

## 25-Hydroxyvitamin D <sup>125</sup>I RIA Kit

For the quantitative determination of 25-OH-D and other hydroxylated metabolites in serum or plasma

### **Instruction Manual**

Manuel d'Instructions

Testanleitung

Manual de Instrucciones

Manuale di Istruzioni

Manual de instruções

Bruksanvisning

Felhasználói Utasítás

Návod k použití

Brukermanual

Manual de instrucțiuni

Ръководство за работа

Εγχειρίδιο οδηγιών

**REF: 68100E**

**DiaSorin**

Stillwater, Minnesota 55082-0285, U.S.A.

## TABLE OF CONTENTS

|                |        |
|----------------|--------|
| English .....  | Page 1 |
| Français ..... | 12     |
| Deutsch .....  | 24     |
| Español .....  | 36     |
| Italiano.....  | 47     |
| Português..... | 58     |
| Svenska .....  | 69     |
| Magyar .....   | 80     |
| Česky .....    | 91     |
| Norsk.....     | 102    |
| Română.....    | 113    |
| Български..... | 124    |
| Ελληνικά.....  | 136    |

## 25-HYDROXYVITAMIN D <sup>125</sup>I RIA KIT

### 1. INTENDED USE

FOR *IN VITRO* DIAGNOSTIC USE.

This kit is intended for quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D (25-OH-D) and other hydroxylated vitamin D metabolites in human serum or plasma to be used in the assessment of vitamin D sufficiency. Assay results should be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in making individual patient management decisions in an adult population.

### 2. SUMMARY AND EXPLANATION

As calciferol (Vitamin D) enters the circulation, it is metabolized to several forms, the major of these being 25-hydroxycalciferol (25-OH-D). The first step in the metabolism of vitamin D, 25 hydroxylation, occurs mainly in the liver.<sup>1</sup> Only a small amount of 25-OH-D is metabolized in the kidney to other dihydroxyvitamin D metabolites in man.<sup>2,3</sup> Since 25-OH-D is the predominant circulating form of vitamin D in the normal population, it is considered to be the most reliable index of vitamin D status.<sup>4</sup>

The two principal forms of 25-OH-D are cholecalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) and ergocalciferol (vitamin D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> Vitamin D<sub>3</sub> is derived mainly from actions of ultraviolet light on the skin while D<sub>2</sub> is derived solely from dietary sources. Since these two parent compounds provide various contributions to the overall vitamin D status of the individual, it is important that both forms are measured equally.<sup>6,7</sup> A great deal of research has provided information about the circulating levels of 25-OH-D metabolism and their physiological significance.

The measurement of 25-OH-D is becoming increasingly important in the management of patients with various disorders of calcium metabolism associated with rickets, neonatal hypocalcemia, pregnancy, nutritional and renal osteodystrophy, hypoparathyroidism, and postmenopausal osteoporosis.<sup>6,8-10</sup> NOTE: The performance characteristics of the DiaSorin 25-OH-D assay have not been established in a pediatric population.

### 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin 25-OH-D assay consists of a two-step procedure. The first procedure involves a rapid extraction of 25-OH-D and other hydroxylated metabolites from serum or plasma with acetonitrile. Following extraction, the treated sample is then assayed using an equilibrium RIA procedure. The RIA method is based on an antibody with specificity to 25-OH-D. The sample, antibody and tracer are incubated for 90 minutes at 20-25°C. Phase separation is accomplished after a 20 minute incubation at 20-25°C with a second antibody precipitating complex. A NSB/Addition buffer is added after this incubation prior to centrifugation to aid in reducing non-specific binding.

### 4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

|                                   |                 |
|-----------------------------------|-----------------|
| 25-OH-D Calibrators               | 6 vials/1 mL    |
| 25-OH-D NSB/Addition Buffer       | 1 bottle/70 mL  |
| 25-OH-D Antiserum                 | 1 bottle/105 mL |
| 25-OH-D Tracer                    | 1 vial/6 mL     |
| 25-OH-D DAG Precipitating Complex | 2 vials/30 mL   |
| 25-OH-D Controls                  | 2 vials/1 mL    |
| 25-OH-D Acetonitrile              | 2 vials/15 mL   |
| Number of tests                   | 100             |

STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. After opening, store each reagent at 2-8°C until the expiration date on the label. Reagents should not be used past the expiration date. The expiration date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiration date of the tracer.

Reagents from different batches must not be mixed.

**4.1 25-OH-D NSB/Addition Buffer:** ready to use reagent

Phosphate-gelatin buffer containing 0.1% sodium azide. This component has a dual function. It will serve both as the NSB buffer and as the Addition buffer.

**4.2 25-OH-D<sub>3</sub> Calibrators:** ready to use reagent

Six (25-OH-D<sub>3</sub>) calibrators at concentrations ranging from 0-100 ng/mL are prediluted in processed human serum containing 0.1% sodium azide. Handle these reagents with care (see Warnings and Precautions). The kit calibrators are calibrated using UV quantitation and have been verified by HPLC analysis. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as recommended.

**NOTE:** If desired, an "Optional" calibrator (2.5ng/mL) can be created by diluting the kit calibrator "1" 1:2 in the kit zero calibrator (i.e. 100 uL "1" + 100 uL "0"). This dilution should be performed prior to extraction and then extracted as per product insert.

**4.3 25-OH-D Antiserum:** ready to use reagent.

Goat anti-25-OH-D serum is diluted in phosphate-gelatin buffer containing 0.1% sodium azide.

**4.4 25-OH-D<sub>3</sub> Tracer:** ready to use reagent.

An iodinated [<sup>125</sup>I] analog of 25-OH-D<sub>3</sub> is diluted in an ethanol-phosphate buffer. Handle this reagent with care (see Warnings and Precautions).

**4.5 Donkey Anti-Goat (DAG) Precipitating Complex:** ready to use reagent.

Donkey anti-goat serum, normal goat serum, and polyethylene glycol are diluted in a BSA-borate buffer containing gentamycin sulfate and 0.1% sodium azide. Mix for 5-10 minutes before and during use to ensure that a homogeneous suspension is achieved.

**4.6 25-OH-D Controls:** ready to use reagent.

Human serum containing 0.1% sodium azide is spiked with the appropriate amounts of 25-OH-D<sub>3</sub> to obtain control concentrations within specified ranges. Mix thoroughly and treat as an unknown samples. Control 1 represents a low-normal range and Control 2 represents a high-normal range. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs. Handle these reagents with care (see Warnings and Precautions).

**4.7 Acetonitrile:** ready to use reagent.

Acetonitrile. Qualified for use with this kit. Handle this reagent with care (see Warnings and Precautions). This product contains dry natural rubber.

## 5. WARNINGS AND PRECAUTIONS

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

Not for internal or external use in humans or animals.

**CAUTION:** This device is to be received, acquired, possessed, and used only by physicians, clinical laboratories, hospitals, veterinaries or research facilities. Testing is to be performed only by properly qualified and trained laboratory personnel.

### REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL

**Treat as potentially infectious.**

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by a U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus (HBV),

hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th., May 1999 or current edition.

#### **REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE**

**CAUTION:** Some reagents in this kit contain sodium azide. Sodium azide may react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up (Council Directive 1999/45/EC). For further information, refer to "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA., U.S. 1976.

#### **European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 1999/45/EC)**

R 20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R 32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

#### **REAGENTS CONTAINING ACETONITRILE**

#### **European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 88/379/EEC)**

R11 - Highly flammable.

R23/24/25 - Toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

S16 - Keep away from sources of ignition — No smoking.

S36 - Wear suitable protective clothing.

S43 - In case of fire, use dry chemical or carbon dioxide.

S45 - In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately.

S51 - Use only in well-ventilated areas.

#### **REAGENTS CONTAINING ETHANOL**

#### **WARNING - FLAMMABLE**

#### **European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 88/379/EEC)**

R11 - Highly flammable.

S16 - Keep away from sources of ignition — No smoking.

S43 - In case of fire, use dry chemical or carbon dioxide.

#### **REAGENTS CONTAINING IODINE-125**

This kit contains radioactive material which does not exceed 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

**WARNING:** This product contains a chemical known to the State of California to cause cancer.

**ATTENTION:** Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.

## 6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS

- 6.1 The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents. (The NSB buffer, antiserum and DAG precipitating reagents may be cloudy.)
- 6.2 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.
- 6.3 A decrease in maximum binding.
- 6.4 A high nonspecific binding.

## 7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Fifty (50) microliters of serum or plasma (EDTA or Heparin) is required for the 25-OH-D extraction; a volume of 150 microliters will permit repeat analysis and provide adequate pipetting volume as well.

Either human serum or plasma may be used in this kit. The anticoagulants EDTA or heparin may be used with this assay. A fasting specimen is recommended, but not required. Blood should be collected aseptically by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube. Allow the blood to clot at room temperature (15-25°C). Centrifuge for 15 minutes using approximately 760 x g\* to obtain hemolysis free sera. No additives or preservatives are required to maintain integrity of the sample. All plastics, glassware or other material coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination. Store serum or plasma samples at -20°C or lower. Specimens may be stored in glass or plastic vials, as long as the vials are tightly sealed to prevent desiccation of the sample.

A study performed by DiaSorin on a limited number of patient samples showed samples to be stable for up to 9 weeks when stored at -20°C. No significant change in values was observed following 3 freeze-thaw cycles of the samples. Repeated freeze-thaw cycles should be avoided. Transported specimens should generally arrive frozen.

## 8. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm.  
**NOTE:** Plastic tubes are not suitable for use with this kit.
- Temperature controlled centrifuge to accommodate 12 x 75 mm tubes.
- Gamma counter capable of counting 125-iodine.
- Vortex mixer.
- Pipetting devices
  - a. Micropipettors calibrated to deliver 25 µL and 50 µL (imprecision less than or equal to ± 1%).
  - b. Repeating dispensers using tips that are calibrated to deliver 50 µL, 500 µL and 1.0 mL (imprecision less than or equal to ± 1%).

**NOTE:** For extraction and assay procedures below, refer to "Equipment and Materials Required but not Supplied" for pipette specifications.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

## 9. EXTRACTION PROCEDURE

- 9.1 Set up labeled 12 x 75 mm disposable glass tubes for each calibrator, control and patient sample.
- 9.2 Add 500  $\mu$ L of acetonitrile to each tube.
- 9.3 Place pipet tip containing 50  $\mu$ L of calibrator, control or patient sample below the surface of the acetonitrile and SLOWLY add into the acetonitrile.
- 9.4 Vortex for 10 seconds.
- 9.5 Centrifuge using 1200 x g\* for 10 minutes at 20-25°C.
- 9.6 Pipette duplicate 25  $\mu$ L aliquots from the supernatant into separate appropriately labeled 12 x 75 mm tubes. **CAUTION:** Take care not to disturb pellet.
- 9.7 Assay supernatants according to the assay procedure.

## 10. ASSAY PROCEDURE

- 10.1 Allow all reagents and samples to equilibrate to room temperature. Do not allow reagents to reach temperatures above 25°C.
- 10.2 Set up labeled 12 x 75 mm disposable glass tubes in duplicate according to the Scheme of the Assay on the last page.
- 10.3 Add reagents as follows:
  - a. **Total count tubes**  
50  $\mu$ L of  $^{125}\text{I}$  25-OH-D  
1.0 mL of NSB/Addition buffer
  - b. **Nonspecific binding tubes (NSB)**  
25  $\mu$ L of 0 calibrator (extracted)  
50  $\mu$ L of  $^{125}\text{I}$  25-OH-D  
1.0 mL of NSB/Addition buffer
  - c. **Calibrators, controls, and unknown samples**  
25  $\mu$ L of calibrator, control, or unknown sample (extracted)  
50  $\mu$ L of  $^{125}\text{I}$  25-OH-D  
1.0 mL of 25-OH-D antiserum
- 10.4 Vortex gently without foaming and incubate for 90 (+/- 10) minutes at 20-25°C.
- 10.5 Add 500  $\mu$ L of DAG precipitating complex (DAG precipitating complex should be mixed thoroughly before and during use) to all tubes except the total count tubes.
- 10.6 Mix tubes well and incubate for 20-25 minutes at 20-25°C.
- 10.7 Add 500  $\mu$ L of NSB/Addition buffer to all tubes except the total count tubes. Vortex gently to mix tubes well. Use caution when performing this step to avoid splashing due to high liquid volume in tube.
- 10.8 Centrifuge all tubes for 20 minutes at 20-25°C at 1800 x g\*, except the total counts.
- 10.9 Decant the supernatants, except the total count tubes, using a foam rack tube holder or equivalent by inverting the rack into an appropriate waste container. Place the inverted rack onto absorbent paper for 2-3 minutes. Blot the tubes gently to ensure all liquid is removed.
- 10.10 In a gamma scintillation counter, count each tube for a minimum of 1 minute. Each tube should be counted for a sufficient time to achieve statistical accuracy. (See results section: Limitation of the Procedure.)

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

## 11. PROCEDURAL COMMENTS

- 11.1 Add each aliquot of reagent to the lower third of the assay tube to ensure complete mixture of reagents.
- 11.2 To completely monitor the consistent performance of an RIA assay there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a regular check of the following parameters to assure consistent kit performance.
- Total Counts**
  - Maximum Binding**  
Average counts per minute (CPM) of 0 Calibrator Tube/Average CPM of Total Count Tubes.
  - Nonspecific Binding**  
Average CPM of NSB Tube/Average CPM of Total Count Tubes.
  - Slope of Calibrator Curve**  
For example, monitor the 80 and 50% points of the calibrator line.

## 12. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include at least two controls (one at low-normal level and one at high-normal level) in every assay to monitor assay performance. Commercially available controls or the two reference controls provided with the kit may be utilized. The kit controls have been evaluated by DiaSorin using DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D <sup>125</sup>I RIA kit. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs.

The controls should be treated as unknown specimens and assayed in duplicate. Quality control charts should be maintained to follow control performance. Acceptable performance limits should be determined by each individual laboratory of each level of control using statistically based methods designed to detect both systematic and random errors. Control results must meet the laboratory's criteria for acceptability prior to reporting patient test results.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. CALCULATION OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating results of RIAs. Each is based on obtaining a calibration curve by plotting the extent of binding against stated concentrations of the calibration calibrators. This graph may be either a linear or logarithmic scale. Each of these methods gives essentially the same values for controls and samples, although certain assays may "fit" better into one particular method versus another. The calculation method for the DiaSorin Quality Control Laboratory is % B/B<sub>0</sub> versus log concentration.

- 13.1 Calculate the average CPM for each calibrator, control, and unknown sample.
- 13.2 Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts.
- 13.3 Divide the corrected CPM of each calibrator, control, or unknown sample by the corrected CPM of the 0 calibrator.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM of Calibrator or Unknown Sample} - \text{CPM of NSB}}{\text{CPM of 0 Calibrator} - \text{CPM of NSB}} \times 100$$

- 13.4 Using 2 cycle semi-log or log-logit graph paper, plot percent B/B<sub>0</sub> for 25-OH-D calibrators (vertical axis) versus the concentration (horizontal axis).
- 13.5 Draw a best-fit line through the points.
- 13.6 Interpolate the levels of 25-OH-D in the unknown samples from the plot.
- 13.7 If an unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.



- 13.8** Calculate maximum binding by dividing CPM of 0 calibrator by the average total counts obtained in the total count tubes.
- 13.9** Automated data reduction programs may also be utilized to analyze data. DiaSorin utilizes RIACalc (Pharmacia) with a %B/B<sub>0</sub> versus log concentration, smooth-SPLINE fit program. Other data reduction methods must be validated before incorporating for regular use.

