viales lío filizado	plata	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 Tampón trazador con caseína y gentamicina y tinción roja	1 vial 11,5 ml	4 viales 11,5 ml	rojo	Listo para uso
 Tampón de incubación con caseína y proclina	1 vial 55 ml	2 viales 110 ml	verde	Listo para uso

Nota : Utilizar el diluyente de la muestra para diluir muestras con valores superiores al valor del calibrador más alto antes del paso de pre tratamiento.

No existe ninguna preparación de referencia internacional.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 25 µl, 100 µl, 500 µl y 1 ml (se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas plásticas)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos (300 a 700 rpm)
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. Calibradores:** reconstituir los calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. Trazador:** Reconstituir el trazador liofilizado con 10,5 ml de Tampón trazador.
- D. Diluyente de la muestra:** Reconstituir el diluyente liofilizado con 1 ml de agua destilada.
- E. Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alícuotar y guardar a -20°C por 3 meses máximo. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día. Después del primer uso, el trazador es estable, si se guarda en el vial original debidamente cerrado a 4°C, máximo por una semana o a -20°C (con una descongelación) hasta la fecha de caducidad
- Después del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se mantiene en el vial original, debidamente cerrado a -20°C (con una descongelación) o máximo durante una semana a 4°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Este kit es adecuado para muestras de suero.
- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 horas, almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.

Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar contaminación cruzada utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

Cada tubo solo se puede usar una vez.

B. Procedimiento

El tampón de incubación debe alcanzar temperatura ambiente (18-25°C) antes de iniciar la incubación.

1. Etiquetar los tubos recubiertos en duplicado para cada calibrador, control y muestra. Para la determinación del conteo total, etiquetar 2 tubos normales.
2. Dispensar 25 µl de calibrador o control o muestra.
3. Dispensar 500 µl de tampón de incubación en cada tubo, excepto en los destinados a conteo total.

4. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de tubos (300 a 700 rpm).

Precaución : no aspirar y no lavar los tubos antes de dispensar el trazador.

5. Dispensar 100 µl de 25OH Vitamina D marcada con ¹²⁵Yodo encada tubo incluyendo los tubos no recubiertos para conteo total.
6. Agitar la gradilla con tubos suavemente con la mano para liberar cualquier burbuja de aire atrapada.
7. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C) en un agitador de tubos (300 a 700 rpm).
8. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de conteo total). Asegurar que la punta del aspirador alcance el fondo del tubo recubierto para sacar todo el líquido.
9. Lavar los tubos con 2 ml de solución de trabajo de lavado (excepto los de conteo total) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la solución de trabajo de lavado.
10. Lavar los tubos nuevamente con 2 ml de solución de lavado (excepto los conteos totales) y aspirar.
11. Dejar los tubos en la posición vertical durante dos minutos y aspirar la gota de líquido remanente.
12. Leer los tubos en un contador gamma durante 60 segundos.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

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

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

3. Representar los valores de (B/B₀%) de cada punto del calibrador frente a las concentraciones de la 25OH vitamina D de cada calibrador, rechazando los puntos externos.
4. Métodos computarizados de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica "4 parámetros".
5. Por interpolación de los valores (B/B₀%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones totales de la 25OH vitamina D desde la curva de calibración.
6. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de la 25OH vitamina D no marcado (B₀/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

25OH Vitamin D total	cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales	67320	
Calibrador		
0,0 ng/ml	20520	100,0
5,8 ng/ml	16288	79,4
13 ng/ml	10274	50,0
35 ng/ml	6398	31,2
50 ng/ml	3926	19,1
100 ng/ml	1190	5,8

Nota : 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

El LOB (límite de blanco) se calculó midiendo el blanco varias veces y corresponde a la media + 1.65 desviación estándar de la distribución de estos valores. El LOB se calcula a 0,8 ng / ml.

El LOD (límite de detección) se calculó como la LOB + 1.65 desviación estándar de una muestra de baja concentración analizada en 10 ensayos diferentes. LOD se calcula en 1,9 ng / ml.

El límite de cuantificación (LOQ) se calculó analizando 5 muestras de valores bajos 10 veces. El límite de cuantificación se calculó en 2,6 ng / ml.

B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada se determinó probando suero con y sin añadido de sustancias que producen reacción cruzada. Los resultados se han resumido en la siguiente tabla:

Compuesto	Reacción-cruzada (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	85
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	4,1
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	0,2
Vitamin D ₃	ND
Vitamin D ₂	0,1
3-epi-25 hidroxilo Vitamina D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	23
25,26(OH) ₂ -Vitamina D ₃	26,5

ND : Indetectable

El rendimiento del ensayo no se ve afectado por hemólisis (probado con 5 g/l hemoglobina), por bilirrubinemia (probado con 1 g/l de bilirrubina). La bilirrubina conjugada (probado con 1g/l), los triglicéridos (probado con 2 g/l) y el ácido ascórbico (Vitamina C) (1 g/l) no interfieren con este ensayo.

C. Precisión

PRECISIÓN INTRA-ENSAYO

PRECISIÓN INTER-ENSAYO

Muestra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Muestra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	20	23,1 ± 1,1	4,7	A	12	21,0 ± 1,4	6,7
B	20	37,1 ± 1,7	4,7	B	12	36,6 ± 2,1	5,8

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DE RECUPERACIÓN	
25OH-Vit.D ₃ añadido (ng/ml)	Recuperado (%)
25,4	82
14,3	81
7,8	104
25OH-Vit.D ₂ añadido (ng/ml)	Recuperado (%)
13,8	92
9,0	85
4,2	81

TEST DILUCIÓN		
Dilución de la muestra	Concent. Teórica (ng/ml)	Concent. Medida (ng/ml)
1/1	95,1	95,1
1/2	47,6	43,1
1/4	23,8	24,3
1/1	61,8	61,8
1/2	30,9	31,7
1/4	15,4	14,0
1/1	76,8	76,8
1/2	38,4	37,9
1/4	19,2	17,9

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 20 y 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

TIEMPO DE ESPERA			
	0 minutos (ng/ml)	20 minutos (ng/ml)	30 minutos (ng/ml)
Muestra 1	12,2	8,9	9,7
Muestra 2	27,9	31,6	28,6
Muestra 3	44,2	45,6	45,3

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Si los resultados obtenidos del Control 1 y /o el Control 2 no caen dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados no se pueden utilizar a no ser que dé una explicación satisfactoria por la discrepancia.

Si así lo desean, cada laboratorio puede preparar sus propias mezclas de muestras de control, que deben guardarse congeladas en alíquotas. No congelar y descongelar más de dos veces.