**TABLE I**  
DiaSorin 25-OH-D Vitamin D RIA Sample Data

| Tube            | Duplicate CPM                    | Average CPM | Corrected CPM | Percent Bound (B/T) | Percent (B/B <sub>0</sub> ) | Graph Conc. (ng/mL) |
|-----------------|----------------------------------|-------------|---------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| Total Count     | 41878<br>39924                   | 40901       |               |                     |                             |                     |
| NSB             | 555<br>508                       | 531         |               | 1.3                 |                             |                     |
| 0 Calibrator    | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822       | 19291         | 48.5                |                             |                     |
| Calibrators     |                                  |             |               |                     |                             |                     |
| 1               | 14503<br>14442                   | 14472       | 13941         |                     | 72.3                        | 5                   |
| 2               | 11005<br>10670                   | 10838       | 10307         |                     | 53.4                        | 12                  |
| 3               | 7182<br>7642                     | 7411        | 6880          |                     | 35.7                        | 20                  |
| 4               | 4687<br>4622                     | 4654        | 4123          |                     | 21.4                        | 40                  |
| 5               | 2768<br>2985                     | 2877        | 2346          |                     | 12.2                        | 100                 |
| Unknown Samples |                                  |             |               |                     |                             |                     |
| 1               | 10365<br>10447                   | 10406       |               |                     | 53.9                        | 12.8                |
| 2               | 4219<br>4720                     | 4634        |               |                     | 24.0                        | 40.4                |

Typical sample data and a calibrator curve are shown in TABLE I and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

#### 25-HYDROXYVITAMIN D SAMPLE STANDARD CURVE

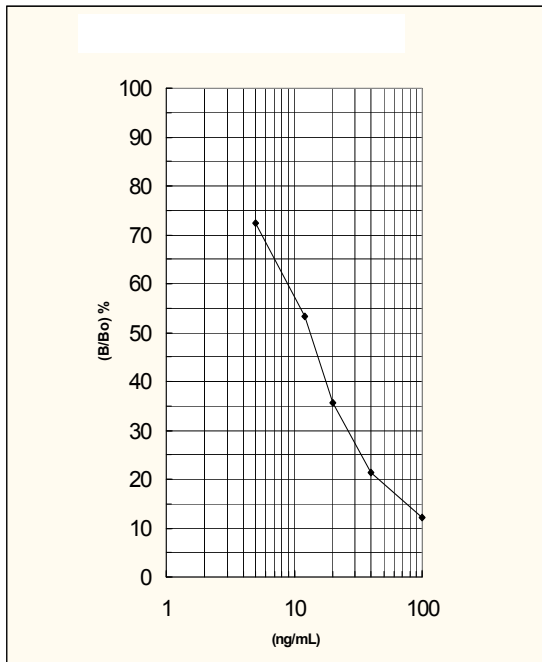


Figure 1

#### 14. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 14.1 Counting times should be sufficient to prevent statistical error (for example, accumulation of 2,000 CPM will yield 5% error; 10,000 CPM will yield 1% error).
- 14.2 Assay results should be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in making individualized patient management decisions.
- 14.3 Effects due to hemolysis or lipemia present in patient samples have not been evaluated for this assay; however, the acetonitrile extraction is expected to minimize any interference due to these substances.
- 14.4 The greatest source of imprecision in this method is likely to be the extraction step. Other sources of procedural imprecision may be imprecise micropipettors or out-dated reagents.
- 14.5 The kit antibody will demonstrate some cross-reactivity with all forms of dihydroxyvitamin D2 and D3 steroids; however, in humans, these compounds are naturally present only in picomolar concentrations.

**NOTE:** The performance characteristics of this assay have not been established in a pediatric population.

## 15. EXPECTED VALUES

### Reference Range

It is important for each laboratory to establish its own reference range representative of its typical population. Factors such as UV exposure<sup>9,10</sup> season,<sup>11,12</sup> race,<sup>7</sup> and dietary intake<sup>8</sup> are all known to affect levels of 25-OH-D in humans. A decrease in vitamin D levels with age has been demonstrated in the literature; however, the research conducted for most of these studies has been conducted in the Northern European countries, where there is less sunlight and less pervasive food fortification.<sup>8,15,16</sup> This, coupled with highly variable differences in health criteria and medication status, makes it difficult to generalize the effect of age alone on vitamin D status.<sup>12</sup> Results from studies conducted in the U.S. have yielded equivocal results, with some showing occurrence and others the absence of a decline in vitamin D status with age. Anticonvulsants have been shown to cause a decrease in 25-OH-D levels as have long term use of sunscreen contaminating p-aminobenzoic acid.<sup>17</sup> A pediatric reference range has not been established by DiaSorin using this kit.

DiaSorin evaluated serum collected from 20 male and 24 female, apparently healthy, predominately Caucasian volunteers from the midwestern U.S. using the DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D <sup>125</sup>I RIA kit. The age of the volunteers fell within the range of 23 - 67 years. Samples were collected during the month of October. Only a slight difference in 25-OH-D levels was seen between males (mean = 21.7 ng/mL) and females (mean = 24.1 ng/mL) in this reference group. The mean for the entire population (n = 44) was 23.0 ng/mL with a 2 S.D. range of 9.0 – 37.6 ng/mL.

A high prevalence of subclinical 25 OH Vitamin D deficiency among normal apparently healthy populations has been observed in many countries, particularly in winter months.<sup>13,14</sup> Recent literature has suggested the following ranges for the classification of 25 OH Vitamin D status: Deficiency: 0 to 5 ng/mL (0 - 12.5 nmol/L); Insufficiency: 5 to 20 ng/mL (12.5 - 50 nmol/L); Hypovitaminosis D: 20 to 40 ng/mL (50 - 100 nmol/L); Sufficiency: 40 to 100 ng/mL (100 - 250 nmol/L); and Toxicity: greater than 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 16.1 Precision

Assay precision was evaluated at DiaSorin by testing four control levels spanning the curve over 23 operating days in 40 assays. Each assay included the four controls x 2 extractions (4 replications). The study design was consistent with CLSI Document EP5-T2 guidelines.<sup>22</sup> Data calculations were made using SAS PROC VARCOMP. The statistical model fitted is a random effects linear model.<sup>23</sup>

| Mean (ng/mL) | Within-run (% C.V.) | Total Imprecision (% C.V.) |
|--------------|---------------------|----------------------------|
| 8.6          | 11.7                | 9.4                        |
| 22.7         | 10.5                | 8.2                        |
| 33.0         | 8.6                 | 9.1                        |
| 49.0         | 12.5                | 11.0                       |

### 16.2 Trueness

The assay trueness has been checked by the dilution and recovery test .

#### LINEARITY (PARALLELISM)

Serial Dilution Study of 4 Patient Samples (values = ng/mL)

| Sample | Undiluted | 1/2  | 1/4  |
|--------|-----------|------|------|
| 1      | 74.6      | 79.4 | 74.8 |
| 2      | 87.8      | 96.4 | 95.2 |
| 3      | 85.6      | 88.2 | 82.4 |
| 4      | 55.2      | 57.8 | 60.4 |

### Recovery

Known amounts of 25-OH-D<sub>3</sub> were added to patient serum samples and percent recovery was determined.

| Sample Number | Initial Conc. (ng/mL) | Amount spiked (ng/mL) | *Expected Conc. (ng/mL) | Measured Conc. (ng/mL) | Recovery |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|----------|
| 1             | 15.8                  | 5.0                   | 25.5                    | 24.8                   | 97%      |
|               |                       | 10.0                  | 35.1                    | 41.8                   | 119%     |
|               |                       | 25.0                  | 62.7                    | 61.9                   | 99%      |
| 2             | 51.2                  | 5.0                   | 60.6                    | 62.0                   | 102%     |
|               |                       | 10.0                  | 69.8                    | 73.8                   | 106%     |
|               |                       | 25.0                  | 96.4                    | 99.4                   | 103%     |
| 3             | 26.6                  | 5.0                   | 36.2                    | 33.5                   | 92%      |
|               |                       | 10.0                  | 45.7                    | 54.0                   | 118%     |
|               |                       | 25.0                  | 73.0                    | 82.8                   | 113%     |
| 4             | 57.3                  | 5.0                   | 66.6                    | 63.8                   | 96%      |
|               |                       | 10.0                  | 75.8                    | 78.1                   | 103%     |
|               |                       | 25.0                  | 102**                   | 104**                  | 102%     |
| 5             | 41.3                  | 5.0                   | 50.8                    | 48.5                   | 95%      |
|               |                       | 10.0                  | 60.1                    | 56.1                   | 93%      |
|               |                       | 25.0                  | 87.0                    | 93.2                   | 107%     |

\* Expected 25-OH-D concentration calculation includes dilution factor introduced by spiking solution.

\*\* These are extrapolated values, the measured concentration is > 100 ng/mL (top calibrator)

### 16.3 Analytical Sensitivity (Limits of Detection)

The sensitivity of this assay, when defined as the lowest quantity differentiated from zero at 2 standard deviations below the mean cpm's of the zero calibrator (n = 20), has been shown to be at or below 1.5 ng/mL. This sensitivity level applies both with the use of the calibrator "1" and the "Optional" calibrator.

### 16.4 Analytical Specificity

Data on the cross-reactivity of the antiserum used in this kit is expressed as the ratio of 25-OH-D concentration to the cross reacting substance concentration at 50% inhibition of maximum binding.

| Steroid        | % Cross-reactivity |
|----------------|--------------------|
| Vitamin D2     | 0.8                |
| Vitamin D3     | 0.8                |
| 25-OH-D2       | 100                |
| 25-OH-D3       | 100                |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11.0               |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11.0               |

**REFER TO LAST PAGE FOR REFERENCES**

## SCHEME OF THE ASSAY

1. Extract samples: Dispense 500 µL of acetonitrile into a glass tube and slowly add 50 µL of calibrator, control or patient sample below the surface of the acetonitrile. Vortex for 10 seconds and centrifuge using 1200 x g\* for 10 minutes at 20-25°C.
2. Dispense reagents according to the following scheme:

| Tubes/Reagents            | Total Counts | NSB    | Cal 0-6 | Controls and unknown samples |
|---------------------------|--------------|--------|---------|------------------------------|
| Extracted 0 Calibrators   | -            | 25 µL  | -       | -                            |
| Extracted Calibrators     | -            | -      | 25 µL   | -                            |
| Extracted Controls        | -            | -      | -       | 25 µL                        |
| Extracted Unknown Samples | -            | -      | -       | 25 µL                        |
| Tracer                    | 50 µL        | 50 µL  | 50 µL   | 50 µL                        |
| NSB/Addition Buffer       | 1.0 mL       | 1.0 mL | -       | -                            |
| 25-OH-D Antiserum         | -            | -      | 1.0 mL  | 1.0 mL                       |

3. Mix well; incubate for 90 minutes (+/- 10 minutes) at 20-25°C.
4. Dispense 500 uL of DAG precipitating complex into all wells, except the total count tubes.
5. Mix well; incubate for 20-25 minutes at 20-25°C.
6. Dispense 500 uL of NSB/Addition Buffer into all well, except the Total Count tubes.
7. Centrifuge using 1800 x g\* for 20 minutes.
8. Decant the supernatants.
9. Count each tube in a gamma counter for 60 seconds or longer.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

## TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE (RIA) <sup>125</sup>I DE LA 25-HYDROXYVITAMINE D

### 1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE *IN VITRO*.

Cette trousse permet la détermination quantitative de la 25-hydroxyvitamine D (25-OH-D) et d'autres métabolites hydroxylés de la vitamine D dans le sérum ou le plasma humain afin d'évaluer une éventuelle carence en vitamine D. Les résultats du dosage doivent être utilisés avec d'autres données cliniques et d'analyse pour aider le clinicien à prendre des décisions individuelles de traitement de l'adulte.

### 2. RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Lorsque l'ergocalciférol (vitamine D) pénètre dans la circulation, il est métabolisé sous plusieurs formes, la principale étant le 25-hydroxycalciférol (25-OH-D). La première étape du métabolisme de la vitamine D, 25, l'hydroxylation, se produit essentiellement dans le foie.<sup>1</sup> Chez l'homme, une petite quantité seulement de 25-OH-D est métabolisée dans les reins en d'autres métabolites de la dihydroxyvitamine D.<sup>2,3</sup> Comme la 25-OH-D est la forme prédominante de la vitamine D en circulation dans une population normale, on la considère comme l'indice le plus fiable de détermination de l'état de carence ou suffisance en vitamine D.<sup>4</sup>

Les deux principales formes de 25-OH-D sont le cholécalficérol (vitamine D<sub>3</sub>) et l'ergocalciférol (vitamine D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> La vitamine D<sub>3</sub> est essentiellement dérivée des actions de la lumière ultraviolette sur la peau alors que la D<sub>2</sub> est uniquement dérivée des aliments. Comme ces deux composés parents jouent des rôles divers dans l'état global de carence/suffisance en vitamine D de la personne, il est important que ces deux formes soient mesurées l'une comme l'autre.<sup>6,7</sup> Un grand nombre de recherches ont fourni des informations sur les niveaux en circulation du métabolisme de 25-OH-D et leur signification physiologique.

La mesure de 25-OH-D gagne en importance dans le traitement des patients atteints de troubles divers du métabolisme du calcium associés au rachitisme, à l'hypocalcémie néonatale, la grossesse, l'ostéodystrophie nutritionnelle et rénale, l'hypoparathyroïdie et l'ostéoporose post-ménopausique.<sup>6,8-10</sup> REMARQUE : Les caractéristiques de précision du dosage DiaSorin 25-OH-D n'ont pas été définies chez l'enfant.

### 3. PRINCIPE DU DOSAGE

Le dosage DiaSorin 25-OH-D est une procédure en deux temps. La première procédure est l'extraction rapide de 25-OH-D et d'autres métabolites hydroxylés du sérum ou du plasma avec de l'acétonitrile. Suite à l'extraction, l'échantillon traité est ensuite dosé par RIA d'équilibrage. La méthode RIA repose sur un anticorps spécifique de 25-OH-D. L'échantillon, l'anticorps et le traceur sont incubés pendant 90 minutes entre 20 et 25 °C. La séparation en phases s'accomplit au bout de 20 minutes d'incubation entre 20 et 25 °C produisant un second complexe d'anticorps précipitant. Un tampon NSB/addition est ajouté après cette incubation et avant la centrifugation qui permettra de réduire les liaisons non spécifiques.

### 4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

|                                  |                 |
|----------------------------------|-----------------|
| Étalons C25-OH-D                 | 6 tubes/1 mL    |
| Tampon NSB/addition 25-OH-D      | 1 flacon/70 mL  |
| Antisérums 25-OH-D               | 1 flacon/105 mL |
| Traceur 25-OH-D                  | 1 tube/6 mL     |
| Complexe précipitant DAG 25-OH-D | 2 tubes/30 mL   |
| Contrôles 25-OH-D                | 2 tubes/1 mL    |
| Acétonitrile 25-OH-D             | 2 tubes/15 mL   |
| Nombre de dosages                | 100             |

CONSERVATION : Dès réception, la trousse doit être stockée entre 2 et 8 °C. Après ouverture, conserver chaque réactif entre 2 et 8 °C jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette. Les réactifs ne doivent pas être utilisés au-delà de la date de péremption. La date de péremption de la trousse se trouve sur l'étiquette extérieure et correspond à celle du traceur.

Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

**4.1 Tampon NSB/addition 25-OH-D** : réactif prêt à l'emploi

Tampon de gélatine de phosphate contenant 0,1 % d'azide de sodium. Ce composant joue deux rôles. Il fait office de tampon NSB et de tampon d'addition.

**4.2 Étalons 25-OH-D<sub>3</sub>** : réactif prêt à l'emploi

Six étalons (25-OH-D<sub>3</sub>) à des concentrations comprises entre 0 et 100 ng/mL sont pré-dilués dans du sérum humain traité contenant 0,1 % d'azide de sodium. Traiter ces réactifs avec précaution (voir Avertissements et précautions). Les étalons de la trousse sont calibrés par quantification UV et ont été vérifiés par analyse CLHP. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons patient lorsqu'ils sont utilisés avec des réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique in vitro, comme recommandé.

**REMARQUE** : Au besoin, un étalon "facultatif" (2,5 ng/mL) peut être créé en diluant l'étalon de la trousse "1" à 1:2 dans l'étalon zéro de la trousse (à savoir 100 uL "1" + 100 uL "0"). Cette dilution doit être réalisée avant extraction, puis l'extraction doit se faire conformément à la notice d'utilisation du produit.

**4.3 Antisérums 25-OH-D** : réactif prêt à l'emploi.

Du sérum anti-25-OH-D de chèvre est dilué dans un tampon de gélatine de phosphate contenant 0,1 % d'azide de sodium.

**4.4 Traceur 25-OH-D<sub>3</sub>** : réactif prêt à l'emploi.

Analogue iodé [<sup>125</sup>I] de 25-OH-D<sub>3</sub> dilué dans un tampon d'éthanol-phosphate. Manipuler ce réactif avec précaution (voir Avertissements et précautions).

**4.5 Complexe précipitant anti-chèvre (DAG) de singe** : réactif prêt à l'emploi.

Sérum anti-chèvre de singe, sérum de chèvre normal et polyéthylène-glycol dilués dans un tampon d'albumine bovine-borate contenant du sulfate de gentamycine et 0,1 % d'azide de sodium. Mélanger pendant 5 à 10 minutes avant et durant usage pour garantir une suspension homogène.

**4.6 Contrôles 25-OH-D** : réactif prêt à l'emploi.

Sérum humain contenant 0,1 % d'azide de sodium dopé avec les quantités appropriées de 25-OH-D<sub>3</sub> pour obtenir des concentrations de contrôle comprises dans les intervalles spécifiés. Bien mélanger et traiter comme des échantillons inconnus. Le contrôle 1 représente un intervalle bas-normal et le contrôle 2 représente un intervalle haut-normal. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables. Manipuler ces réactifs avec précaution (voir Avertissements et précautions).

**4.7 Acétonitrile** : réactif prêt à l'emploi.

Acétonitrile. Qualifié d'utilisable avec cette trousse. Manipuler ce réactif avec précaution (voir Avertissements et précautions). Ce produit contient du caoutchouc naturel sec.

## 5. AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

Non prévu pour une utilisation interne ou externe sur l'homme ou l'animal.

**ATTENTION** : Ce dispositif doit être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche. Les analyses doivent être effectuées uniquement par un personnel de laboratoire correctement qualifié et formé.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAG, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons

infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquelles il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C (VHC), tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4<sup>ème</sup> éd., mai 1999 ou dernière édition.

#### **RÉACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM**

**ATTENTION** : Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide (Directive du conseil 1999/45/EC). Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA., U.S. 1976.

#### **Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 1999/45/EC)**

R 20/21/22 - Nocif en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

R 32 - Un contact avec les acides dégage des gaz très toxiques.

S28 - Après un contact avec la peau, laver immédiatement à grande eau.

#### **RÉACTIFS CONTENANT DE L'ACÉTONITRILE**

#### **Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 88/379/EEC)**

R11 - Hautement inflammable.

R23/24/25 - Toxique en cas d'inhalation, d'ingestion et de contact avec la peau.

S16 - Tenir à l'écart de sources d'inflammation — Interdiction de fumer.

S36 - Porter des vêtements de protection adaptés.

S43 - En cas d'incendie, utiliser une poudre extinctrice ou du gaz carbonique.

S45 - En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin.

S51 - Utiliser uniquement dans des lieux bien aérés.

#### **RÉACTIFS CONTENANT DE L'ÉTHANOL**

#### **AVERTISSEMENT - INFLAMMABLE**

#### **Déclaration des risques relatifs aux substances dangereuses des communautés européennes (Directive du conseil 88/379/EEC)**

R11 - Hautement inflammable.

S16 - Tenir à l'écart de sources d'inflammation — Interdiction de fumer.

S43 - En cas d'incendie, utiliser une poudre extinctrice ou du gaz carbonique.

#### **REACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125**

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques et des hôpitaux et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé dans un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.



5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radiologique. Tout article en verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles en verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

**AVERTISSEMENT** : Ce produit contient un produit chimique connu dans l'Etat de Californie comme étant cancérigène.

**ATTENTION** : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radioactivité théorique de la trousse.

## 6. INDICATIONS D'UNE DÉTÉRIORATION POSSIBLE DES RÉACTIFS DE LA TROUSSE

- 6.1 Présence de particules anormales dans l'un quelconque des réactifs. (Le tampon NSB, l'antisérum et les réactifs précipitants DAG peuvent être troubles.)
- 6.2 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.
- 6.3 Diminution de la liaison maximale.
- 6.4 Haute liaison non spécifique

## 7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Cinquante (50) microlitres de sérum ou de plasma (EDTA ou héparine) sont nécessaires pour l'extraction de 25-OH-D; un volume de 150 microlitres permettra les doublets d'analyse et un volume de pipetage adéquat également.

Du sérum ou du plasma humain peut être utilisé dans cette trousse. L'EDTA ou l'héparine peuvent être utilisés comme anticoagulant avec ce dosage. Un échantillon à jeun est recommandé, mais pas obligatoire. Le sang doit être prélevé de manière aseptique par ponction veineuse dans un tube de verre à vide de 5 ou 10 mL. Laisser le sang coaguler à température ambiante (15 à 25 °C). Centrifuger pendant 15 minutes à 760 x g\* environ pour obtenir du sérum sans hémolyse. Aucun additif ou conservateur n'est requis pour maintenir l'intégrité de l'échantillon. Tous les plastiques, articles de verre ou autres produits entrant en contact avec l'échantillon ne doivent absolument pas être contaminés. Conserver les échantillons de sérum ou de plasma à -20 °C maximum. Les échantillons peuvent être conservés dans des tubes en verre ou en plastique, à condition d'être hermétiquement fermés pour empêcher le dessèchement de l'échantillon.

Une étude réalisée par DiaSorin sur un nombre limité d'échantillons patient a montré leur stabilité pendant 9 semaines lorsqu'ils sont conservés à -20 °C maximum. Aucun changement significatif des valeurs n'a été observé après 3 cycles de congélation-décongélation des échantillons. Les cycles répétés de congélation-décongélation doivent être évités. Les échantillons transportés doivent généralement arriver congelés.

## 8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm.
- **REMARQUE** : Les tubes en plastique sont inadaptés à une utilisation avec cette trousse.
- Centrifugeuse à thermostat pour tubes 12 x 75 mm.

$$*g = (1\ 118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

- Compteur gamma capable de compter l'iode 125.
- Agitateur-mélangeur vortex.
- Pipettes
  - a. Micropipettes calibrées pour délivrer 25 µL et 50 µL (imprécision inférieure ou égale à ± 1 %).
  - b. Distributeurs à répétition utilisant des embouts calibrés pour délivrer 50 µL, 500 µL et 1 mL (imprécision inférieure ou égale à ± 1 %).

**REMARQUE** : Pour les procédures d'extraction et de dosage ci-dessous, se reporter aux spécifications des pipettes, à la section "Matériel et produits requis mais non fournis".

## 9. PROCÉDURE D'EXTRACTION

- 9.1 Installer des tubes en verre jetable de 12 x 75 mm pour chaque étalon, contrôle et échantillon patient.
- 9.2 Ajouter 500 µL d'acétonitrile dans chaque tube.
- 9.3 Placer l'embout des pipettes contenant 50 µL d'étalon, de contrôle ou d'échantillon patient sous la surface de l'acétonitrile et verser PROGRESSIVEMENT dans l'acétonitrile.
- 9.4 Mélanger dans l'agitateur vortex pendant 10 secondes.
- 9.5 Centrifuger à 1 200 x g\* pendant 10 minutes entre 20 et 25 °C.
- 9.6 Pipeter des doublets d'aliquotes de 25 µL du surnageant dans des tubes 12 x 75 mm distincts étiquetés en conséquence. **ATTENTION** : Prendre soin de ne pas troubler la boulette.
- 9.7 Doser les surnageants selon la procédure de dosage.

## 10. PROCÉDURE DE DOSAGE

- 10.1 Laisser tous les réactifs et les échantillons s'adapter à la température ambiante. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25 °C.
- 10.2 Installer des tubes en verre de 12 x 75 mm étiquetés en doublet selon le Profil de dosage de la dernière page.
- 10.3 Ajouter les réactifs comme suit :
  - a. **Tubes de numération totale**  
50 µL de 25-OH-D <sup>125I</sup>  
1 mL de tampon NSB/addition
  - b. **Tubes de liaison non spécifique (NSB)**  
25 µL d'étalon 0 (extrait)  
50 µL de 25-OH-D <sup>125I</sup>  
1 mL de tampon NSB/addition
  - c. **Étalons, contrôles et échantillons inconnus**  
25 µL d'étalon, contrôle ou échantillon inconnu (extrait)  
50 µL de 25-OH-D <sup>125I</sup>  
1 mL d'antisérum 25-OH-D
- 10.4 Mélanger doucement dans l'agitateur vortex sans former de mousse et incuber pendant 90 (+/- 10) minutes entre 20 et 25 °C.
- 10.5 Ajouter 500 µL de complexe précipitant DAG (mélanger intimement le complexe précipitant DAG avant et durant l'utilisation) dans tous les tubes, à l'exception des tubes de numération totale.
- 10.6 Bien mélanger le contenu des tubes et incuber pendant 20 à 25 minutes entre 20 et 25 °C.

$$*g = (1\ 118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

- 10.7 Ajouter 500 µl de tampon NSB/addition dans tous les tubes, à l'exception des tubes de numération totale. Mélanger doucement à l'agitateur vortex pour bien mélanger le contenu des tubes. Faire attention à cette étape afin d'éviter les projections en raison du grand volume de liquide dans le tube.
- 10.8 Centrifuger tous les tubes pendant 20 minutes entre 20 et 25 °C à 1 800 x g\*, à l'exception des tubes de numération totale.
- 10.9 Décantier les surnageants, à l'exception des tubes de numération totale, sur un râtelier en mousse ou équivalent en inversant le râtelier dans un récipient à déchets approprié. Placer le râtelier inversé sur du papier absorbant pendant 2 à 3 minutes. Sécher délicatement les tubes au buvard pour garantir l'absorption de l'ensemble du liquide.
- 10.10 Dans un compteur de scintillation gamma, procéder à la numération de chaque tube pendant 1 minute minimum. Chaque tube doit être compté pendant un temps suffisant pour permettre l'obtention d'une précision statistique. (Voir la section des résultats : Limitations de la procédure.)

## 11. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

- 11.1 Ajouter chaque aliquote de réactif au tiers inférieur du tube à essai pour garantir le mélange complet des réactifs.
- 11.2 Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, il faut parfois vérifier des facteurs supplémentaires. DiaSorin suggère un contrôle régulier des paramètres suivants pour garantir la précision constante de la trousse.
  - a. **Numérations totales**
  - b. **Liaison maximale**  
Numérations moyennes par minute (CPM) du tube de l'étalon 0/CPM moyenne des tubes de numération totale.
  - c. **Liaison non spécifique**  
CPM moyenne du tube NSB/CPM moyenne des tubes de numération totale.
  - d. **Pente de la courbe d'étalonnage**  
Par exemple, surveiller les points 80 et 50 % de la courbe d'étalonnage.

## 12. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux contrôles (l'un au niveau bas-normal et l'autre au niveau haut-normal) à chaque dosage pour surveiller la précision du dosage. Des contrôles disponibles dans le commerce ou les deux contrôles de référence fournis avec la trousse peuvent être utilisés. Les contrôles de la trousse ont été évalués par DiaSorin avec la trousse DiaSorin RIA 25-hydroxyvitamine D <sup>125</sup>I. L'intervalle des concentrations pour chaque contrôle est imprimé sur le certificat d'analyses et indique les limites définies par DiaSorin pour les valeurs des contrôles obtenues par des tests fiables.

Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus et dosés en doublets. Des tableaux de contrôle qualité doivent être tenus à jour pour suivre la précision des contrôles. Les limites acceptables de précision doivent être déterminées par chaque laboratoire pour chaque niveau de contrôle d'après des méthodes statistiques conçues pour dépister les erreurs systématiques et aléatoires. Les résultats de contrôle doivent être conformes aux critères d'acceptabilité du laboratoire avant d'être validés en tant que résultats.<sup>18, 19, 20</sup>

$$*g = (1\,118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

### 13. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en traçant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations indiquées pour les étalons. Ce graphe peut être à l'échelle linéaire ou logarithmique. Chacune de ces méthodes donne essentiellement les mêmes valeurs pour les contrôles et les échantillons, même si certains dosages peuvent être mieux "adaptés" à une méthode particulière que d'autres. La méthode de calcul pour le laboratoire de contrôle qualité DiaSorin est % B/B<sub>0</sub> par rapport à la concentration logarithmique.

**13.1** Calculer la CPM moyenne pour chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu.

**13.2** Soustraire la CPM moyenne des tubes NSB de toutes les numérations.

**13.3** Diviser la CPM corrigée de chaque étalon, contrôle ou échantillon inconnu par la CPM corrigée de l'étalon 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM de l'étalon ou de l'échantillon inconnu} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de l'étalon 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

**13.4** En utilisant du papier logarithmique ou semi-logarithmique à 2 cycles, tracer le pourcentage B/B<sub>0</sub> pour les étalons 25-OH-D (axe vertical) par rapport à la concentration (axe horizontal).

**13.5** Tracer la droite de meilleur ajustement d'un point à l'autre.

**13.6** Interpoler les niveaux de 25-OH-D dans les échantillons inconnus d'après le tracé.

**13.7** Si un échantillon inconnu a été dilué, corriger en fonction du facteur de dilution approprié.

**13.8** Calculer la liaison maximale en divisant la CPM de l'étalon 0 par les numérations totales moyennes obtenues dans les tubes de numération totale.

**13.9** Des programmes de réduction automatique des données peuvent également être utilisés pour l'analyse des données. DiaSorin utilise RIACalc (Pharmacia) avec programme d'ajustement de spline cubique %B/B<sub>0</sub> par rapport à concentration logarithmique. D'autres méthodes de réduction des données doivent être validées avant de les incorporer pour une utilisation régulière.

**TABLEAU I**  
Données d'échantillon RIA Vitamine D 25-OH-D DiaSorin

| Tube                  | CPM<br>doublets                  | CPM<br>moyenne | CPM<br>ajustée | Pourcentage<br>Liaison<br>(B/T) | Pourcentage<br>(B/B <sub>0</sub> ) | Conc.<br>graph.<br>(ng/ml) |
|-----------------------|----------------------------------|----------------|----------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Numération totale     | 41878<br>39924                   | 40901          |                |                                 |                                    |                            |
| NSB                   | 555<br>508                       | 531            |                | 1,3                             |                                    |                            |
| Étalon 0              | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822          | 19291          | 48,5                            |                                    |                            |
| Étalons               |                                  |                |                |                                 |                                    |                            |
| 1                     | 14503<br>14442                   | 14472          | 13941          |                                 | 72,3                               | 5                          |
| 2                     | 11005<br>10670                   | 10838          | 10307          |                                 | 53,4                               | 12                         |
| 3                     | 7182<br>7642                     | 7411           | 6880           |                                 | 35,7                               | 20                         |
| 4                     | 4687<br>4622                     | 4654           | 4123           |                                 | 21,4                               | 40                         |
| 5                     | 2768<br>2985                     | 2877           | 2346           |                                 | 12,2                               | 100                        |
| Échantillons inconnus |                                  |                |                |                                 |                                    |                            |
| 1                     | 10365<br>10447                   | 10406          |                |                                 | 53,9                               | 12,8                       |
| 2                     | 4219<br>4720                     | 4634           |                |                                 | 24                                 | 40,4                       |

Des données d'échantillons typiques et une courbe d'étalonnage sont présentées au TABLEAU I et à la FIGURE 1; ces informations sont fournies à titre de référence seulement et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur quelconque.

### COURBE D'ETALONNAGE DE LA 25 HYDROXYVITAMIN D

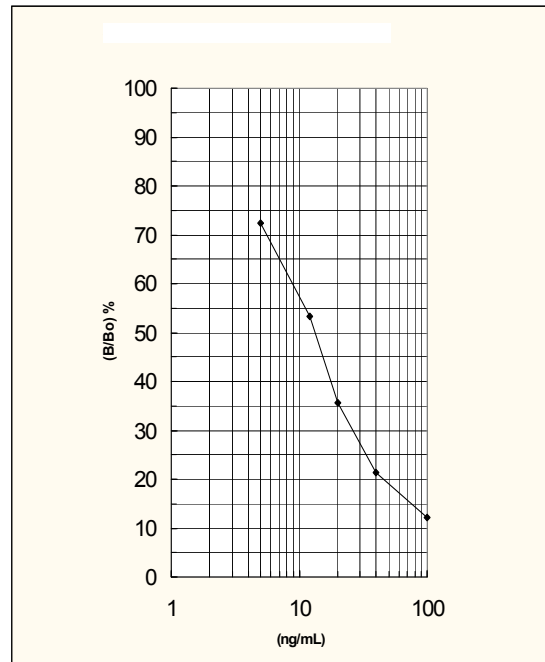


Figure 1

#### 14. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

- 14.1 Les temps de numération doivent être suffisants pour empêcher l'erreur statistique (par exemple, l'accumulation de 2 000 CPM donnera une erreur de 5 % ; 10 000 CPM donneront une erreur de 1 %).
- 14.2 Les résultats de dosage doivent être utilisés avec d'autres données cliniques et de laboratoire pour aider le clinicien à prendre des décisions de traitement individualisées selon le patient.
- 14.3 Les effets causés par une hémolyse ou une lipémie présente dans les échantillons patient n'ont pas été évalués pour ce dosage ; toutefois, on s'attend à ce que l'extraction d'acétonitrile minimise toute interférence causée par ces substances.
- 14.4 La plus grande source d'imprécision avec cette méthode est probablement l'étape d'extraction. D'autres sources d'imprécision peuvent être des micropipettes mal calibrées ou des réactifs périmés.
- 14.5 L'anticorps de la trousse montrera une certaine réactivité croisée avec toutes les formes de stéroïdes dihydroxyvitamine D2 et D3 ; toutefois, chez l'homme, ces produits sont naturellement présents uniquement à des concentrations picomolaires.