El criterio de aceptación para las diferencias entre los dos resultados de las muestras deben basarse en Buenas Prácticas de Laboratorio.

XV. VALORES ESPERADOS

La alimentación, la raza, la estación y la edad pueden influenciar los niveles normales de 25OH.Vitamin.D3. Cada laboratorio debe establecer su propio rango basado en su población local.

Literatura reciente ha sugerido los siguientes rangos para la clasificación del estado de la 25 OH Vitamina D: Deficiencia: <10 ng/ml; Insuficiencia: 10-29 ng/ml; Satisfactorio: 30 a 100 ng/ml; Potencialmente tóxico: >100 ng/ml.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

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

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

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

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

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

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

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

Para obtener más información, consulte la Hoja de datos de seguridad del material (MSDS).

XVII. BIBLIOGRAFÍA

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004)
Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010)
Defining deficiency of vitamin D .
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M. , VIETH R.(2010)
The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CONTEO TOTAL	CALIBRAD ORES	CONTROLE S DE LAS MUESTRAS
	μ l	μ l	μ l
INCUBACIÓN (en tubos recubiertos)			
Calibradores	-	25	-
Muestras / controles	-	-	25
Tampón de incubación	-	500	500
Incubación	2 horas a TA (18-25°C) en agitador (300 a 700 rpm) ¡No aspirar los tubos!		
Trazador	100	100	100
Incubación	1 hora a TA (18-25°C) en agitador (300 a 700 rpm)		
Separación	-	Aspirar 2 ml	
Solución de trabajo de lavado	-	Aspirar 2 ml	
Separación	-	Aspirar 2 ml	
Solución de trabajo de lavado	-	Aspirar 2 ml	
Conteo	Leer los tubos durante 60 segundos		

El servicio de instrumentación de DIASource confirma que el kit es válido para su uso en la plataforma Stratec Riamat 300. Si necesita información adicional, comuníquese con IVDInstrumentation@diasource.be

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

25OH Vitamin D total -RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. **Εμπορική ονομασία:** Κιτ 25OH-Vitamin D total -Ria-CT της DIASource
- B. **Αριθμός καταλόγου:** KIP1971 : 96 εξετάσεις
KIP1974 : 4 x 96 εξετάσεις
- 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 84.99.00 Φαξ: +32 (0)10 84.99.90

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Καταρχήν οι βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα δείγματα (ορός) επωάζονται με το ρυθμιστικό διάλυμα επώασης, απευθείας σε επιστρωμένα σωληνάρια 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C), επάνω σε αναδευτήρα, για την απελευθέρωση 25OH βιταμίνης D₃ και 25OH βιταμίνης D₂ από τη δεσμευτική πρωτεΐνη βιταμίνης D (DBP).

Κατόπιν, χωρίς βήματα πλύσης, μία καθορισμένη ποσότητα σημασμένης με ¹²⁵I 25OH βιταμίνης D προστίθεται σε κάθε σωληνάριο για να ανταγωνιστεί την 25OH βιταμίνη D₃ και την 25OH βιταμίνη D₂ των δειγμάτων, υλικών ελέγχου ή βαθμονομητών για μία συγκεκριμένη ποσότητα θέσεων ενός συγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος, που έχουν καθλωθεί στην κάτω και εσωτερική επιφάνεια των πλαστικών σωληναρίων.

Έπειτα από επώαση 1 ωρών σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε αναδευτήρα σωληναρίων, ένα βήμα αναρρόφησης τερματίζει την αντίδραση ανταγωνισμού. Κατόπιν τα σωληνάρια υποβάλλονται δύο φορές σε πλύση και αναρροφώνται ξανά. Σχεδιάζεται μία καμπύλη βαθμονόμησης και οι συνολικές συγκεντρώσεις 25 OH βιταμίνης D (D₃ και D₂) των δειγμάτων προσδιορίζονται με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 εξετάσεων	Κιτ 4x 96 εξετάσεων	Χρωματικός κωδικός	Ανασύσταση			
Σωληνάρια επιστρωμένα με μονοκλ. αντίσωμα αντι 25OH βιτ. D ₃ και D ₂	2 x 48	8 x 48	ροζ	Έτοιμα για χρήση			
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> </tr> </table> Σημασμένη με ¹²⁵ Ιώδιο 25OH βιτ. D (βαθμού HPLC).	Ag	¹²⁵ I	1 φιαλίδιο 168 kBq	4 φιαλίδια 168 kBq	κόκκινο	Προσθέστε 10,5 ml Ρυθμιστικού διαλύματος Ιχνηθέτη	
Ag	¹²⁵ I						
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Βαθμονομητής 0: σε ορό αλόγου και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με γενταμικίνη	CAL	0	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένος	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένος	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml αποσταγμένου νερού	
CAL	0						
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Βαθμονομητές 1-5 σε ορό αλόγου (βλ. ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων)	CAL	N	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένοι	5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένοι	κίτρινο	Προσθέστε 0,5 ml αποσταγμένου νερού	
CAL	N						
<table border="1"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> Αραιωτικό δειγμάτων σε ορό αλόγου	DIL	SPE	1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	μαύρο	Προσθέστε 1 ml αποσταγμένου νερού	
DIL	SPE						
<table border="1"> <tr> <td>WASH</td> <td>S LN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	WASH	S LN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	4 φιαλίδια 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με αποσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	S LN	CONC					
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Υλικά ελέγχου - N = 2 σε ανθρώπινο πλάσμα με Proclin (προκλίνη) (βλ. ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων)	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένα	αργυρό	Προσθέστε 0,5 ml αποσταγμένου νερού	
CONTROL	N						
<table border="1"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Ρυθμιστικό διάλυμα Ιχνηθέτη με καζεΐνη, γενταμικίνη και ερυθρή χρωστική	TRACER	BUF	1 φιαλίδιο 11,5 ml	4 φιαλίδια 11,5 ml	κόκκινο	Έτοιμο για χρήση	
TRACER	BUF						
<table border="1"> <tr> <td>INC</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Ρυθμιστικό διάλυμα Επώασης με καζεΐνη και προκλίνη.	INC	BUF	1 φιαλίδιο 55 ml	2 φιαλίδια 110 ml	πράσινο	Έτοιμο για χρήση	
INC	BUF						