**REMARQUE :** Les caractéristiques de précision de ce dosage n'ont pas été établies chez l'enfant.

## 15. VALEURS ESCOMPTÉES

### Intervalle de référence

Il est important que chaque laboratoire établisse son propre intervalle de référence représentatif de sa population typique. Des facteurs tels qu'une exposition à la lumière UV<sup>9,10</sup> la saison,<sup>11,12</sup> la race,<sup>7</sup> et le régime alimentaire<sup>8</sup> influent tous sur les niveaux de 25-OH-D chez l'homme. Une diminution des niveaux de vitamine D avec l'âge a été indiquée dans les revues médicales; toutefois, les recherches menées pour la plupart de ces études portaient sur des Pays d'Europe septentrionale où la lumière du jour est moindre et l'enrichissement des produits alimentaires moins prononcé.<sup>8,15,16</sup> Ces facteurs, associés à des différences très variables des critères de santé et de l'état médicamenteux, rendent difficile une généralisation de l'effet de l'âge seul sur les niveaux de vitamine D.<sup>12</sup> Les résultats d'études réalisées aux États-Unis ont donné des résultats ambigus, certains montrant l'occurrence et d'autres l'absence de diminution du niveau de vitamine D avec l'âge. Les anticonvulsifs ont montré qu'ils causaient une diminution des niveaux de 25-OH-D, comme l'utilisation à long terme d'écran solaire contaminant l'acide 4-aminobenzoïque.<sup>17</sup> Aucun intervalle pédiatrique de référence n'a été établi par DiaSorin avec cette trousse.

DiaSorin a évalué du sérum prélevé sur 20 hommes et 24 femmes, apparemment en bonne santé, en grande partie des volontaires de race blanche issus du Midwest des États-Unis avec la trousse RIA DiaSorin 25-hydroxyvitamine D<sup>125i</sup>. L'âge des volontaires était de 23 à 67 ans. Les échantillons ont été prélevés durant le mois d'Octobre. Une légère différence seulement dans les niveaux de 25-OH-D a été observée chez les hommes (moyenne = 21,7 ng/mL) et chez les femmes (moyenne = 24,1 ng/mL) dans ce groupe de référence. La moyenne pour l'ensemble de la cohorte (n = 44) était de 23 ng/mL, avec un intervalle de 2 écarts-types de 9 à 37,6 ng/mL.

Une forte prévalence de carence sous-clinique en 25-hydroxyvitamine D parmi des cohortes normales apparemment en bonne santé a été observée dans bien des pays, en particulier durant l'hiver.<sup>13,14</sup> Les dernières publications suggèrent les intervalles suivants pour la classification des divers états concernant la 25-hydroxyvitamine D: carence: 0 à 5 ng/mL (0 à 12,5 nmol/L) ; insuffisance : 5 à 20 ng/mL (12,5 à 50 nmol/L) ; hypovitaminose D : 20 à 40 ng/mL (50 à 100 nmol/L) ; suffisance : 40 à 100 ng/mL (100 à 250 nmol/L); et toxicité : plus de 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. CARACTÉRISTIQUES SPÉCIFIQUES DE PERFORMANCE

### 16.1 Précision

La précision du dosage a été évaluée dans les laboratoires de DiaSorin en dosant quatre niveaux de contrôle couvrant la courbe sur une période de 23 jours dans le cadre de 40 dosages. Chaque dosage incluait les quatre contrôles x 2 extractions (4 réplicats). La conception de l'étude s'inscrivait dans le droit fil des directives EP5-T2 du document du CLSI.<sup>22</sup> Les calculs de données ont été effectués en utilisant SAS PROC VARCOMP. Le modèle statistique ajusté est un modèle linéaire à effets aléatoires.<sup>23</sup>

| Moyenne (ng/mL) | Intra-série (% C.V.) | Imprécision totale (% C.V.) |
|-----------------|----------------------|-----------------------------|
| 8,6             | 11,7                 | 9,4                         |
| 22,7            | 10,5                 | 8,2                         |
| 33,0            | 8,6                  | 9,1                         |
| 49,0            | 12,5                 | 11,0                        |

## 16.2 Pureté

La pureté du dosage a été vérifiée par le test de dilution et de récupération.

Linéarité (parallélisme)

Étude de dilution en série sur 4 échantillons patient (valeurs = ng/mL)

| Échantillon | Non dilué | 1/2  | 1/4  |
|-------------|-----------|------|------|
| 1           | 74,6      | 79,4 | 74,8 |
| 2           | 87,8      | 96,4 | 95,2 |
| 3           | 85,6      | 88,2 | 82,4 |
| 4           | 55,2      | 57,8 | 60,4 |

## Récupération

Des niveaux connus de 25-OH-D<sub>3</sub> ont été ajoutés dans des échantillons de sérum patient et le pourcentage de récupération a été déterminé.

| Échantillon<br>Nombre | Conc.<br>initiale<br>(ng/mL) | Niveau<br>ajouté<br>(ng/mL) | *Conc.<br>escomptée<br>(ng/mL) | Conc.<br>mesurée<br>(ng/mL) | Récupé-<br>ration |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------------------|
| 1                     | 15,8                         | 5,0                         | 25,5                           | 24,8                        | 97%               |
|                       |                              | 10,0                        | 35,1                           | 41,8                        | 119%              |
|                       |                              | 25,0                        | 62,7                           | 61,9                        | 99%               |
| 2                     | 51,2                         | 5,0                         | 60,6                           | 62,0                        | 102%              |
|                       |                              | 10,0                        | 69,8                           | 73,8                        | 106%              |
|                       |                              | 25,0                        | 96,4                           | 99,4                        | 103%              |
| 3                     | 26,6                         | 5,0                         | 36,2                           | 33,5                        | 92%               |
|                       |                              | 10,0                        | 45,7                           | 54,0                        | 118%              |
|                       |                              | 25,0                        | 73,0                           | 82,8                        | 113%              |
| 4                     | 57,3                         | 5,0                         | 66,6                           | 63,8                        | 96%               |
|                       |                              | 10,0                        | 75,8                           | 78,1                        | 103%              |
|                       |                              | 25,0                        | 102**                          | 104**                       | 102%              |
| 5                     | 41,3                         | 5,0                         | 50,8                           | 48,5                        | 95%               |
|                       |                              | 10,0                        | 60,1                           | 56,1                        | 93%               |
|                       |                              | 25,0                        | 87,0                           | 93,2                        | 107%              |

\* Le calcul de la concentration 25-OH-D escomptée inclut un facteur de dilution introduit en dopant la solution.

\*\* Il s'agit de valeurs extrapolées; la concentration mesurée est de > 100 ng/mL (étalon supérieur)

## 16.3 Sensibilité analytique (limites de détection)

La sensibilité de ce dosage, lorsqu'elle est définie comme la quantité la plus basse différente de zéro à 2 écarts-types en dessous de la cpm moyenne de l'étalon zéro (n = 20) s'est avérée inférieure ou égale à 1,5 ng/mL. Ce niveau de sensibilité porte à la fois sur l'utilisation de l'étalon "1" et de l'étalon "facultatif".



#### 16.4 Spécificité analytique

Les données de réactivité de l'antisérum utilisé dans cette trousse sont exprimées comme la concentration de 25-OH-D rapporté à la réaction croisée de concentration de substance avec inhibition de 50 % de la liaison maximale.

| Stéroïde       | % de réactivité croisée |
|----------------|-------------------------|
| Vitamine D2    | 0,8                     |
| Vitamine D3    | 0,8                     |
| 25-OH-D2       | 100                     |
| 25-OH-D3       | 100                     |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                     |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                     |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                     |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                     |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0                    |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0                    |

**VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR RÉFÉRENCE**

#### PROFIL DU DOSAGE

1. Échantillons extraits : distribuer 500 uL d'acétonitrile dans un tube de verre et ajouter lentement 50 µL d'étalon, contrôle ou échantillon patient en dessous de la surface de l'acétonitrile. Mélanger à l'agitateur vortex pendant 10 secondes et centrifuger à 1 200 x g\* pendant 10 minutes entre 20 et 25 °C.
2. Distribuer les réactifs conformément au profil :

| Tubes/réactifs                 | Numération totales | NSB    | Étalon 0-6 | Contrôles et échantillons inconnus |
|--------------------------------|--------------------|--------|------------|------------------------------------|
| Étalons 0 extraits             | -                  | 25 µL  | -          | -                                  |
| Étalons extraits               | -                  | -      | 25 µL      | -                                  |
| Contrôles extraits             | -                  | -      | -          | 25 µL                              |
| Échantillons inconnus extraits | -                  | -      | -          | 25 µL                              |
| Traceur                        | 50 µL              | 50 µL  | 50 µL      | 50 µL                              |
| Tampon NSB/addition            | 1 mL               | 1.0 mL | -          | -                                  |
| Antisérum 25-OH-D              | -                  | -      | 1 mL       | 1 mL                               |

3. Bien mélanger ; incuber pendant 90 minutes (+/- 10 minutes) à 20-25 °C.
4. Distribuer 500 uL de complexe précipitant DAG dans tous les puits, à l'exception des tubes de numération totale.
5. Bien mélanger ; incuber pendant 20 à 25 minutes entre 20 et 25 °C.
6. Distribuer 500 uL de tampon NSB/addition dans tous les puits, sauf les tubes de numération totale.
7. Centrifuger à 1 800 x g\* pendant 20 minutes.
8. Décanter les surnageants.
9. Compter chaque tube dans un compteur gamma pendant 60 secondes ou plus.

$$*g = (1\,118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

## 25-HYDROXYVITAMIN D <sup>125</sup>I RIA-KIT

### 1. VERWENDUNGSZWECK

#### NUR ZUR *IN-VITRO*-DIAGNOSTIK

Dieses Kit dient der quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin D (25-OH-D) und anderen hydroxylierten Vitamin-D-Metaboliten in menschlichem Serum oder Plasma zur Beurteilung der Vitamin-D-Versorgung. Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen und labordiagnostischen Daten verwendet werden, um den Arzt dabei zu unterstützen, bei der Population der Erwachsenen individuelle Patientenmanagement-Entscheidungen zu treffen.

### 2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Wenn Calciferol (Vitamin D) in den Kreislauf gelangt, wird es zu mehreren Formen metabolisiert, vor allem zu 25-Hydroxycholecalciferol (25-OH-D). Der erste Abschnitt des Vitamin-D-Stoffwechsels, die 25-Hydroxylierung, findet hauptsächlich in der Leber statt.<sup>1</sup> Nur eine kleine Menge 25-OH-D wird beim Menschen in der Niere zu anderen Dihydroxyvitamin-D-Metaboliten verstoffwechselt.<sup>2,3</sup> Da 25-OH-D die vorherrschende zirkulierende Form von Vitamin D in der normalen Population ist, gilt es als zuverlässigster Indikator für den Vitamin-D-Status.<sup>4</sup>

Die zwei Hauptformen von 25-OH-D sind Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) und Ergocalciferol (Vitamin D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> Vitamin D<sub>3</sub> entsteht hauptsächlich unter UV-Einwirkung in der Haut, während D<sub>2</sub> nur aus der Nahrung gewonnen werden kann. Da diese beiden verwandten Verbindungen den Vitamin-D-Status beeinflussen, müssen beide Formen gleichermaßen gemessen werden.<sup>6,7</sup> Die Forschung hat wichtige Informationen zu den zirkulierenden Konzentrationen des 25-OH-D-Metabolismus und ihre physiologische Bedeutung geliefert.

Die Messung von 25-OH-D wird immer wichtiger beim Management von Patienten mit diversen Erkrankungen des Calciumstoffwechsels, die mit Rachitis, neonataler Hypokalzämie, Schwangerschaft, ernährungsbedingter und renaler Osteodystrophie, Nebenschilddrüsenunterfunktion und postmenopausaler Osteoporose assoziiert werden.<sup>6,8-10</sup> HINWEIS: Die Leistungsmerkmale des DiaSorin 25-OH-D Tests konnten bei Kindern und Jugendlichen nicht nachgewiesen werden.

### 3. TESTPRINZIP

Der DiaSorin 25-OH-D Test wird in zwei Schritten durchgeführt. Der erste Schritt besteht in der schnellen Extraktion von 25-OH-D und anderen hydroxylierten Metaboliten aus Serum oder Plasma mit Acetonitril. Nach der Extraktion wird die vorbehandelte Probe in einem ausgeglichenen Radioimmunoassay untersucht. Der Radioimmunoassay basiert auf einem 25-OH-D-spezifischen Antikörper. Die Probe, der Antikörper und der Tracer werden 90 Minuten lang bei 20-25°C inkubiert. Die Phasentrennung erfolgt nach 20-minütiger Inkubation bei 20-25°C mit einem zweiten präzipitierenden Antikörperkomplex. Nach dieser Inkubation und vor der Zentrifugierung wird ein NSB-/ Zusatzpuffer zugegeben, um die nichtspezifische Bindung zu reduzieren.

### 4. KITREAGENZILIEN

|                                      |                    |
|--------------------------------------|--------------------|
| 25-OH-D Kalibratoren                 | 6 Fläschchen/1 mL  |
| 25-OH-D NSB-/Zusatzpuffer            | 1 Flasche/70 mL    |
| 25-OH-D Antiserum                    | 1 Flasche/105 mL   |
| 25-OH-D Tracer                       | 1 Fläschchen/6 mL  |
| 25-OH-D Präzipitierender DAG-Komplex | 2 Fläschchen/30 mL |
| 25-OH-D Kontrollen                   | 2 Fläschchen/1 mL  |
| 25-OH-D Acetonitril                  | 2 Fläschchen/15 mL |
| Anzahl der Tests                     | 100                |

**LAGERUNG:** Das Kit sollte bei 2-8°C aufbewahrt werden. Nach dem Öffnen jedes Reagenz bei 2-8°C nicht länger als bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum lagern. Die Reagenzien dürfen nach dem Verfallsdatum nicht verwendet werden. Das Verfallsdatum des Kits ist auf dem äußeren Etikett angebracht und entspricht dem Verfallsdatum des Tracers.

Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

**4.1 25-OH-D NSB-/Zusatzpuffer:** gebrauchsfertiges Reagenz

Phosphatgelatinepuffer mit 0,1% Natriumazid. Diese Komponente hat zwei Funktionen. Sie dient sowohl als NSB-Puffer als auch als Zusatzpuffer.

**4.2 25-OH-D<sub>3</sub> Kalibratoren:** gebrauchsfertiges Reagenz

Sechs (25-OH-D<sub>3</sub>) Kalibratoren werden in Konzentrationen zwischen 0-100 ng/mL in vorbehandeltem humanem Serum mit 0,1 % Natriumazid vorverdünnt. Gehen Sie mit diesen Reagenzien vorsichtig um (siehe Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen). Die Kalibratoren des Kits werden mittels UV-Bestimmung kalibriert und wurden per HPLC-Analyse überprüft. Die Kitkalibratoren sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische In-vitro-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

**HINWEIS:** Bei Bedarf kann ein "optionaler" Kalibrator (2,5 ng/mL) erzeugt werden, wenn der Kalibrator "1" des Kits im Verhältnis 1:2 im Nullkalibrator verdünnt wird (d. h. 100 µL "1" + 100 µL "0"). Diese Verdünnung sollte vor der Extraktion stattfinden. Anschließend gemäß Packungsbeilage extrahieren.

**4.3 25-OH-D Antiserum:** gebrauchsfertiges Reagenz

25-OH-D-Ziegenantiserum wird in einem Phosphatgelatinepuffer mit 0,1% Natriumazid verdünnt.

**4.4 25-OH-D<sub>3</sub> Tracer:** gebrauchsfertiges Reagenz

Ein iodiertes [<sup>125</sup>I] Analogon von 25-OH-D<sub>3</sub> wird in einem Ethanolphosphatpuffer verdünnt. Gehen Sie mit diesem Reagenz vorsichtig um (siehe Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen).

**4.5 Präzipitierender DAG (Esel-anti-Ziege)-Komplex:** gebrauchsfertiges Reagenz

Esel-anti-Ziege-Serum, normales Ziegenserum und Polyethylenglykol werden in einem BSA-Boratpuffer mit Gentamycinsulfat und 0,1 % Natriumazid verdünnt. 5-10 Minuten lang vor und während des Gebrauchs mischen, damit eine homogene Suspension entsteht.

**4.6 25-OH-D Kontrollen:** gebrauchsfertiges Reagenz

0,1 % Natriumazid enthaltendes Humanserum wird mit den entsprechenden Mengen 25-OH-D<sub>3</sub> versetzt, um Kontrollkonzentrationen innerhalb der angegebenen Bereiche zu erhalten. Gründlich mischen und als unbekannte Proben behandeln. Kontrolle 1 stellt einen niedrigen Normalbereich und Kontrolle 2 einen hohen Normalbereich dar. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysezertifikat aufgedruckt und zeigt die von DiaSorin festgestellten Grenzen für Kontrollwerte, die mit zuverlässigen Tests erhalten werden. Gehen Sie mit diesen Reagenzien vorsichtig um (siehe Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen).

**4.7 Acetonitril:** gebrauchsfertiges Reagenz

Acetonitril. Zum Gebrauch mit diesem Kit. Gehen Sie mit diesem Reagenz vorsichtig um (siehe Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen). Dieses Produkt enthält Naturkautschuk.

## 5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Nicht für die innere oder äußere Anwendung bei Menschen oder Tieren.

**VORSICHT:** Dieses Gerät darf nur von Ärzten, klinischen Laboren, Krankenhäusern, Tierärzten oder Forschungseinrichtungen empfangen, erworben, besessen und verwendet werden. Die Tests dürfen nur von entsprechend qualifizierten und geschulten Labormitarbeitern durchgeführt werden.

Jede, bei der Vorbereitung dieses Produktes verwendete Serum-/Plasmaspendeeinheit wurde nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Testmethoden äußerst genau sind, kann nicht gewährleistet werden, dass alle infizierten Einheiten erkannt werden. Dieses Produkt kann darüber hinaus weiteres Material menschlichen Ursprungs enthalten, für die es keinen zugelassenen Test gibt. Weil mit keiner Testmethode zweifelsfrei nachgewiesen werden kann, dass Hepatitis B-, Hepatitis C-, HIV-Viren oder andere infektiöse Agenzien vorliegen, sollten Produkte, die Material menschlichen Ursprungs enthalten, im Rahmen guter Laborpraktiken mit den geeigneten Vorsichtsmaßnahmen gehandhabt werden, wie sie im Handbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage) der US-amerikanischen Centers for Disease Control and Prevention und der National Institutes of Health beschrieben werden.

#### **NATRIUMAZID ENTHALTENDE REAGENZIEN**

**VORSICHT:** Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei- oder Kupferrohrleitungen reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung mit viel Wasser spülen, um eine Azidbildung zu vermeiden (Richtlinie 1999/45/EG). Weitere Informationen finden Sie in "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" im Manual Guide-Safety Management Nr. CDC-22, der von den Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, U.S. 1976, herausgegeben wurde.

#### **Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 1999/45/EG)**

R 20/21/22 - Gesundheitsschädlich durch Einatmen, bei Hautkontakt oder Verschlucken.

R 32 - Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S28 - Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

#### **ACETONITRIL ENTHALTENDE REAGENZIEN**

#### **Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 88/379/EWG)**

R11 - Leichtzündlich.

R23/24/25 - Giftig beim Einatmen, bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.

S16 - Von Zündquellen fernhalten — Nicht rauchen.

S36 - Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.

S43 - Zum Löschen Trockenlöschmittel oder Kohlendioxid verwenden.

S45 - Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen.

S51 - Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden.

#### **ETHANOL ENTHALTENDE REAGENZIEN**

#### **WARNUNG - ENTZÜNDLICH**

#### **Europäische Gemeinschaften: Gefahrenbezeichnungen für gefährliche Stoffe (Richtlinie 88/379/EWG)**

R11 - Leichtzündlich.

S16 - Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen.

S43 - Zum Löschen Trockenlöschmittel oder Kohlendioxid verwenden.

#### **REAGENZIEN MIT IOD-125**

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit nicht mehr als 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) Iod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, welche im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, klinischen Laboren oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission (US-amerikanische Strahlenschutzbehörde) bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung waschen. Alle benutzten Glasbehälter vor dem Waschen mit anderen Laborbehältern aus Glas gründlichst mit Wasser spülen.

Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

**WARNHINWEIS:** Dieses Produkt enthält eine Chemikalie, die nach Angaben des US-Bundesstaates Kalifornien krebserregend ist.

**ACHTUNG:** Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität darstellt.

## 6. ANZEICHEN FÜR EINEN MÖGLICHEN VERDERB DER REAGENZIEN

- 6.1 Das Vorhandensein abnormer Partikel in einem der Reagenzien (der NSB-Puffer, das Antiserum und die präzipitierenden DAG-Reagenzien sind möglicherweise trüb).
- 6.2 Eine Verschiebung der Steigung oder Position der Kalibratorkurve im Vergleich zu den normalen Ergebnissen.
- 6.3 Eine Abnahme der maximalen Bindung.
- 6.4 Eine hohe nichtspezifische Bindung.

## 7. PROBENGEWINNUNG UND -VORBEREITUNG

Für die Extraktion von 25-OH-D werden fünfzig (50) Mikroliter Serum oder Plasma (EDTA oder Heparin) benötigt; 150 Mikroliter ermöglichen Wiederholungsanalysen und stellen zudem ein adäquates Pipettiervolumen dar.

In diesem Kit kann humanes Serum oder Plasma verwendet werden. Bei diesem Test können die Antikoagulanzen EDTA oder Heparin verwendet werden. Eine Nüchternprobe wird empfohlen, sie ist jedoch nicht erforderlich. Zur Blutentnahme sollte unter aseptischen Bedingungen eine Vene punktiert werden und das Blut in ein 5- oder 10-mL-Glasröhrchen abgefüllt werden. Das Blut bei Raumtemperatur (15-25°C) gerinnen lassen. 15 Minuten lang mit ca. 760 x g\* zentrifugieren, um hämolysefreie Serumproben zu erhalten. Es sind keine Zusatzstoffe oder Konservierungsmittel erforderlich, um die Probenintegrität sicherzustellen. Alle Kunststoffteile, Glasgeräte oder anderen Materialien, die mit der Probe in Kontakt kommen, müssen vollständig frei von Kontamination sein. Serum- oder Plasmaproben bei -20°C oder darunter lagern. Die Proben können in Glas- oder Kunststofffläschchen gelagert werden, wenn die Fläschchen fest versiegelt sind, um eine Austrocknung der Probe zu vermeiden.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (U/\text{min})^2$$

Eine Studie, die von DiaSorin an einer begrenzten Anzahl von Patientenproben durchgeführt wurde, zeigte, dass die Proben bis zu 9 Wochen stabil sind, wenn sie bei -20°C aufbewahrt werden. Nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen der Proben haben sich die Werte nicht signifikant geändert. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden. Proben, die transportiert werden, müssen im Allgemeinen gefroren geliefert werden.

## 8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

- Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 x 75 mm.
- **HINWEIS:** Kunststoffröhrchen sind für dieses Kit nicht geeignet.
- Temperaturgesteuerte Zentrifuge für 12 x 75 mm Röhrchen
- Gamma-Zähler zur Zählung von Iod-125
- Vortex-Mixer
- Pipettiergeräte
- a. Auf die Abgabe von 25 µL und 50 µL kalibrierte Mikropipetten (Ungenauigkeit weniger oder gleich ± 1 %)
- b. Multipipetten mit Spitzen, die auf die Abgabe von 50 µL, 500 µL und 1,0 mL kalibriert sind (Ungenauigkeit weniger oder gleich ± 1 %)

**HINWEIS:** Angaben zu den Pipetten, die für das unten beschriebene Extraktions- und Testverfahren benötigt werden, entnehmen Sie bitte dem Abschnitt "Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien".

## 9. EXTRAKTIONSVERFAHREN

- 9.1 Für den Kalibrator, die Kontrolle und die Patientenprobe jeweils ein beschriftetes 12 x 75 mm Einweg-Glasröhrchen vorbereiten.
- 9.2 Zu jedem Röhrchen 500 µL Acetonitril geben.
- 9.3 Die 50 µl Kalibrator, Kontrolle bzw. Patientenprobe enthaltende Pipettenspitze unter die Oberfläche des Acetonitrils halten und LANGSAM zum Acetonitril zugeben.
- 9.4 10 Sekunden lang vortexen.
- 9.5 Mit 1200 x g\* 10 Minuten lang bei 20-25°C zentrifugieren.
- 9.6 Doppelte 25-µL-Aliquots des Überstands in getrennte, entsprechend beschriftete 12 x 75 mm Röhrchen pipettieren. **VORSICHT:** Das Pellet nicht stören.
- 9.7 Die Überstände gemäß Testverfahren untersuchen

## 10. TESTVERFAHREN

- 10.1 Alle Reagenzien und Proben auf Raumtemperatur bringen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25°C erwärmt werden.
- 10.2 Beschriftete 12 x 75 mm Einweg-Glasröhrchen gemäß Testschema auf der letzten Seite in doppelter Ausführung vorbereiten.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (U/\text{min})^2$$

- 10.3** Reagenzien wie folgt zugeben:
- a. Totalaktivität-Röhrchen**  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL NSB-/Zusatzpuffer
  - b. NSB-Röhrchen**  
25 µL Nullkalibrator (extrahiert)  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL NSB-/Zusatzpuffer
  - c. Kalibratoren, Kontrollen und unbekannte Proben**  
25 µL Kalibrator, Kontrolle oder unbekannte Probe (extrahiert)  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL 25-OH-D-Antiserum
- 10.4** Vorsichtig vortexen (Schaumbildung vermeiden) und 90 (+/- 10) Minuten lang bei 20-25°C inkubieren.
- 10.5** 500 µL präzipitierenden DAG-Komplex (der präzipitierende DAG-Komplex muss vor und während des Gebrauchs gründlich gemischt werden) zu allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen zugeben.
- 10.6** Die Röhrchen gut mischen und 20-25 Minuten lang bei 20-25°C inkubieren.
- 10.7** 500 µL NSB-/Zusatzpuffer zu allen Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen zugeben. Vorsichtig vortexen, um die Röhrchen gut zu mischen. Gehen Sie mit Vorsicht vor, um bei einem großen Flüssigkeitsvolumen im Röhrchen nichts zu verschütten.
- 10.8** Mit Ausnahme der Totalaktivität-Röhrchen alle Röhrchen 20 Minuten lang bei 20-25°C bei 1800 x g\* zentrifugieren.
- 10.9** Die Überstände außer bei den Totalaktivität-Röhrchen vorsichtig mit Hilfe eines Röhrchenhalters o.ä. dekantieren. Dazu das Rack über einem geeigneten Abfallbehälter umdrehen. Das umgedrehte Rack für 2-3 Minuten auf Saugpapier stellen. Die Röhrchen vorsichtig abtupfen, um zurückgebliebene Flüssigkeit zu entfernen.
- 10.10** Alle Röhrchen in einem Gammazillationszähler für mindestens 1 Minute messen. Jedes Röhrchen sollte ausreichend lange gemessen werden, um eine statistische Genauigkeit zu erzielen (Näheres zu den Ergebnissen finden Sie im Abschnitt "Grenzen des Verfahrens").
- 11. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN**
- 11.1** Jedes Aliquot des Reagenz in das untere Drittel des Teströhrchens hinzugeben, damit sich die Reagenzien vollständig vermischen.
- 11.2** Um die konsistente Leistung eines Radioimmunoassays vollständig zu überwachen, müssen möglicherweise weitere Faktoren überprüft werden. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter regelmäßig zu überprüfen, um sicherzustellen, dass die Leistung des Kits konsistent ist.
- a. Totalaktivität**
  - b. Maximale Bindung**  
Durchschnittliche Zählungen pro Minute (CPM) des Nullkalibrator-Röhrchens / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen
  - c. Nichtspezifische Bindung**  
Durchschnittliche CPM des NSB-Röhrchens / Durchschnittliche CPM der Totalaktivität-Röhrchen
  - d. Steigung der Kalibratorlinie**  
Überwachen Sie zum Beispiel die 80%- und 50%-Punkte der Kalibratorlinie.

$$*g = (1118 \times 10^8) (\text{Radius in cm}) (\text{U/min})^2$$

## 12. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte in jedem Assay mindestens zwei Kontrollen (eine bei einer niedrigen normalen Konzentration und eine bei einer hochnormalen Konzentration) einsetzen, um die Leistung des Assays zu überwachen. Es können handelsübliche Kontrollen oder die beiden Referenzkontrollen verwendet werden, die im Kit enthalten sind. Die Kitkontrollen sind von DiaSorin mit dem DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D <sup>125</sup>I RIA-Kit evaluiert worden. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysezertifikat aufgedruckt und zeigt die von DiaSorin festgestellten Grenzen für Kontrollwerte, die mit zuverlässigen Tests erhalten werden.

Die Kontrollen sollten als unbekannte Proben behandelt und doppelt untersucht werden. Um die Leistung der Kontrollen zu überwachen, sollten Qualitätskontrolltabellen geführt werden. Jedes Labor sollte mit Hilfe von statistischen Methoden, mit denen sowohl systematische als auch zufällige Fehler erkannt werden können, für jede Kontrollkonzentration akzeptable Leistungsgrenzen festlegen. Die Kontrollergebnisse müssen den Akzeptabilitätskriterien des Labors entsprechen, bevor die Testergebnisse des Patienten mitgeteilt werden können.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Kalibrationskurve angelegt, indem die prozentualen Bindungen gegen die angegebenen Konzentrationen der Kalibratoren aufgetragen werden. Die Kurve kann entweder eine lineare oder eine logarithmische Skala haben. Jede dieser Methoden führt im Wesentlichen zu denselben Werten für Kontrollen und Proben; bei einigen Assays ist die eine Methode jedoch möglicherweise besser geeignet als die andere. Die Umrechnungsmethode für das DiaSorin Qualitätskontrolllabor ist % B/B<sub>0</sub> gegen log Konzentration.

- 13.1 Berechnen Sie die durchschnittliche CPM für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede unbekannte Probe.
- 13.2 Die durchschnittliche CPM der NSB-Röhrchen von allen Zählungen abziehen.
- 13.3 Die korrigierte CPM jedes Kalibrators, Kontrolle oder unbekanntes Probe durch die korrigierte CPM des Nullkalibrators teilen.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM des Kalibrators oder der unbekanntes Probe} - \text{CPM der NSB}}{\text{CPM des Nullkalibrators} - \text{CPM der NSB}} \times 100$$

- 13.4 Auf halblogarithmischem oder doppeltlogarithmischem Millimeterpapier prozentuale Bindungen B/B<sub>0</sub> für 25-OH-D-Kalibratoren (vertikale Achse) gegen die Konzentration (horizontale Achse) auftragen.
- 13.5 Durch die Punkte eine Ausgleichsgerade legen.
- 13.6 Die Konzentrationen von 25-OH-D in den unbekanntes Proben aus der Auftragung interpolieren.
- 13.7 Wenn eine unbekanntes Probe verdünnt wurde, muss der Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.
- 13.8 Die maximale Bindung wird berechnet, indem die CPM des Nullkalibrators durch die in den Totalaktivität-Röhrchen erhaltenen Gesamtzählungen dividiert wird.
- 13.9 Für die Datenanalyse können auch automatische Datenreduktionsprogramme verwendet werden. DiaSorin verwendet das Smooth-SPLINE-Programm RIACalc (Pharmacia) mit %B/B<sub>0</sub> gegen den Logarithmus der Konzentration. Andere Datenreduktionsmethoden müssen validiert werden, bevor sie regelmäßig eingesetzt werden.



**TABELLE I**  
DiaSorin 25-OH-D Vitamin D RIA Probandaten

| Röhrchen          | Doppelte CPM                     | Durchschn. CPM | Korrigiert CPM | Prozent. Gebunden (B/T) | Prozent (B/B <sub>0</sub> ) | Kurve Konz. (ng/mL) |
|-------------------|----------------------------------|----------------|----------------|-------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Totalaktivität    | 41878<br>39924                   | 40901          |                |                         |                             |                     |
| NSB               | 555<br>508                       | 531            |                | 1,3                     |                             |                     |
| Nullkalibrator    | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822          | 19291          | 48,5                    |                             |                     |
| Kalibratoren      |                                  |                |                |                         |                             |                     |
| 1                 | 14503<br>14442                   | 14472          | 13941          |                         | 72,3                        | 5                   |
| 2                 | 11005<br>10670                   | 10838          | 10307          |                         | 53,4                        | 12                  |
| 3                 | 7182<br>7642                     | 7411           | 6880           |                         | 35,7                        | 20                  |
| 4                 | 4687<br>4622                     | 4654           | 4123           |                         | 21,4                        | 40                  |
| 5                 | 2768<br>2985                     | 2877           | 2346           |                         | 12,2                        | 100                 |
| Unbekannte Proben |                                  |                |                |                         |                             |                     |
| 1                 | 10365<br>10447                   | 10406          |                |                         | 53,9                        | 12,8                |
| 2                 | 4219<br>4720                     | 4634           |                |                         | 24,0                        | 40,4                |

TABELLE I und ABBILDUNG 1 zeigen typische Probandaten und eine Kalibratorkurve; diese Informationen dienen nur zu Referenzzwecken und sollten nicht zur Berechnung von Probenwerten verwendet werden.