Σημείωση: Χρησιμοποιήστε το Αραιωτικό δειγμάτων για την αραιώση των δειγμάτων με τιμές που υπερβαίνουν εκείνες του υψηλότερου βαθμονομητή πριν από το βήμα προκαταρκτικής επεξεργασίας. Δεν υπάρχει διαθέσιμο διεθνές υλικό αναφοράς.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 25 μl, 100 μl, 500 μl και 1ml (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με ανλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμοί
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Αναδευτήρας σωληναρίων (300 έως 700 σ.α.λ.)
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Συσκευή αναρρόφησης και πλύσης.
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε απεριθμητής ακτίνων γ με δυνατότητα μέτρησης του ¹²⁵I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- B. Υλικά ελέγχου:** Ανασυστήστε τα υλικά ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- C. Ιχνηθέτης:** Ανασυστήστε το λυοφιλοποιημένο ιχνηθέτη με 10,5 ml Ρυθμιστικού διαλύματος Ιχνηθέτη.
- D. Αραιωτικό δειγμάτων:** Ανασυστήστε το λυοφιλοποιημένο αραιωτικό με 1 ml αποσταγμένου νερού.
- E. Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο 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.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8° C.
- Μετά την ανασύσταση, τα υλικά ελέγχου παραμένουν σταθερά για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8° C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα και να διατηρούνται στους -20° C για έως και 3 μήνες το ανώτερο. Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την πρώτη χρήση του, ο ιχνηθέτης είναι σταθερός έως την ημερομηνία λήξης αυτού, εάν φυλάσσεται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο στους -20°C (με μία απόψυξη), για έως και μία εβδομάδα στους 4°C.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Αυτό το κιτ ενδείκνυται για δείγματα ορού.
- Τα δείγματα ορού πρέπει να φυλάσσονται στους 2-8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20° C.
- Αποφύγετε τους επανειλημμένους κύκλους απόψυξης-κατάψυξης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό ανλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις. Κάθε σωλήνας μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο μία φορά.

B. Διαδικασία

Το Ρυθμιστικό διάλυμα Επόωσης πρέπει να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) πριν από την έναρξη της επόωσης.

1. Επιστημόνεται τα επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου και δείγμα. Για τον καθορισμό των συνολικών μετρήσεων, επιστημόνεται 2 κανονικά σωληνάρια.
2. Διανεύμετε 25 ml βαθμονομητή ή υλικού ελέγχου ή δείγματος.
3. Διανεύμετε 500 ml Ρυθμιστικού διαλύματος Επόωσης σε κάθε σωληνάριο, εκτός από εκείνα για τις συνολικές μετρήσεις.
4. Επώστε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε αναδευτήρα σωληναρίων (300 έως 700 σ.α.λ.).

Προσοχή : μην αναρροφήσετε και μην πλύνετε τα σωληνάρια πριν από τη διανομή του ιχνηθέτη.

5. Διανεύμετε 100 ml της σημασμένης με ¹²⁵Ιώδιο 25OH βιταμίνης D σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανομένων των μη επιστρωμένων σωληναρίων για τις συνολικές μετρήσεις.
6. Ανακινήστε ήπια τη θήκη σωληναρίων με το χέρι, για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
7. Επώστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου (18-25°C) σε αναδευτήρα σωληναρίων (300 έως 700 σ.α.λ.).
8. Αναρροφήστε το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (εκτός εκείνων για τις συνολικές μετρήσεις). Βεβαιωθείτε πως το άκρο του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου για να απομακρύνει πλήρως το υγρό.
9. Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος Πλύσης Εργασίας (εκτός εκείνων για τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε. Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά την προσθήκη του διαλύματος Πλύσης Εργασίας.
10. Πλύνετε ξανά τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος Πλύσης (εκτός εκείνων για τις συνολικές μετρήσεις) και αναρροφήστε.
11. Αφήστε τα σωληνάρια σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε την παραμένουσα σταγόνα υγρού.
12. Μετρήστε τα σωληνάρια σε απεριθμητή ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Μετρήσεις(Βαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Μετρήσεις(Μηδενικός βαθμονομητής)}} \times 100$$

3. Παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B₀ (%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της 25OH βιταμίνης D για κάθε σημείο βαθμονομητή και απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
4. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
5. Με παρεμβολή των τιμών των δειγμάτων (B/B₀ (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις της συνολικής 25OH βιταμίνης D των δειγμάτων από την καμπύλη αναφοράς.
6. Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης 25OH βιταμίνης D (B₀/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

25OH Vitamin D total	cpm	B/Bo (%)
Συνολική μέτρηση	67320	
Βαθμονομητής		
0,0 ng/ml	20520	100,0
5,8 ng/ml	16288	79,4
13 ng/ml	10274	50,0
35 ng/ml	6398	31,2
50 ng/ml	3926	19,1
100 ng/ml	1190	5,8

Σημείωση: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Το LOB (Λευκό Όριο) υπολογίστηκε με τη μέτρηση του λευκού αρκετές φορές και αντιστοιχεί στη μέση + 1.65 τυπική απόκλιση της κατανομής αυτών των τιμών. Η LOB υπολογίζεται σε 0,8 ng / ml.

Το LOD (όριο ανίχνευσης) υπολογίστηκε ως η τυπική απόκλιση LOB + 1.65 ενός δείγματος χαμηλής συγκέντρωσης που δοκιμάστηκε σε 10 διαφορετικές δοκιμασίες. Η LOD υπολογίζεται στα 1,9 ng / ml.

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκε με τη δοκιμή 5 δειγμάτων χαμηλών τιμών 10 φορές. Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού υπολογίστηκε στα 2,6 ng / ml.

B. Ειδικότητα

Το ποσοστό διασταυρούμενης αντίδρασης καθορίστηκε μέσω εξέτασης ορών με εμβολιασμό και χωρίς εμβολιασμό ουσιών διασταυρούμενης αντίδρασης. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ένωση	Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα (%)
25OH- βιταμίνη D ₃	100
25OH- βιταμίνη D ₂	85
1,25(OH) ₂ - βιταμίνη D ₃	4,1
1,25(OH) ₂ - βιταμίνη D ₂	0,2
βιταμίνη D ₃	ND
βιταμίνη D ₂	0,1
3-επι-25 υδροξυβιταμίνη D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ - βιταμίνη D ₃	23
25,26(OH) ₂ -βιταμίνη D ₃	26,5

ND : Δεν ανιχνεύεται

Η απόδοση του προσδιορισμού δεν επηρεάζεται από αιμόλυση (ελέγχθηκαν 5 g/L αιμοσφαιρίνης) και από χολερυθριναμία (ελέγχθηκαν 1 g/L χολερυθρίνης). Το σύζευγμα χολερυθρίνης (ελέγχθηκε 1g/L), τα τριγλυκερίδια (ελέγχθηκε 2 g/L) και το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) (1 g/L) δεν παρεμβάλλονται σε αυτόν τον προσδιορισμό.

Γ. Ακρίβεια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Δείγμα	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Δείγμα	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	23,1 ± 1,1	4,7	A	12	21,0 ± 1,4	6,7
B	20	37,1 ± 1,7	4,7	B	12	36,6 ± 2,1	5,8

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

Δ. Ορθότητα

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ	
Προσθεθείσα 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
25,4	82
14,3	81
7,8	104
Προσθεθείσα 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
13,8	92
9,0	85
4,2	81

ΕΞΕΤΑΣΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ		
Αραίωση δείγματος	Θεωρητική συγκέντρωση (ng/ml)	Μετρηθείσα συγκέντρωση (ng/ml)
1/1	95,1	95,1
1/2	47,6	43,1
1/4	23,8	24,3
1/1	61,8	61,8
1/2	30,9	31,7
1/4	15,4	14,0
1/1	76,8	76,8
1/2	38,4	37,9
1/4	19,2	17,9

Ε. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 20 και 30 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ			
	0 λεπτά (ng/ml)	20 λεπτά (ng/ml)	30 λεπτά (ng/ml)
Δείγμα 1	12,2	8,9	9,7
Δείγμα 2	27,9	31,6	28,6
Δείγμα 3	44,2	45,6	45,3

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.

Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης. Μην καταψύχετε και αποψύχετε πάνω από μια φορά.

Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

XV. ANAMENOMENES TIMES

Η διατροφή, η φυλή, η εποχή και η ηλικία είναι γνωστό ότι επηρεάζουν τα φυσιολογικά επίπεδα της 25OH.Vit.D3.

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώνει το δικό του εύρος με βάση τον εκάστοτε τοπικό πληθυσμό.

Στην πρόσφατη βιβλιογραφία προτείνονται τα παρακάτω εύρη για την ταξινόμηση της κατάστασης της 25 OH βιταμίνης D: Έλλειψη: <10 ng/mL, Ανεπάρκεια: 10-29 ng/mL, Επάρκεια: 30 έως 100 ng/mL, Δυνητική τοξικότητα: >100 ng/mL.

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το κιτ αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV).

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

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα

μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσότοπων.

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

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο 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 παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

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

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

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

Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στο Φύλλο δεδομένων ασφαλείας υλικού (MSDS).

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004)
Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010)
Defining deficiency of vitamin D .
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M. , VIETH R.(2010)
The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ μl	ΒΑΘΜΟΝΟΜ ΗΤΕΣ μl	ΔΕΙΓΜΑ (ΤΑ) ΥΛΙΚΑ ΕΛΕΓΧΟΥ μl
ΕΠΩΑΣΗ (σε επιστρ. σωληνάρια) Βαθμονομητές Δείγμ. / υλικά ελέγχου Ρυθμ. διάλυμα επώασης	- - -	25 - 500	- 25 500
Επώαση	2 ώρες σε ΘΔ (18-25°C) σε αναδευτήρα (300 έως 700 σ.α.λ.) <i>Μην αναρροφήσετε τα σωληνάρια!</i>		
Ισχυθέτης	100	100	100
Επώαση	1 ώρα σε ΘΔ (18-25°C) σε αναδευτήρα (300 έως 700 σ.α.λ.)		
Διαχωρισμός Διάλυμα Εργ. Πλύσης Διαχωρισμός Διάλυμα Εργ. Πλύσης	- -	Αναρροφήστε 2 ml Αναρροφήστε 2 ml Αναρροφήστε	
Μέτρηση	Μετρήστε τα σωληνάρια για 60 δευτερόλεπτα		

Η υπηρεσία οργάνων της DIAsource επιβεβαιώνει ότι το κιτ είναι έγκυρο για χρήση στην πλατφόρμα Stratec Riamat 300. Εάν χρειάζεστε επιπλέον πληροφορίες, επικοινωνήστε με το IVDInstrumentation@diasource.be

DIAsource 25OH-VIT D Total-RIA-CT [체외진단의료기기]

I. 제품개요

번호	항 목	내 용
1	품목명	골구성물질대사측정검사시약
2	제품명	DIAsource 25OH-VITD total-RIA-CT
3	허가번호	체외수인 15-269 호
4	사용목적	사람의 혈청 내 25OH VIT D2와 25OH VIT D3 정량 측정
5	포장단위	96 테스트/키트
6	저장방법	2-8℃, 제조일로부터 70일
7	사용기한	2-8℃, 제조일로부터 70일

II. 측정원리

먼저 Vitamin D Binding Protein (DBP)에서 25OH VITD3와 25OH VITD2를 분리하기 위해 표준용액과 정도관리용액, 검체(혈청)를 배양완충액과 함께 코팅된 시험관에서 실온에서 2시간동안 배양한다. 그런 후 세척 단계 없이 시험관 아래의 내부에 고착시킨 고정된 양의 특이 항체 부위에 대해 추출한 검체나 표준용액, 정도관리용액으로부터의 25OH VITD3와 25OH VITD2의 결합을 위해 ¹²⁵I 표지 25OH Vitamin D를 추가한다. 실온에서 1시간의 배양 후, 흡입 단계를 시행하여 결합반응을 중지시킨다. 그런 후 시험관은 2번 세척하고 Counter에서 계수된다.

III. 제공되는 시약

번호	명칭	구성	Color Code	재구성
1	Coated tubes	2 X 48	Pink	즉시 사용 가능
2	Tracer ¹²⁵ I labeled 25OH-Vit D	1 vial, 동결건조 168 kBq	Red	Tracer Buffer 10.5ml 첨가
3	Calibrator 0	1 vial, 동결건조	Yellow	증류수 0.5ml 첨가
4	Calibrators 1 - 5	5 vials, 동결건조	Yellow	증류수 0.5ml 첨가
5	Specimen Diluent	1 vial, 동결건조	Black	증류수 1ml 첨가
8	Wash Solution Concentration	1 vial, 10ml	Brown	증류수로 70배 희석 (자력교반기 사용)
9	Control I & II	2 vials, 동결건조	Silver	증류수 0.5ml 첨가
6	Tracer Buffer	1 vial, 11.5ml	Red	즉시 사용 가능
5	Incubation Buffer	1 vial, 55ml	Green	즉시 사용 가능

Note: (전처리 단계 전) 가장 높은 값의 표준용액 보다 높은 값을 가진 검체의 희석에는 표본 희석제를 사용.

IV. 측정절차

1. 검체 준비

- 혈청만 사용가능하며 2-8℃에 보관한다.
- 측정이 24시간 이내에 이루어지지 않는다면 검체는 -20℃에 냉동 저장해야 한다.
- 냉동/해동 반복을 피한다.