## 25-HYDROXYVITAMIN D – BEISPIEL EINER STANDARDKURVE

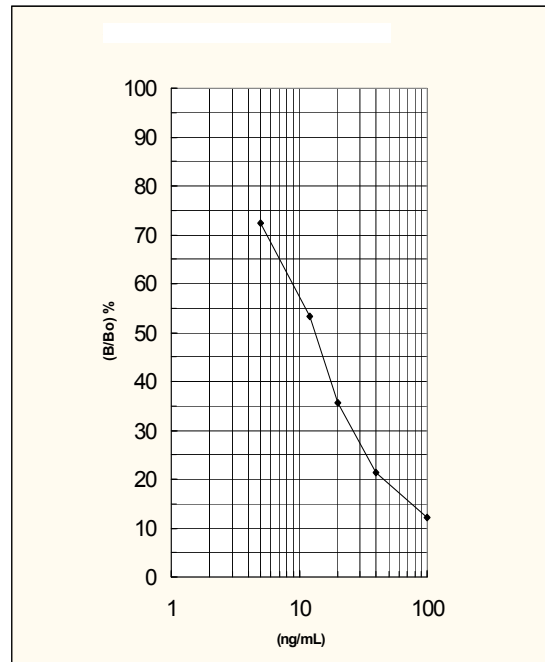


Abbildung 1

### 14. GRENZEN DES VERFAHRENS

- 14.1 Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um statistische Fehler zu vermeiden (2.000 CPM ergeben z. B. 5 % Fehler; 10.000 CPM ergeben 1 % Fehler).
- 14.2 Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen und labordiagnostischen Daten verwendet werden, um den Arzt dabei zu unterstützen, individuelle Patientenmanagement-Entscheidungen zu treffen.
- 14.3 Wirkungen, die auf Hämolyse oder Lipämie in Patientenproben zurückzuführen sind, wurden bei diesem Assay nicht ausgewertet; es wird jedoch davon ausgegangen, dass mit der Acetonitril-Extraktion die durch diese Substanzen verursachten Störungen minimiert werden.
- 14.4 Die Extraktion stellt wahrscheinlich die größte Quelle für Ungenauigkeiten bei dieser Methode dar. Andere Quellen für Verfahrensungenauigkeiten können ungenaue Mikropipetten oder veraltete Reagenzien sein.
- 14.5 Der Kitantikörper zeigt eine gewisse Kreuzreaktion mit allen Formen von Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>- und D<sub>3</sub>-Steroiden; beim Menschen liegen diese Verbindungen jedoch nur in pikomolaren Konzentrationen vor.

**HINWEIS:** Die Leistungsmerkmale dieses Assays konnten bei Kindern und Jugendlichen nicht nachgewiesen werden.

## 15. ERWARTETE WERTE

### Referenzbereich

Es ist wichtig, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich festlegt, der für seine typische Population repräsentativ ist. Es ist bekannt, dass Faktoren wie die UV-Exposition<sup>9,10</sup>, die Jahreszeit<sup>11,12</sup>, die Rasse<sup>7</sup> und die Ernährung<sup>8</sup> die Konzentrationen von 25-OH-D beim Menschen beeinflussen. In der Fachliteratur wurde gezeigt, dass die Vitamin-D-Konzentrationen im Alter abnehmen; für diese Studien wurde jedoch hauptsächlich in den nordeuropäischen Ländern Forschung betrieben, d. h. in Ländern mit weniger Sonnenlicht und geringerer Lebensmittelanreicherung.<sup>8,15,16</sup> Hinzu kommen noch große Unterschiede in Bezug auf Gesundheitskriterien und den Medikationsstatus. Daher ist es schwierig, den Einfluss des Alters allein auf den Vitamin-D-Status zu verallgemeinern.<sup>12</sup> In den USA durchgeführte Studien haben zu zweifelhaften Ergebnissen geführt: Bei einigen trat im Alter ein niedriger Vitamin-D-Status auf, bei anderen war der Vitamin-D-Status normal. Es konnte gezeigt werden, dass Antikonvulsiva eine Abnahme der 25-OH-D-Konzentrationen bewirken, wie es auch bei der Langzeitverwendung von Sonnencreme mit p-Aminobenzoesäure der Fall ist.<sup>17</sup> Für dieses Kit wurde von DiaSorin kein pädiatrischer Referenzbereich festgelegt.

Wertete DiaSorin Serum aus, das mit dem DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D<sup>125I</sup> RIA-Kit von 20 männlichen und 24 weiblichen scheinbar gesunden, vorwiegend weißen Freiwilligen aus dem mittleren Westen der USA gewonnen wurde. Die Freiwilligen waren zwischen 23 und 67 Jahre alt. Die Proben wurden im Oktober genommen. Zwischen den männlichen (Mittelwert = 21,7 ng/mL) und weiblichen (Mittelwert = 24,1 ng/mL) Probanden in dieser Referenzgruppe wurde nur ein kleiner Unterschied in Bezug auf die 25-OH-D-Konzentrationen festgestellt. Der Mittelwert für die Gesamtpopulation (n = 44) betrug bei einem 2 SD-Bereich von 9,0 – 37,6 ng/mL 23,0 ng/mL.

Eine hohe Prävalenz des subklinischen 25-OH-Vitamin-D-Mangels in der offensichtlich gesunden Normalbevölkerung wurde in vielen Ländern beobachtet, vor allem in den Wintermonaten.<sup>13,14</sup> In der neueren Fachliteratur werden für die Klassifikation des 25-OH-Vitamin-D-Status die folgenden Bereiche vorgeschlagen: Defizienz: 0 - 5 ng/mL (0 - 12,5 nmol/L); Insuffizienz: 5 - 20 ng/mL (12,5 - 50 nmol/L); Hypovitaminose D: 20 - 40 ng/mL (50 - 100 nmol/L); Suffizienz: 40 - 100 ng/mL (100 - 250 nmol/L); Toxizität: über 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. TESTCHARAKTERISTIKA

### 16.1 Präzision

Zur Ermittlung der Assay-Präzision wurden bei DiaSorin vier Kontrollkonzentrationen in 40 Assays an 23 Tagen getestet. Jeder Assay umfasste die vier Kontrollen x 2 Extraktionen (4 Wiederholungen). Das Studiendesign entsprach den CLSI EP5-T2-Richtlinien.<sup>22</sup> Die Daten wurden mit SAS PROC VARCOMP berechnet. Das statistische Modell ist ein lineares Modell mit Zufallseffekten.<sup>23</sup>

| Mittelwert<br>(ng/mL) | Intra-Assay-Präzision<br>(% VK) | Gesamtpräzision<br>(% VK) |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------------|
| 8,6                   | 11,7                            | 9,4                       |
| 22,7                  | 10,5                            | 8,2                       |
| 33,0                  | 8,6                             | 9,1                       |
| 49,0                  | 12,5                            | 11,0                      |

## 16.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit des Assays wurde mit Hilfe des Verdünnungs- und Wiederfindungstests überprüft.

Linearität (Parallelität)

Serienverdünnung von 4 Patientenproben (Werte= ng/ml)

| Probe | Unverdünnt | 1/2  | 1/4  |
|-------|------------|------|------|
| 1     | 74,6       | 79,4 | 74,8 |
| 2     | 87,8       | 96,4 | 95,2 |
| 3     | 85,6       | 88,2 | 82,4 |
| 4     | 55,2       | 57,8 | 60,4 |

## Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate wurde durch Zugabe von bekannten Mengen 25-OH-D<sub>3</sub> zu den Serumproben bestimmt.

| Probe Nr. | Urspr. Konz. (ng/mL) | Spike (ng/mL) | *Erwartete Konz. (ng/mL) | Gemessene Konz. (ng/mL) | Wiederfindung |
|-----------|----------------------|---------------|--------------------------|-------------------------|---------------|
| 1         | 15,8                 | 5,0           | 25,5                     | 24,8                    | 97%           |
|           |                      | 10,0          | 35,1                     | 41,8                    | 119%          |
|           |                      | 25,0          | 62,7                     | 61,9                    | 99%           |
| 2         | 51,2                 | 5,0           | 60,6                     | 62,0                    | 102%          |
|           |                      | 10,0          | 69,8                     | 73,8                    | 106%          |
|           |                      | 25,0          | 96,4                     | 99,4                    | 103%          |
| 3         | 26,6                 | 5,0           | 36,2                     | 33,5                    | 92%           |
|           |                      | 10,0          | 45,7                     | 54,0                    | 118%          |
|           |                      | 25,0          | 73,0                     | 82,8                    | 113%          |
| 4         | 57,3                 | 5,0           | 66,6                     | 63,8                    | 96%           |
|           |                      | 10,0          | 75,8                     | 78,1                    | 103%          |
|           |                      | 25,0          | 102**                    | 104**                   | 102%          |
| 5         | 41,3                 | 5,0           | 50,8                     | 48,5                    | 95%           |
|           |                      | 10,0          | 60,1                     | 56,1                    | 93%           |
|           |                      | 25,0          | 87,0                     | 93,2                    | 107%          |

\* Bei der Berechnung der erwarteten 25-OH-D-Konzentration wurde der von der Spike-Lösung eingebrachte Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

\*\* Hierbei handelt es sich um extrapolierte Werte, die gemessene Konzentration beträgt > 100 ng/mL (Kalibrator)

## 16.3 Analytische Sensitivität (Nachweisgrenzen)

Die Sensitivität dieses Assays, definiert als die niedrigste von Null abgeleitete Menge bei zweifacher Standardabweichung unter der mittleren CPM des Nullkalibrators (n = 20), ist gleich oder weniger 1,5 ng/mL. Die Sensitivität gilt sowohl bei Verwendung des Kalibrators "1" als auch bei Verwendung des "optionalen" Kalibrators.

### 16.4 Analytische Spezifität

Die Kreuzreaktivität des in diesem Kit verwendeten Antiserums wird ausgedrückt als das Verhältnis der 25-OH-D-Konzentration zur Konzentration der kreuzreaktiven Substanz bei 50% Inhibierung der maximalen Bindung.

| Steroid        | % Kreuzreaktivität |
|----------------|--------------------|
| Vitamin D2     | 0,8                |
| Vitamin D3     | 0,8                |
| 25-OH-D2       | 100                |
| 25-OH-D3       | 100                |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0               |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0               |

**LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE**

### KURZANLEITUNG

1. Proben extrahieren: 500 µL Acetonitril in ein Glasröhrchen dispensieren und langsam 50 µL Kalibrator, Kontrolle oder Patientenprobe unter die Acetonitril-Oberfläche zugeben. 10 Sekunden lang vortexen und mit 1200 x g\* 10 Minuten lang bei 20-25°C zentrifugieren.
2. Reagenzien wie folgt dispensieren:

| Röhrchen/Reagenzien           | Totalaktivität | NSB    | Kal 0-6 | Kontrollen und unbekannte Proben |
|-------------------------------|----------------|--------|---------|----------------------------------|
| Extrahierte 0 Kalibratoren    | -              | 25 µL  | -       | -                                |
| Extrahierte Kalibratoren      | -              | -      | 25 µL   | -                                |
| Extrahierte Kontrollen        | -              | -      | -       | 25 µL                            |
| Extrahierte unbekannte Proben | -              | -      | -       | 25 µL                            |
| Tracer                        | 50 µL          | 50 µL  | 50 µL   | 50 µL                            |
| NSB-/Zusatzpuffer             | 1,0 mL         | 1,0 mL | -       | -                                |
| NSB-/Zusatzpuffer             | -              | -      | 1,0 mL  | 1,0 mL                           |

3. Gut mischen; 90 (+/- 10) Minuten lang bei 20-25°C inkubieren.
4. 500 uL präzipitierenden DAG-Komplex in alle Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen dispensieren.
5. Gut mischen; 20-25 Minuten lang bei 20-25°C inkubieren.
6. 500 uL NSB-/Zusatzpuffer in alle Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen dispensieren.
7. Mit 1800 x g\* 20 Minuten lang zentrifugieren.
8. Die Überstände dekantieren.
9. Jedes Röhrchen mindestens 60 Sekunden lang in einem Gamma-Zähler zählen.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{Radius in cm}) (U/\text{min})^2$$

## EQUIPO <sup>125</sup>I RIA PARA 25-HIDROXIVITAMINA D

### 1. USO INDICADO

#### PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS *IN VITRO*

Este equipo tiene como finalidad la determinación cuantitativa de 25-hidroxitamina D (25-OH-D) y de otros metabolitos hidroxilados de vitamina D en suero o plasma humanos para evaluar la suficiencia de vitamina D. Los resultados del ensayo deben utilizarse junto con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar al médico a decidir qué tratamiento aplicar a cada paciente de una población adulta.

### 2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Cuando el calciferol (vitamina D) entra en el flujo sanguíneo, se metaboliza en varias formas, siendo la principal el 25-hidroxicalciferol (25-OH-D). El primer paso del metabolismo de la vitamina D, la 25 hidroxilación, tiene lugar principalmente en el hígado.<sup>1</sup> En el ser humano sólo una pequeña cantidad de 25-OH-D se metaboliza a otros metabolitos de dihidroxivitamina D en el riñón.<sup>2,3</sup> Dado que en la población normal la forma predominante de vitamina D en la circulación es 25-OH-D, se considera el índice más fiable de los niveles de vitamina D.<sup>4</sup>

Las dos formas principales de 25-OH-D son el colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) y el ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> La vitamina D<sub>3</sub> se obtiene principalmente de la acción de la luz ultravioleta en la piel, mientras que la vitamina D<sub>2</sub> se obtiene únicamente de los alimentos. Dado que estos dos precursores contribuyen al nivel general de vitamina D del individuo, es importante medir ambas formas por igual.<sup>6,7</sup> Numerosas investigaciones han aportado información sobre los niveles circulantes de metabolismo de 25-OH-D y su importancia fisiológica.

La medición de 25-OH-D está cobrando cada vez más interés para el tratamiento de pacientes con diversos trastornos del metabolismo del calcio asociados con raquitismo, hipocalcemia neonatal, embarazo, osteodistrofia renal y nutricional, hipoparatiroidismo y osteoporosis posmenopáusica.<sup>6,8-10</sup> NOTA: No se han establecido las características del resultado del ensayo DiaSorin 25-OH-D en poblaciones pediátricas.

### 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo DiaSorin 25-OH-D es un procedimiento de dos pasos. El primer paso consiste en extraer rápidamente 25-OH-D y otros metabolitos hidroxilados de suero o plasma con acetonitrilo. Tras la extracción, la muestra tratada se somete a un procedimiento RIA de equilibrio. El método RIA se basa en un anticuerpo con especificidad frente a la 25-OH-D. La muestra, el anticuerpo y el trazador se incuban durante 90 minutos a 20-25°C. La separación de fases se logra tras 20 minutos de incubación a 20-25°C con un segundo complejo de precipitación de anticuerpos. Después de la incubación y antes del centrifugado se añade un tampón NSB/adición para reducir las uniones no específicas.

### 4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

|                                       |                 |
|---------------------------------------|-----------------|
| Calibradores 25-OH-D                  | 6 viales/1 mL   |
| Tampón NSB/adición 25-OH-D            | 1 frasco/70 mL  |
| Antisuero 25-OH-D                     | 1 frasco/105 mL |
| Trazador 25-OH-D                      | 1 vial/6 mL     |
| Complejo de precipitación DAG 25-OH-D | 2 viales/30 mL  |
| Controles 25-OH-D                     | 2 viales/1 mL   |
| Acetonitrilo 25-OH-D                  | 2 viales/15 mL  |
| Número de pruebas                     | 100             |

ALMACENAMIENTO: Tras su recepción, el equipo debe almacenarse a 2-8°C. Una vez abiertos, almacene los reactivos a 2-8°C hasta la fecha de vencimiento que figura en la etiqueta. Los reactivos no deben utilizarse después de la fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento del equipo se indica en la etiqueta externa y se corresponde con la fecha de vencimiento del trazador.

No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

**4.1 Tampón NSB/adición 25-OH-D:** reactivo listo para su uso.

Tampón fosfato-gelatina con azida sódica al 0,1%. Este componente tiene una función doble: sirve como tampón NSB y como tampón de adición.

**4.2 Calibradores 25-OH-D<sub>3</sub>:** reactivo listo para su uso.

Seis calibradores (25-OH-D<sub>3</sub>) con concentraciones que oscilan entre 0 y 100 ng/mL prediluidos en suero humano procesado con azida sódica al 0,1%. Maneje estos reactivos con cuidado (consulte Advertencias y precauciones). Los calibradores del equipo están ajustados con cuantificación UV y se han verificado mediante análisis por CLAR. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico in vitro.

**NOTA:** Si se desea, se puede crear un calibrador "opcional" (2,5 ng/mL) diluyendo el calibrador "1" del equipo en el calibrador 0 del mismo en una proporción 1:2 (es decir, 100 uL "1" + 100 uL "0"). Esta dilución debe realizarse antes de la extracción y después extraerse según como los productos incluidos.

**4.3 Antisuero 25-OH-D:** reactivo listo para su uso.

Suero de cabra anti-25-OH-D diluido en tampón fosfato-gelatina con azida sódica al 0,1%.