2. 시약 조제

- 표준용액: 0.5ml의 증류수를 첨가하여 재구성한다.
- 정도관리 용액: 0.5ml의 증류수를 첨가하여 재구성한다.
- 트레이서: 트레이서 완충액 10.5ml를 첨가하여 재구성한다.
- 검체 희석액: 1ml의 증류수를 첨가하여 재구성한다.
- 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.

3. 검사 방법 (*자동화 장비 : Gamma Pro)

Note 1: 배양완충액은 사용 전 실온(18-25° C)으로 가져와야 한다.

Note 2: 트레이서를 분주하기 전에는 시험관을 흡입하거나 세척하지 않는다.

- 각 calibrator, control, 그리고 검체를 위한 코팅된 튜브를 2개씩 준비하여 라벨을 부착한다. Total count는 2개의 일반 시험관을 준비한다.
- Calibrator, control, 및 검체 25ul 준비하여 각 시험관에 분주한다.

- Total count를 제외한 각 시험관에 배양완충액 500ul를 차례대로 첨가한다.
- 실온(18-25℃)에 300-700 RPM에 설정된 shaker로 2시간 동안 반응시킨다.
- 반응이 끝난 후 total count를 포함한 모든 시험관에 100ul의 트레이서를 분주한다.
- 시험관 랙을 손으로 부드럽게 흔들어 모든 기포를 제거한다.
- 실온(18-25℃)에 300-700 RPM에 설정된 tube shaker로 1시간 동안 반응시킨다.
- Total count를 제외한 모든 시험관의 액체를 흡입하여 제거한다. 흡입기의 끝 부분이 바닥에 닿아서 모든 액체가 제거 될 수 있도록 한다.
- Total count를 제외한 모든 시험관을 2ml의 세척용액으로 세척한 후 액체를 흡입하여 제거한다. 세척용액을 첨가할 때 거품이 생기지 않도록 조심한다.
- (9)번을 다시 반복한다.
- 세척 후 약 2분 동안 시험관을 똑바로 세워 놓은 후 남은 액체를 모두 흡입하여 제거한다.
- 60초 동안 Gamma Counter로 cpm을 측정한다.

4. 결과 산출

(1) 자료정리

- 두 번 측정된 값의 평균값을 구한다.
- 아래의 공식을 이용하여 결합된 방사능을 계산한다.

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

- 각 calibrator po H Vitamin D 농도의 함수로 표시한다. 이상치는 제외한다.
- 자동으로 계산할 경우 4-Parameter Logistic Function 곡선적합(curve fitting)을 권장한다.
- 각 검체의 25OH Vitamin D 농도는 보간법으로 표준곡선에서 산출한다.
- 각 검사 마다 B0 / T (%)를 확인해야 한다.

(2) 참고치

- 결핍: < 10 ng/ml
 불충분: 10 - 29 ng/ml
 충분: 30 - 100 ng/ml
 독성가능: >100 ng/ml

5. 표준 데이터

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

25OH-Vitamin D Total		cpm	B/Bo (%)
Total count		67320	
Calibrator	0.0 ng/ml	20520	100.0
	5.8 ng/ml	16288	79.4
	13 ng/ml	10274	50.0
	35 ng/ml	6398	31.2
	50 ng/ml	3926	19.1
	100 ng/ml	1190	5.8

Note: 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

V. 완제품 시험규격

1. 외관검사

- 제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고, 확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.
- 문서번호 ITPKKIP1971에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다
 - 제품 구성표의 lot와 키트안의 구성품이 일치하는지 확인
 - 구성품과 키트의 유효기간을 확인
 - 구성품의 라벨상태를 확인
 - 구성품의 포장상태를 확인(용량, 물질 등)
 - 서류가 맞게 있는지 확인(사용설명서, 품질서류 등)
 - 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인
 - 검사 후 담당자는 확인양식(FTPK004)에 기입하고 서명한다.

VI. 사용시 주의사항

- 체외진단용으로 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.
- 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.
 - 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.
 - 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)
 - 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펫팅 하지 않는다.
 - 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.

DIAsource 25OH-VIT D Total-RIA-CT [체외진단의료기기]

- (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 취급과 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 처리되어 야만 한다. 방사선안전에 대한 기본 규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.

Před použitím si přečtěte celý protokol.

Celkový 25OH Vitamin D-RIA-CT

I. STANOVENÉ POUŽITÍ

Radioimunologický test pro kvantitativní měření *in vitro* 25-hydroxyvitaminu D3 a D2 (25-OH-D3 a 25-OH-D2) v séru.

II. VŠEOBECNÉ INFORMACE

A. Registrovaný název: Sada DIASource Celkový 25OH Vitamin D -RIA-CT

B. Katalogové číslo: KIP 1971: 96 testů
KIP 1974: 4 x 96 testů

C. Vyrábí: DIASource ImmunoAssays S.A.

Rue du Bosquet 2, 1348 Louvain-La-Neuve, Belgie

Kontakt pro technickou pomoc nebo informace o objednávkách:

Tel.: +32 (0) 10 84 99 00

Fax: +32 (0) 10 84 99 90

III. KLINICKÉ POZADÍ

Vitamin D je druhový termín sloužící k označení vitamínu D3 nebo cholekalciferolu a vitamínu D2 neboli ergokalciferolu. Člověk přirozeně produkuje vitamin D3, když je pokožka vystavena ultrafialovému slunečnímu záření. Převážně v játrech se vitamin D3 metabolizuje na 25-hydroxyvitamin D3 (25 OH D3), který je hlavní podobou vitamínu D, který v těle obíhá.

25 OH D3 je prekurzorem pro další metabolity vitamínu D a má také sám o sobě omezenou aktivitu.

Nejaktivnějším derivátem je 1,25-hydroxyvitamin D3 produkovaný v ledvinách (nebo placentě) 1 α -hydroxylací 25OHD3.

25OHVitamin D stimuluje vstřebávání vápníku a fosforu ve střevě a také resorpci a mineralizaci kostí.

25OH Vitamin D může být také aktivní v jiných tkáních odpovědných za přenos vápníku (placenta, ledviny, mléčná žláza...) a endokrinní žlázy (příštítná tělíska, beta buňky...).

Vitamin D3 a vitamin D2 jsou také dostupné prostřednictvím potravinových nebo dietních doplňků.

Jelikož se vitamin D2 metabolizuje podobně jako vitamin D3, oba přispívají k celkovému statutu vitamínu D každého jednotlivce.

Právě proto je velice důležité měřit obě podoby 25 OH vitamínu D stejně kvůli správné diagnostice deficiencie, nedostatečnosti nebo intoxikace vitamínu D.

Deficience vitamínu D je důležitý rizikový faktor pro křivici, měknutí kostí, stařeckou osteoporózu, rakovinu a výsledky těhotenství.

Měření obou forem 25 OH vitamínu D je také nutné v zájmu stanovení příčiny abnormální koncentrace vápníku v séru u pacientů.

Intoxikace vitamínem D prokazatelně způsobuje poškození ledvin a tkání.


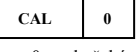
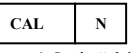
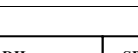
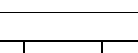
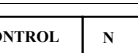
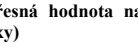
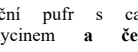
IV. PRINCIPY METODY

V inkubačním pufru se nejprve inkubují kalibrátory, kontrolní složky a vzorky (sérum), a to přímo v potažených zkumavkách po dobu 2 hodin při pokojové teplotě (18-25 °C) na třepačce, aby se uvolnil 25OH vitamín D₃ a 25OH vitamín D₂ z proteinu, který váže vitamín D (DBP).

Pro pevně stanovené množství specifických monoklonálních protilátkových oblastí imobilizovaných na dolní a vnitřní ploše plastových zkumavek se pak do každé zkumavky přidá bez mycích kroků pevné množství 25OH vitamínu D s označením ¹²⁵I, který reaguje s 25OH vitamínem D₃ a 25OH vitamínem D₂ ze vzorků, kontrolních nebo kalibračních složek.

Inkubaci v délce 1 hodiny při pokojové teplotě (18-25 °C) na třepačce se kompetitivní reakce ukončí odsávacím krokem. Zkumavky se pak dvakrát omyjí a znovu odsávají. Kalibrační křivka se zanesse a celkové koncentrace 25 OH vitamínu D (D₃ a D₂) ve vzorcích se určí interpolací dávky z kalibrační křivky.

V. DODÁVANÁ ČINIDLA

Činidla	Sada 96 testů	Sada 4x96 testů	Barevný kód	Rekonstituce
Zkumavky potažené Mab anti 25OH Vit D ₃ a D ₂	2 x 48	8 x 48	růžová	Připraveno k použití
 ¹²⁵ Jódem označený 25OH Vit D (úroveň HPLC).	1 lahvička 168 kBq Lyofilizované	4 lahvičky 168 kBq Lyofilizované	červená	Přidejte 10,5 ml indikačního pufru
 Kalibrátor 0: v koňském séru a fosfátovém pufru s gentamycinem.	1 lahvička Lyofilizované	1 lahvička Lyofilizované	žlutá	Přidejte 0,5 ml destilované vody
 Kalibrátory 1-5 v koňském séru (viz přesná hodnota na štítku lahvičky)	5 lahviček Lyofilizované	5 lahviček Lyofilizované	žlutá	Přidejte 0,5 ml destilované vody
 Zředovací vzorek v koňském séru	1 lahvička Lyofilizované	2 lahvičky Lyofilizované	černá	Přidejte 1 ml destilované vody
 Mycí roztok (TRIS-HCl)	1 lahvička 10 ml	4 lahvičky 10 ml	hnědá	Ředíte 70 x s destilovanou vodou (použijte magnetickou míchačku)
 Kontroly - N = 2 v lidské plazmě s proclinem (viz přesná hodnota na štítku lahvičky)	2 lahvičky Lyofilizované	2 lahvičky Lyofilizované	stříbrná	Přidejte 0,5 ml destilované vody
 Indikační pufr s caseinem, gentamycinem a červeným barvivem	1 lahvička 11,5 ml	4 lahvičky 11,5 ml	červená	Připraveno k použití
 Inkubační pufr s caseinem a proclinem.	1 lahvička 55 ml	2 lahvičky 110 ml	zelená	Připraveno k použití

Poznámka: Zředovací vzorek použijte pro ředění vzorků s hodnotou nad hodnotu nejvyššího kalibrátoru před krokem předběžného ošetření. K dispozici není žádný mezinárodní referenční materiál.

VI. MATERIÁL, KTERÝ NENÍ SOUČÁSTÍ BALENÍ

Následující materiál je nezbytný, ale není součástí sady:

- Destilovaná voda
- Pipety pro přenos: 25 µl, 100 µl, 500 µl a 1 ml (doporučuje se použití přesných pipet s jednorázovými plastovými hroty)

- Vírový mixér
- Magnetická míchačka
- Třepačka zkumavek (300 až 700 ot/min)
- 5 ml automatická injekční stříkačka (typ Cornwall) pro promytí
- Systém odsávání
- Použit lze jakýkoli čítač gama schopný měřit ¹²⁵I (minimální výnos 70 %).

VII. PŘÍPRAVA ČINIDLA

- Kalibrátory:** Rekonstituuje kalibrátory s 0,5 ml destilované vody.
- Kontroly:** Rekonstituuje kontrolu s 0,5 ml destilované vody.
- Indikátor:** Rekonstituuje lyofilizovaný indikátor s 10,5 ml indikačního pufru.
- Zředovací vzorek:** Rekonstituuje lyofilizované ředidlo s 1 ml destilované vody.
- Pracovní promývací roztok:** Připravte si vhodný objem pracovního promývacího roztoku tím, že přidáte 69 dílů destilované vody k 1 dílu promývacího roztoku (70x). K promíchání použijte magnetickou míchačku. Na konci dne nevyužitý pracovní promývací roztok zlikvidujte.

VIII. SKLADOVÁNÍ A DATA EXSPIRACE ČINIDEL

- Před otevřením nebo rekonstitucí jsou všechny složky sady stabilní do data expirace uvedeného na štítku, a to při skladování při teplotě 2 až 8 °C.
- Po rekonstituci jsou kalibrátory a kontroly stabilní po dobu jednoho týdne při teplotě 2 až 8 °C. Při delším uskladnění je třeba vytvořit alikvotní množství a skladovat při -20 °C po dobu maximálně 3 měsíců. Neprovádějte následné cykly mražení-rozmražení.
- Čerstvě připravený pracovní promývací roztok by se měl spotřebovat tentýž den.
- Po prvním použití je indikátor stabilní, pokud se uschová v originální dobře uzavřené lahvičce při teplotě maximálně 4 °C po dobu jednoho týdne nebo při teplotě -20 °C (s jedním rozmražením) do data expirace indikátoru.
- Změny fyzického vzhledu reakčních činidel v sadě mohou svědčit o nestabilitě nebo zhoršení kvality.

IX. SBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

- Tato sada je vhodná pro vzorky séra.
- Vzorky séra je nutno skladovat při 2-8 °C.
- Pokud test neproběhne do 24 hodin, doporučuje se skladovat vzorky při teplotě -20 °C.
- Neprovádějte následné cykly mražení-rozmražení.