**4.4 Trazador 25-OH-D<sub>3</sub>:** reactivo listo para su uso.

Análogo yodado [<sup>125</sup>I] de 25-OH-D<sub>3</sub> diluido en un tampón etanol fosfato. Maneje este reactivo con cuidado (consulte Advertencias y precauciones).

**4.5 Complejo de precipitación DAG (Donkey Anti-Goat):** reactivo listo para su uso.

Suero de burro anticabra, suero de cabra normal y polietilenglicol diluidos en un tampón borato-ASB con sulfato de gentamicina y azida sódica al 0,1%. Mezcle durante 5-10 minutos antes y durante su uso para asegurar la obtención de una suspensión homogénea.

**4.6 Controles 25-OH-D:** reactivo listo para su uso.

Suero humano con azida sódica al 0,1% con la cantidad adecuada de 25-OH-D<sub>3</sub> para obtener concentraciones de control dentro de los rangos especificados. Mezcle cuidadosamente y trate como muestras desconocidas. El control 1 representa un rango bajo-normal y el control 2 un rango alto-normal. El intervalo de las concentraciones para cada control está impreso en el certificado de análisis e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de los controles obtenidos con test fiables. Maneje estos reactivos con cuidado (consulte Advertencias y precauciones).

**4.7 Acetonitrilo:** reactivo listo para su uso.

Acetonitrilo. Adecuado para utilizarse con este equipo. Maneje este reactivo con cuidado (consulte Advertencias y precauciones). Este producto contiene caucho natural seco.

## 5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

### PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

No debe destinarse al uso interno o externo en seres humanos ni animales.

**PRECAUCIÓN:** Este producto sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, laboratorios clínicos, hospitales, veterinarios u organismos de investigación. Las pruebas debe realizarlas únicamente el personal de laboratorio debidamente competente y capacitado.

### REACTIVOS CON CONTENIDO DE MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

#### Deben tratarse como material potencialmente infeccioso.

Todas las unidades de donantes de suero/plasma se han probado en conformidad con métodos aprobados por la FDA estadounidense y han dado resultados negativos para la presencia de AgsHB, anticuerpos de VHC y anticuerpos de VIH 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no garantizan la detección de todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba conocido puede garantizar plenamente la ausencia de virus de la hepatitis B (VHB), la

hepatitis C (VHC), de inmunodeficiencia humana (VIH) ni otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan materiales de origen humano deben manejarse según las prácticas de laboratorio correctas y las precauciones necesarias descritas en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4ª ed., mayo 1999 o actual, para centros de control de enfermedades e institutos nacionales de salud y prevención.

#### **REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA**

**PRECAUCIÓN:** Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Antes de desechar el reactivo, enjuáguelo con abundante agua para impedir la acumulación de azidas (Directiva del Consejo 1999/45/EC). Para obtener más información, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" en Manual Guide-Safety Management N° CDC-22 publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EE.UU. 1976.

#### **Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 1999/45/EC)**

R 20/21/22 - Nocivo por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

R 32 - En contacto con ácidos libera gases altamente tóxicos.

S28 - En caso de contacto con la piel, lávese inmediatamente con abundante agua.

#### **REACTIVOS CON CONTENIDO DE ACETONITRILLO**

#### **Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 88/379/EEC)**

R11 - Altamente inflamable.

R23/24/25 - Tóxico por inhalación, por ingestión y en contacto con la piel.

S16 Manténgase alejado de fuentes de ignición. No fumar.

S36 - Utilícese ropa de protección adecuada.

S43 - En caso de incendio, utilícense productos químicos secos o dióxido de carbono.

S45 - En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico.

S51 - Úsese sólo en zonas bien ventiladas.

#### **REACTIVOS CON CONTENIDO DE ETANOL**

#### **ADVERTENCIA - INFLAMABLE**

#### **Advertencias establecidas en la Comunidad Europea sobre el riesgo de sustancias peligrosas (Directiva del Consejo 88/379/EEC)**

R11 - Altamente inflamable.

S16 - Manténgase alejado de fuentes de ignición. No fumar.

S43 - En caso de incendio, utilícense productos químicos secos o dióxido de carbono.

#### **REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO-125**

Este equipo contiene material radiactivo que no supera 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.



4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjuagarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorios.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

**ADVERTENCIA:** Este producto contiene una sustancia química conocida por el Estado de California como causante de cáncer.

**ATENCIÓN:** La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

## 6. INDICACIONES DE POSIBLE DETERIORO DE LOS REACTIVOS DEL EQUIPO

- 6.1 Presencia de partículas anómalas en alguno de los reactivos (el tampón NSB, el antisuero y los reactivos de precipitación DAG pueden estar turbios).
- 6.2 Desviación en la pendiente o posición de la curva del calibrador con respecto al resultado habitual.
- 6.3 Disminución de la unión máxima.
- 6.4 Alto nivel de uniones no específicas.

## 7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la extracción de 25-OH-D se requieren cincuenta (50) microlitros de suero o plasma (EDTA o heparina); un volumen de 150 microlitros permite repetir el análisis y también proporciona la dosificación adecuada.

Con este equipo puede utilizarse suero o plasma humanos. Con este ensayo pueden utilizarse anticoagulantes EDTA o heparina. Es recomendable tomar la muestra en ayunas, pero no es imprescindible. La sangre debe recolectarse asépticamente por punción venosa en un tubo de vidrio vacío de 5 ó 10 mL. Deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugue durante 15 minutos con aproximadamente  $760 \times g^*$  para obtener suero no hemolizado. Para mantener la integridad de la muestra no se requieren aditivos ni conservantes. Todos los materiales de plástico, vidrio u otros que entren en contacto con la muestra deben estar completamente limpios de contaminación. Almacene las muestras de suero o plasma a  $-20^{\circ}\text{C}$  o menos. Las muestras pueden almacenarse en viales de vidrio o plástico, siempre que estén herméticamente cerrados para prevenir la desecación del contenido.

Un estudio realizado en DiaSorin con un número limitado de muestras de pacientes demostró que, almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , las muestras son estables hasta 9 semanas. No se observaron cambios significativos en los valores después de 3 ciclos de congelación-descongelación de las muestras. No deben repetirse ciclos de congelación-descongelación. En general, las muestras transportadas deben llegar congeladas.

## 8. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm.  
**NOTA:** Los tubos de plástico no son adecuados para utilizarse con este equipo.
- Centrífuga controlada por temperatura con capacidad para 12 tubos de 75 mm.
- Contador gamma válido para yodo 125.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

- Mezclador vórtex.
- Utensilios de dosificación.
  - a. Micropipetas calibradas para suministrar 25 µL y 50 µL (imprecisión inferior o igual a ± 1%).
  - b. Dispensadores repetitivos con puntas calibradas para suministrar 50 µL, 500 µL y 1 mL (imprecisión inferior o igual a ± 1%).

**NOTA:** Si desea informarse sobre las especificaciones de pipetas para los procedimientos de extracción y ensayo que se indican a continuación, consulte "Equipos y materiales necesarios pero no suministrados".

## 9. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

- 9.1 Prepare y etiquete 12 tubos desechables de vidrio de 75 mm por cada calibrador, control y muestra de pacientes.
- 9.2 Añada 500 µL de acetonitrilo a cada tubo.
- 9.3 Introduzca la punta de la pipeta con 50 µL de calibrador, control o muestra de pacientes bajo la superficie del acetonitrilo y añada el contenido LENTAMENTE.
- 9.4 Agite en vórtex durante 10 segundos.
- 9.5 Centrifugue con 1200 x g\* durante 10 minutos a 20-25°C.
- 9.6 Con una pipeta, dosifique alícuotas duplicadas de 25 µL del sobrenadante en 12 tubos separados de 75 mm debidamente etiquetados.
 

**PRECAUCIÓN:** Tenga cuidado de no alterar el pellet.
- 9.7 Someta los sobrenadantes al procedimiento de ensayo.

## 10. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

- 10.1 Deje que todos los reactivos y muestras se equilibren a temperatura ambiente. No permita que los reactivos alcancen temperaturas superiores a los 25°C.
- 10.2 Prepare y etiquete por duplicado 12 tubos desechables de vidrio de 75 mm según el programa de ensayo de la última página.
- 10.3 Añada los reactivos de este modo:
  - a. **Tubos de cuentas totales**  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1 mL de tampón NSB/adición
  - b. **Tubos de unión no específica (NSB)**  
25 µL de calibrador 0 (extraído)  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1 mL de tampón NSB/adición
  - c. **Calibradores, controles y muestras desconocidas**  
25 µL de calibrador, control o muestra desconocida (extraído)  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1 mL de antisuero 25-OH-D
- 10.4 Agite suavemente en vórtex sin que se forme espuma e incube durante 90 (+/- 10) minutos a 20-25°C.
- 10.5 Añada 500 µL de complejo de precipitación DAG (el complejo de precipitación DAG debe mezclarse cuidadosamente antes y durante su uso) a todos los tubos salvo a los de cuentas totales.
- 10.6 Mezcle bien los tubos e incube durante 20-25 minutos a 20-25°C.
- 10.7 Añada 500 µL de tampón NSB/adición a todos los tubos salvo los de cuentas totales. Agite suavemente en vórtex para mezclar bien los tubos. Cuando realice este último paso, tenga cuidado para evitar salpicaduras si hay elevados volúmenes de líquido en los tubos.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

- 10.8 Centrifugue todos los tubos durante 20 minutos a 20-25°C y 1800 x g\* (salvo los tubos de cuentas totales).
- 10.9 Decante los sobrenadantes (salvo los tubos de cuentas totales) con un portatubos de espuma o equivalente volcando el portatubos en un depósito de residuos adecuado. Coloque el portatubos invertido sobre papel absorbente durante 2-3 minutos. Seque los tubos con cuidado con papel absorbente para asegurar la eliminación de todo el líquido.
- 10.10 Determine el número de cuentas de los tubos dejándolos en un contador de centelleo de rayos gamma durante al menos 1 minuto Cada tubo debe contarse durante suficiente tiempo para alcanzar la precisión estadística (consulte el apartado de resultados Limitaciones del procedimiento).

## 11. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- 11.1 Añada cada alícuota de reactivo al tercio inferior del tubo de ensayo para asegurar la mezcla completa de los reactivos.
- 11.2 Para asegurar completamente el resultado sólido del ensayo RIA, deben comprobarse varios factores adicionales. DiaSorin recomienda comprobar periódicamente los siguientes parámetros para asegurar el desempeño uniforme del equipo.
  - a. **Cuentas totales**
  - b. **Unión máxima**  
Promedio de cuentas por minuto (CPM) del tubo de calibrador 0/Promedio de CPM de tubos de cuentas totales
  - c. **Uniones no específicas**  
Promedio de CMP del tubo NSB/Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales
  - d. **Pendiente de la curva del calibrador**  
Por ejemplo, controle los puntos de 80 y 50% de la línea del calibrador.

## 12. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos dos controles (uno de nivel bajo-normal y otro de nivel alto-normal) en cada ensayo para supervisar sus resultados. Pueden utilizarse controles disponibles en el mercado o los dos controles de referencia que se suministran con el equipo. DiaSorin ha evaluado los controles del equipo con el equipo DiaSorin <sup>125I</sup> RIA para 25-hidroxivitamina D. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables.

Los controles deben tratarse como muestras desconocidas y someterse al ensayo por duplicado. Deben mantenerse gráficos de control de calidad para llevar un seguimiento del desempeño del control. El intervalo de las concentraciones para cada control está impreso en el certificado de análisis e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de los controles obtenidos con test fiables. Los resultados de control deben cumplir los criterios de aceptabilidad del laboratorio antes de informar los resultados de las pruebas con pacientes.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. CÁLCULO DE RESULTADOS

Hay numerosos métodos para calcular los resultados de los ensayos RIA. Todos tienen como finalidad obtener una curva de calibrado que relacione el alcance de la unión con diferentes concentraciones de los calibradores de calibrado. El gráfico puede tener una escala lineal o logarítmica. Cada uno de estos métodos indica básicamente los mismos valores para controles y muestras, aunque algunos ensayos pueden "ajustarse" mejor a un método determinado que a otro. El método de cálculo del Laboratorio de Control de Calidad de DiaSorin es B/B<sub>0</sub> % frente a concentración logarítmica.

- 13.1 Calcule el promedio de CMP de cada calibrador, control y muestra desconocida.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$

- 13.2** Reste el promedio de CPM de los tubos NSB de todas las cuentas.
- 13.3** Divida las CPM corregidas de cada calibrador, control o muestra desconocida por las CPM corregidas del calibrador 0.
- $$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM de calibrador o muestra desconocida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM de calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$
- 13.4** Con un papel gráfico semilog de 2 ciclos o log-logit, trace el B/B0 porcentual de los calibradores 25-OH-D (eje de ordenadas) frente a la concentración (eje de abscisas).
- 13.5** Una los puntos con una línea de ajuste óptimo.
- 13.6** Interpole los niveles de 25-OH-D en las muestras desconocidas del trazado.
- 13.7** Si alguna muestra desconocida está diluida, corríjala para obtener el factor de dilución adecuado.
- 13.8** Calcule la unión máxima dividiendo las CPM del calibrador 0 por el promedio de cuentas totales obtenido con los tubos de cuentas totales.
- 13.9** Para analizar los datos también pueden utilizarse programas automáticos de reducción de datos. DiaSorin utiliza RIACalc (Farmacia) con un programa de ajuste suavizado SPLINE de B/B0 % frente a concentración logarítmica. Todos los demás métodos de reducción de datos han de ser validados antes utilizarlos con regularidad.

**TABLA I**  
Ejemplos de datos de un ensayo DiaSorin RIA para vitamina D 25-OH-D

| Tubo                  | CPM duplicadas                   | Promedio CPM | CPM corregidas | Unión porcentual (B/T) | Porcentaje (B/B <sub>0</sub> ) | Conc. gráfica (ng/mL) |
|-----------------------|----------------------------------|--------------|----------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| Cuentas totales       | 41878<br>39924                   | 40901        |                |                        |                                |                       |
| NSB                   | 555<br>508                       | 531          |                | 1,3                    |                                |                       |
| Calibrador 0          | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822        | 19291          | 48,5                   |                                |                       |
| Calibradores          |                                  |              |                |                        |                                |                       |
| 1                     | 14503<br>14442                   | 14472        | 13941          |                        | 72,3                           | 5                     |
| 2                     | 11005<br>10670                   | 10838        | 10307          |                        | 53,4                           | 12                    |
| 3                     | 7182<br>7642                     | 7411         | 6880           |                        | 35,7                           | 20                    |
| 4                     | 4687<br>4622                     | 4654         | 4123           |                        | 21,4                           | 40                    |
| 5                     | 2768<br>2985                     | 2877         | 2346           |                        | 12,2                           | 100                   |
| Muestras desconocidas |                                  |              |                |                        |                                |                       |
| 1                     | 10365<br>10447                   | 10406        |                |                        | 53,9                           | 12,8                  |
| 2                     | 4219<br>4720                     | 4634         |                |                        | 24                             | 40,4                  |

La tabla I y la figura 1 muestran ejemplos de datos típicos de muestras y de una curva de calibración; esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular ningún valor.

**25-HYDROXYVITAMINA D  
CURVA DE CALIBRADOR DE LA MUESTRA**

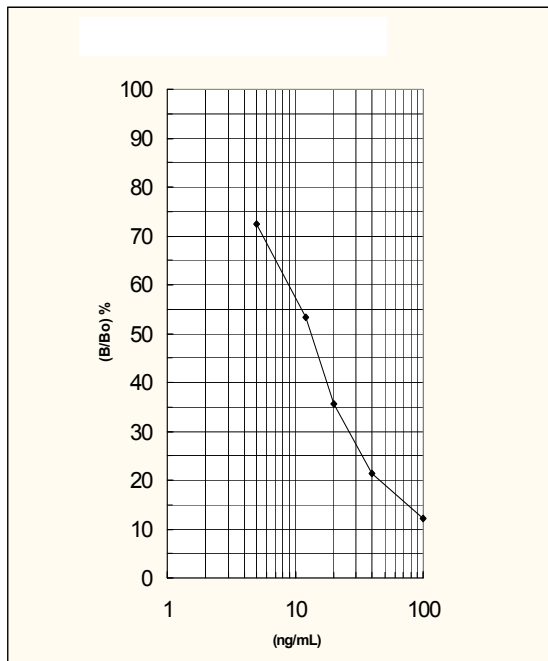


Figura 1

**14. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

- 14.1 La frecuencia de las cuentas debería bastar para evitar errores estadísticos (por ejemplo, la acumulación de 2000 CPM dará como resultado un error del 5%; 10.000 CPM dará como resultado un 1% de error).
- 14.2 Los resultados del ensayo deben utilizarse en combinación con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar al médico a decidir el tratamiento adecuado para cada paciente.
- 14.3 En este ensayo no se han evaluado los efectos debidos a hemólisis o lipemia presentes en muestras de pacientes; sin embargo, la extracción del acetonitrilo debería minimizar cualquier interferencia debida a estas sustancias.
- 14.4 La mayor fuente de imprecisión en este método es probablemente la fase de extracción. Otro origen de imprecisiones del procedimiento podría ser el uso de micropipetas imprecisas o reactivos vencidos.
- 14.5 El anticuerpo del equipo muestra cierta reactividad cruzada con todas las formas de esteroides de dihidroxivitamina D2 y D3; sin embargo, en seres humanos estos compuestos están naturalmente presentes sólo en concentraciones picomolares.