X. POSTUP

A. Poznámky k manipulaci

Sadu nebo její součástky nepoužívejte po datu expirace. Nesměšujte materiály z jiných šarží sady. Před použitím uveďte všechna reakční činidla na pokojovou teplotu (18-25 °C). Všechna reakční činidla a vzorky důkladně promíchejte šetrným natřásáním nebo kroužením. Použijte čistý jednorázový hrot pipety pro přidání každého odlišného reakčního činidla a vzorku, aby nedošlo ke křížové kontaminaci. Vysoce přesné pipety nebo automatické pipetovací zařízení přesnost výrazně zlepší. Připravte si kalibrační křivku pro každý krok, nepoužívejte data z předchozích kroků. Každou zkumavku lze použít pouze jednou.

X. Postup

Inkubační pufr musí mít pokojovou teplotu (18-25 °C), než zahájíte inkubaci.

- Potažené zkumavky označte s duplikátem pro každý kalibrátor, kontrolu i vzorek. Pro určení celkového počtu označte 2 normální zkumavky.
- Nadávkujte 25 µl kalibrátoru nebo kontroly nebo vzorku.
- Nadávkujte 500 µl inkubačního pufru do každé zkumavky vyjma těch pro celkové počty.
- Inkubujte po dobu 2 hodin při pokojové teplotě (18-25 °C) na třepačce zkumavek (300 až 700 ot/min).

Dávejte pozor: zkumavky před nadávkováním indikátoru neodsávejte a nepromývejte.

- Nadávkujte 100 µl 25OH vitamínu D s označením ¹²⁵Jódu do každé zkumavky včetně nepotažených zkumavek pro celkové počty.
- Stojan na zkumavky rukou mírně protřepejte, aby se uvolnily případné vzduchové bubliny.

- Inkubujte po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě (18-25 °C) na třepače zkumavek (300 až 700 ot/min).
- Vysajte obsah každé zkumavky (vyjma těch pro celkové počty). Dávejte pozor, aby hrot odsávačky dosáhl na dno potažené zkumavky, abyste získali veškerou kapalinu.
- Promyjte zkumavky 2 ml pracovního promývacího roztoku (vyjma těch pro celkové počty) a vysajte. Během přidávání pracovního promývacího roztoku zabraňte napěnění.
- Promyjte zkumavky znovu pomocí 2 ml promývacího roztoku (vyjma těch pro celkové počty) a vysajte.
- Nechte zkumavky stát svisle po dobu dvou minut a odsajte zbývající kapku kapaliny.
- Na dobu 60 sekund umístěte zkumavky do čítače gama.

XI. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

- Vypočítejte střední hodnotu ověřovacích zkoušek.
- Vypočítejte vázanou radioaktivitu jako procento vázání určeného v nulovém bodě kalibrátoru (0) podle následujícího vzorce:

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

- Zaneste hodnoty (B/B₀(%)) každého kalibračního bodu jako funkci koncentrace 25OH vitamínu D každého kalibračního bodu. Zjevné extrémní hodnoty odmítněte.
- Způsoby s pomocí počítače lze také použít k vytvoření kalibrační křivky. Pokud použijete automatické zpracování výsledku, doporučuje se logistická funkční křivka se 4 parametry.
- Interpolací hodnot vzorku (B/B₀(%)) určete celkové koncentrace 25OH vitamínu D ve vzorcích z kalibrační křivky.
- U každé zkoušky je nutno zkontrolovat celkový indikátor vázaný v nepřítomnosti neoznačeného 25 OH vitamínu D (B₀/T).

XII. BĚŽNÁ DATA

Následující data jsou pouze pro ilustraci a nikdy by se neměla používat namísto kalibrační křivky v reálném čase.

25OH vitamín D celkem	cpm	B/Bo (%)
Celkový počet	67320	
Kalibrátor		
0,0 ng/ml	20520	100,0
5,8 ng/ml	16288	79,4
13 ng/ml	10274	50,0
35 ng/ml	6398	31,2
50 ng/ml	3926	19,1
100 ng/ml	1190	5,8

Poznámka: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. ÚČINNOST A OMEZENÍ

A. Limit detekce

LOB (mez slepého pokusu) se vypočítal několikerým měřením slepého pokusu a pak se vypočítal jako střední hodnota + 1,65 standardní odchylka distribuce těchto hodnot.

LOB byl vypočítán na 0,8 ng/ml.

LOD (mez detekce) byla vypočítána jako LOB + 1,65 standardní odchylka vzorku s nízkou koncentrací v 10 různých pokusech.

LOD byl vypočítán na 1,9 ng/ml.

LOQ (mez stanovitelnosti) se vypočítala otestováním 5 vzorků s nízkými hodnotami, a to desetkrát. LOQ byl vypočítán na 2,6 ng/ml.

B. Specifita

Procento křížové reakce se určilo otestováním séra s obohacenými a neobohacenými křížovými reaktanty. Výsledky shrnuje následující tabulka:

Sloučenina	Křížová reaktivita (%)
25OH-vitamín D ₃	100,0
25OH-vitamín D ₂	85,0
1,25(OH) ₂ -vitamín.D ₃	4,1
1,25(OH) ₂ -vitamín.D ₂	0,2
Vitamín D ₃	ND
Vitamín D ₂	0,1
3-epi-25 hydroxy vitamín D ₃	0,4
24,25(OH) ₂ -vitamín.D ₃	23,0
25,26(OH) ₂ -vitamín D ₃	26,5

ND: Nedetekovatelné

Výkonnost testu není ovlivněna hemolýzou (5 g/l testovaného hemoglobinu) a bilirubiněmi (1 g/l testovaného bilirubinu). Konjugát bilirubinu (1 g/l testovaný) triglyceridy (2 g/l testované) a kyselina askorbová (vitamín C) (1 g/l) nenarušují funkci tohoto testu.C.

Přesnost

V RÁMCI ZKOUŠKY				MIMO RÁMEC ZKOUŠKY			
Vzorek	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Vzorek	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	20	23,1 ± 1,1	4,7	A	12	21,0 ± 1,4	6,7
B	20	37,1 ± 1,7	4,7	B	12	36,6 ± 2,1	5,8

SD: Standardní odchylka; CV: Variační koeficient

D. Přesnost

TEST OBNOVY

Přidáno 25OH-Vit.D ₃ (ng/ml)	Obnova (%)
25,4	82
14,3	81
7,8	104
Přidáno 25OH-Vit.D ₂ (ng/ml)	Obnova (%)
13,8	92
9,0	85
4,2	81

TEST ŘEDĚNÍ

Ředění vzorku	Teoretická koncent. (ng/ml)	Měřená koncent. (ng/ml)
1/1	95,1	95,1
1/2	47,6	43,1
1/4	23,8	24,3
1/1	61,8	61,8
1/2	30,9	31,7
1/4	15,4	14,0
1/1	76,8	76,8
1/2	38,4	37,9
1/4	19,2	17,9

E. Časový odstup mezi nadávkováním posledního kalibrátoru a vzorku

Jak je uvedeno níže, výsledky zkoušky zůstávají přesné, i když se vzorek dávkuje 20 a 30 minut po přidání kalibrátoru do potažených zkumavek.

ČASOVÝ ODSTUP

	0 minut (ng/ml)	20 minut (ng/ml)	30 minut (ng/ml)
Vzorek 1	12,2	8,9	9,7
Vzorek 2	27,9	31,6	28,6
Vzorek 3	44,2	45,6	45,3

XIV. INTERNÍ KONTROLA KVALITY

Pokud výsledky získané pro kontrolu 1 a/nebo kontrolu 2 nejsou v rozpětí stanoveném na štítku lahvičky, výsledky nelze použít, pokud není uvedeno uspokojivé vysvětlení odlišnosti.

Pokud je to žádoucí, každá laboratoř může vytvořit vlastní sady kontrolních vzorků, které by měly být uchovávány mražené v poměrném množství. Proces zmražení-rozmražení neprovádějte více než dvakrát.

Kritéria přijatelnosti pro rozdíl mezi výsledky vzorků duplo by měla vycházet z dobrých laboratorních postupů.

XV. OČEKÁVANÉ HODNOTY

Dietní příjem, rasa, roční období a věk mají vliv na normální hladiny 25OH.Vit.D3.

Každá laboratoř by si měla stanovit vlastní rozsah podle své místní populace.

Z nedávné literatury vyplynuly následující rozsahy pro klasifikaci statutu 25 OH vitamínu D: Deficience: <10 ng/mL; Nedostatečnost: 10-29 ng/mL; Dostatečnost: 30-100 ng/mL; Možná toxicita: >100 ng/mL.

XVI. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ A VAROVÁNÍ

Bezpečnost

Pouze pro diagnostiku *in vitro*.

Tato sada obsahuje ¹²⁵I (poločas: 60 dní) vysílající ionizační záření X (28 keV) a γ (35.5 keV).

Tento radioaktivní produkt lze předat pouze oprávněným osobám, které jej mohou jako jediné používat; nákup, skladování, používání a výměna radioaktivních produktů se řídí zákony v zemi konečného uživatele. Produkt nesmí být v žádném případě podáván lidem nebo zvířatům.

Veškerá manipulace s radioaktivními produkty by měla být vykonávána ve vyhrazené oblasti mimo běžný provoz. Laboratoř musí vést protokol o příjmu a skladování radioaktivních materiálů. Laboratorní zařízení a skleněné pomůcky, které by mohly být kontaminované radioaktivními látkami, je nutno segregovat, aby se zabránilo zkřížené kontaminaci různými radio-izotopy.

Jakýkoli únik radioaktivních látek musí být okamžitě uklizen v souladu s bezpečnostními postupy pro radiaci. Veškerý radioaktivní odpad je nutno zlikvidovat v souladu s následujícími místními předpisy a pokyny orgánů vykonávajících dohled nad laboratořemi. Dodržováním základních pravidel pro radiační bezpečnost zajistíte dostatečnou ochranu.

Složky lidské krve obsažené v této sadě prošly testováním podle schválených evropských a/nebo FDA schválených postupů a byly negativní na výskyt HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 a 2. Žádná známá metoda nezajistí úplnou jistotu, že deriváty lidské krve nemohou přenášet hepatitidu, AIDS nebo jiné druhy nákazy. Manipulace s reakčními činidly, séry nebo vzorky plazmy by tudíž měla probíhat v souladu s místními bezpečnostními postupy.

Veškeré živočišné produkty a deriváty byly odebrány od zdravých jedinců. Složky pocházející z hovězího skotu jsou ze zemí, v nichž nebyl hlášen výskyt BSE. Se složkami, které obsahují látky živočišného původu, by se však mělo zacházet jako s potenciálně infekčními.

Zabraňte jakémukoli kontaktu pokožky s reakčními činidly (azid sodný jako konzervační látka). Azid v této sadě může reagovat s olovem a mědí v potrubí, v této podobě může tvořit vysoce výbušné azidy kovu. Během promývání vypláchněte odpad velkým množstvím vody, aby nedošlo k hromadění azidu.

V pracovních oblastech nejezte, nepijte, nekuřte a nepracujte s kosmetickými přípravky. Roztoky nepipetujte ústy. Používejte ochranné oděvy a jednorázové rukavice.

Další informace jsou k dispozici v bezpečnostním listu (BL).

XVII. LITERATURA

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.

- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F.(2004)
Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers and cardiovascular disease.
Am. J. Clin. Nutr., 80:1678S-1688S.
- HEANEY R.P. (2010)
Defining deficiency of vitamin D .
Clinical Laboratory International , October 2010, vol.34 : 16-19.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.
- TAHA N. M. , VIETH R.(2010)
The problem of an optimal target level for 25-Hydroxyvitamin D, the test for vitamin D nutritional status .
Clinical Laboratory International , November 2010, vol.34 : 28-30

XVIII. SHRUTÍ PROTOKOLU

	CELKOVÉ POČTY μ l	KALIBRÁTORY μ l	KONTROLY VZORKU(Ů) μ l
INKUBACE (v potažených zkumavkách) Kalibrátory Vzorky / kontroly Inkubační pufr	- - -	25 - 500	- 25 500
Inkubace	2 hodiny při pokojové teplotě (18-25 °C) na třepačce (300 až 700 ot/min). ! Zkumavky neodsávejte		
Indikátor	100	100	100
Inkubace	1 hodina při pokojové teplotě (18-25 °C) na třepačce (300 až 700 ot/min)		
Separace Pracovní promývací roztok Separace Pracovní promývací roztok	- -	Odsávání 2 ml Odsávání 2 ml Odsávání	
Počty	Na dobu 60 sekund umístěte zkumavky do čítače		

Oddělení nástrojů DIASource potvrzuje, že tato sada je platná pro použití na platformě Stratec Riamat 300. Pokud potřebujete nějaké další informace, obraťte se prosím na IVDInstrumentation@diasource.be

Další překlady tohoto návodu k použití lze stáhnout z naší webové stránky: <https://www.diasource-diagnostics.com/>