**NOTA:** No se han establecido las características del desempeño de este ensayo en poblaciones pediátricas.

## 15. VALORES PREVISTOS

### RANGOS DE REFERENCIA

Es importante que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia con respecto a la población a la que atiende. Es sabido que factores como el periodo de exposición a los rayos UV<sup>9,10,11,12</sup> la raza<sup>7</sup> y la ingesta en la dieta<sup>8</sup> afectan a los niveles de 25-OH-D en seres humanos. La bibliografía ha demostrado que los niveles de vitamina D disminuyen con la edad; no obstante, en la mayoría de estos estudios las investigaciones se han realizado en países del norte de Europa, donde hay menos luz solar y menos alimentos reforzados.<sup>8,15,16</sup> Este factor, junto con las diferencias altamente variables de criterios sanitarios y condiciones médicas, dificultan la generalización del efecto de la edad como único determinante de los niveles de vitamina D.<sup>12</sup> Los resultados de estudios llevados a cabo en EE.UU. arrojan resultados equívocos, ya que algunos muestran la incidencia y otros la ausencia de una disminución de vitamina D con la edad. Los anticonvulsivantes han demostrado causar una disminución de los niveles de 25-OH-D, debido al uso a largo plazo de ácido p-aminobenzoico antisolar contaminante.<sup>17</sup> DiaSorin no ha establecido un rango de referencia pediátrico con este equipo.

DiaSorin evaluó suero tomado de 20 hombres y 24 mujeres, aparentemente sanos, voluntarios, predominantemente caucásicos, de la zona media occidental de EE.UU., con el equipo DiaSorin<sup>125I</sup> RIA para 25-hidroxivitamina D. La edad de los voluntarios oscilaba entre 23 y 67 años. Las muestras se recolectaron durante el mes de octubre. En este grupo de referencia sólo se apreció una ligera diferencia de 25-OH-D entre hombres (media = 21,7 ng/mL) y mujeres (media = 24,1 ng/mL). La media de la población completa (n = 44) fue de 23,0 ng/mL con un rango de 2 desviaciones estándar de 9 – 37,6 ng/mL.

En muchos países se ha observado una alta prevalencia de deficiencia subclínica de 25 OH vitamina D en poblaciones normales aparentemente sanas, especialmente durante los meses de invierno.<sup>13,14</sup> Los estudios recientes indican los siguientes rangos para la clasificación del estado de la 25 OH vitamina D: deficiencia: 0 a 5 ng/mL (0 – 12,5 nmol/L); insuficiencia: 5 a 20 ng/mL (12,5 - 50 nmol/L); hipovitaminosis D: 20 a 40 ng/mL (50 - 100 nmol/L); suficiencia: 40 a 100 ng/mL (100 - 250 nmol/L); y toxicidad: mayor que 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DEL DESEMPEÑO

### 16.1 Precisión

DiaSorin evaluó la precisión del ensayo con cuatro niveles de control cuya curva se extendió a lo largo de 23 días de trabajo en 40 ensayos. Cada ensayo incluía los cuatro controles x 2 extracciones (4 réplicas). El diseño del estudio era coherente con las directrices del documento EP5-T2 de CLSI.<sup>22</sup> Los datos se calcularon con el SAS PROC VARCOMP. El modelo estadístico ajustado es un modelo lineal de efectos aleatorios.<sup>23</sup>

| Media (ng/mL) | Intraensayo (% C.V.) | Imprecisión total (% C.V.) |
|---------------|----------------------|----------------------------|
| 8,6           | 11,7                 | 9,4                        |
| 22,7          | 10,5                 | 8,2                        |
| 33,0          | 8,6                  | 9,1                        |
| 49,0          | 12,5                 | 11,0                       |

### 16.2 Veracidad

La veracidad del ensayo se comprobó con la prueba de dilución y recuperación.

Linealidad (paralelismo)

Estudio de dilución en serie de 4 muestras de pacientes (valores = ng/mL)

| Muestra | No diluida | 1/2  | 1/4  |
|---------|------------|------|------|
| 1       | 74,6       | 79,4 | 74,8 |
| 2       | 87,8       | 96,4 | 95,2 |
| 3       | 85,6       | 88,2 | 82,4 |
| 4       | 55,2       | 57,8 | 60,4 |

### Recuperación

Se añadieron cantidades conocidas de 25-OH-D<sub>3</sub> a las muestras de suero de pacientes y se determinó el porcentaje de recuperación.

| Número de muestra | Conc. inicial (ng/mL) | Cantidad añadida (ng/mL) | *Conc. prevista (ng/mL) | Conc. medida (ng/mL) | Recuperación |
|-------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------|--------------|
| 1                 | 15,8                  | 5,0                      | 25,5                    | 24,8                 | 97%          |
|                   |                       | 10,0                     | 35,1                    | 41,8                 | 119%         |
|                   |                       | 25,0                     | 62,7                    | 61,9                 | 99%          |
| 2                 | 51,2                  | 5,0                      | 60,6                    | 62,0                 | 102%         |
|                   |                       | 10,0                     | 69,8                    | 73,8                 | 106%         |
|                   |                       | 25,0                     | 96,4                    | 99,4                 | 103%         |
| 3                 | 26,6                  | 5,0                      | 36,2                    | 33,5                 | 92%          |
|                   |                       | 10,0                     | 45,7                    | 54,0                 | 118%         |
|                   |                       | 25,0                     | 73,0                    | 82,8                 | 113%         |
| 4                 | 57,3                  | 5,0                      | 66,6                    | 63,8                 | 96%          |
|                   |                       | 10,0                     | 75,8                    | 78,1                 | 103%         |
|                   |                       | 25,0                     | 102**                   | 104**                | 102%         |
| 5                 | 41,3                  | 5,0                      | 50,8                    | 48,5                 | 95%          |
|                   |                       | 10,0                     | 60,1                    | 56,1                 | 93%          |
|                   |                       | 25,0                     | 87,0                    | 93,2                 | 107%         |

\* El cálculo de la concentración prevista de 25-OH-D incluye el factor de dilución introducido por la solución añadida.

\*\* Se trata de valores extrapolados; la concentración medida es de > 100 ng/mL (calibrador superior).

### 16.3 Sensibilidad Analítica (límites de detección)

La sensibilidad de este ensayo, definida como la cantidad más baja diferenciada de cero con 2 desviaciones estándar por debajo del promedio de CPM del calibrador 0 (n = 20), ha demostrado ser igual o inferior a 1,5 ng/mL. Este nivel de sensibilidad es válido con el calibrador "1" y con el calibrador "optativo".

#### 16.4 Especificidad Analítica

Los datos sobre reactividad cruzada del antisuero utilizado en este equipo se expresan como la relación entre la concentración de 25-OH-D y la concentración de la sustancia que presenta reactividad cruzada con una inhibición del 50% de unión máxima.

| Esteroides     | % reactividad cruzada |
|----------------|-----------------------|
| Vitamina D2    | 0,8                   |
| Vitamina D3    | 0,8                   |
| 25-OH-D2       | 100                   |
| 25-OH-D3       | 100                   |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                   |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                   |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                   |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                   |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0                  |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0                  |

**CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.**

#### PROGRAMA DEL ENSAYO

1. Extraiga muestras: suministre 500 uL de acetonitrilo en un tubo de vidrio y añada lentamente 50 uL de calibrador, control o muestra de paciente por debajo de la superficie de acetonitrilo. Agite en vórtex durante 10 segundos y centrifugue con 1200 x g\* durante 10 minutos a 20-25°C.
2. Suministre los reactivos según el siguiente programa:

| Tubos/Reactivos                 | Cuentas totales | NSB   | Cal 0-6 | Controles y muestras desconocidas |
|---------------------------------|-----------------|-------|---------|-----------------------------------|
| Calibradores 0 extraídos        | -               | 25 µL | -       | -                                 |
| Calibradores extraídos          | -               | -     | 25 uL   | -                                 |
| Controles extraídos             | -               | -     | -       | 25 uL                             |
| Muestras desconocidas extraídas | -               | -     | -       | 25 uL                             |
| Trazador                        | 50 uL           | 50 uL | 50 uL   | 50 uL                             |
| Tampón NSB/adición              | 1 mL            | 1 mL  | -       | -                                 |
| Antisuero 25-OH-D               | -               | -     | 1 mL    | 1 mL                              |

3. Mezcle bien; incube durante 90 minutos (+/- 10 minutos) a 20-25°C.
4. Suministre 500 uL de complejo de precipitación DAG en todos los tubos salvo en los de cuentas totales.
5. Mezcle bien; incube durante 20-25 minutos a 20-25°C.
6. Suministre 500 uL de tampón NSB/adición en todos los tubos salvo en los de cuentas totales.
7. Centrifugue con 1800 x g\* durante 20 minutos.
8. Decante los sobrenadantes.
9. Cuente cada tubo en un contador gamma durante 60 segundos o más.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio en cm}) (\text{rpm})^2$$



## KIT 25-IDROSSIVITAMINA D <sup>125</sup>I RIA

### 1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO *IN VITRO*.

Questo kit serve per la determinazione quantitativa di 25-idrossivitamina D (25-OH-D) e di altri metaboliti idrossilati di vitamina D nel siero o plasma umano e serve per la valutazione di sufficienza di vitamina D. I risultati delle analisi, unitamente ad altri dati clinici e di laboratorio, serviranno al medico specialista per prendere decisioni per la scelta terapeutica del singolo paziente, facente parte di una popolazione adulta.

### 2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

Man mano che il calciferolo (Vitamina D) entra in circolazione, questo viene metabolizzato in forme diverse, per la maggior parte in 25-idrossicalciferolo (25-OH-D). La prima fase del metabolismo della vitamina D, 25 idrossilazione, avviene principalmente nel fegato.<sup>1</sup> Solo una piccola quantità di 25-OH-D viene metabolizzata nel rene in altri metaboliti di idrossivitamina D.<sup>2,3</sup> Poiché 25-OH-D è la forma predominante in circolo di vitamina D nella popolazione normale, essa è considerata l'indice più affidabile dello stato di vitamina D.<sup>4</sup>

Le due forme principali di 25-OH-D sono colecalciferolo (vitamina D<sub>3</sub>) ed ergocalciferolo (vitamina D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> La vitamina D<sub>3</sub> deriva principalmente dall'azione dei raggi ultravioletti sulla pelle, mentre la vitamina D<sub>2</sub> deriva unicamente da fonti alimentari. Poiché questi due composti parentali contribuiscono in varie forme allo stato generale della vitamina D nell'individuo, è importante che entrambe le forme vengano misurate con il medesimo metodo.<sup>6,7</sup> Moltissime ricerche hanno fornito informazioni sui livelli di circolazione del metabolismo di 25-OH-D e della loro importanza fisiologica.

Le misurazioni di 25-OH-D stanno assumendo un'importanza sempre maggiore nel trattamento di pazienti che presentano vari disturbi di metabolismo del calcio associati a rachitismo, ipocalcemia neonatale, gravidanza, osteodistrofia nutrizionale e renale, ipoparatiroidismo e osteoporosi nella postmenopausa.<sup>8-10</sup> NOTA: Le caratteristiche di efficacia nell'analisi DiaSorin 25-OH-D non sono state studiate sulla popolazione pediatrica.

### 3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'analisi DiaSorin 25-OH-D prevede una procedura a due fasi. La prima fase esegue un'estrazione rapida con acetonitrile di 25-OH-D e di altri metaboliti idrossilati da siero o plasma. Dopo l'estrazione, il campione trattato viene analizzato usando una procedura RIA di equilibrio. Il metodo RIA si basa su un anticorpo con specificità fino a 25-OH-D. Il campione, l'anticorpo e il tracciante vengono incubati per 90 minuti alla temperatura di 20-25°C. La separazione di fase avviene dopo un'incubazione di 20 minuti a 20-25°C mediante un secondo complesso precipitante gli anticorpi. Tampone NSB/di aggiunta viene aggiunto dopo l'incubazione e prima della centrifugazione per facilitare la riduzione di legame non specifico.

### 4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

|                                    |                  |
|------------------------------------|------------------|
| Calibratori 25-OH-D                | 6 fiale/1 mL     |
| Tampone NSB/di aggiunta 25-OH-D    | 1 flacone/70 mL  |
| Antisiero 25-OH-D                  | 1 flacone/105 mL |
| Tracciante 25-OH-D                 | 1 fiala/6 mL     |
| Complesso precipitante 25-OH-D DAG | 2 fiale/30 mL    |
| Controlli 25-OH-D                  | 2 fiale/1 mL     |
| Acetonitrile 25-OH-D               | 2 fiale/15 mL    |
| Numero di test                     | 100              |

CONSERVAZIONE: Il kit deve essere conservato a 2-8°C. Dopo l'apertura, conservare ogni reagente a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante.

Non si devono mescolare reagente di lotti diversi.

#### **4.1 Tampone NSB/di aggiunta 25-OH-D** : reagente pronto all'uso

Tampone di fosfato-gelatina contenente 0.1% sodio azide. Questo componente ha una doppia funzione. Servirà sia da tampone NSB e che da tampone di aggiunta.

#### **4.2 Calibratori 25-OH-D<sub>3</sub>**: reagente pronto all'uso

Sei calibratori (25-OH-D<sub>3</sub>) a concentrazioni varianti fra 0-100 ng/mL sono prediluiti nel siero umano trattato contenente 0.1% sodio azide. Maneggiare questi reagenti con cura (vedere le Avvertenze e Precauzioni). I calibratori di questo kit sono calibrati mediante determinazione quantitativa UV e sono stati verificati mediante analisi HPLC. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, come consigliato.

**NOTA:** Se si desidera, si può creare un calibratore "supplementare" (2.5 ng/mL) mediante diluizione del calibratore del kit "1" 1:2 nel kit del calibratore zero (ad esempio, 100 uL "1" + 100 uL "0"). La diluizione deve essere eseguita prima dell'estrazione e quindi estratta come da istruzioni allegate.

#### **4.3 Antisiero 25-OH-D**: reagente pronto all'uso.

Il siero di capra anti-25-OH-D è diluito in un tampone di fosfato-gelatina contenente 0.1% sodio azide.

#### **4.4 Tracciante 25-OH-D<sub>3</sub>**: reagente pronto all'uso.

Un analogo iodato [<sup>125</sup>I] di 25-OH-D<sub>3</sub> è diluito in un tampone etanolo-fosfato. Maneggiare questo reagente con cura (vedere le Avvertenze e Precauzioni).

#### **4.5 Complesso precipitante Donkey Anti-Goat (DAG, Asino Anti-Capra)**: reagente pronto all'uso.

Il siero DAG, il siero normale di capra e glicolo polietilenico sono diluiti in un tampone BSA-borato contenente gentamicin solfato e 0.1% sodio azide. Mescolare per 5-10 minuti prima e durante l'uso al fine di ottenere una sospensione omogenea.

#### **4.6 Controlli 25-OH-D**: reagente pronto all'uso.

Nel siero umano contenente 0.1% sodio azide si aggiungono le quantità necessarie di 25-OH-D<sub>3</sub> in modo da ottenere concentrazioni di controllo nei range specificati. Mescolare a lungo e trattare come campioni non noti. Il controllo 1 rappresenta un range da basso a normale, mentre il controllo 2 rappresenta un range da alto a normale. L'intervallo delle concentrazioni di ogni controllo è stampato sul certificato di analisi e indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori dei controlli ottenuti con dosaggi affidabili. Maneggiare questi reagenti con cura (vedere le Avvertenze e Precauzioni).

#### **4.7 Acetonitrile**: reagente pronto all'uso.

Acetonitrile. Idoneo per uso con questo kit. Maneggiare questo reagente con cura (vedere le Avvertenze e Precauzioni). Questo prodotto contiene gomma naturale essiccata.

## **5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI**

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

**ATTENZIONE:** Il presente dispositivo deve essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, laboratori clinici, ospedali, veterinari o istituti di ricerca. I test devono essere eseguiti unicamente da personale di laboratorio qualificato e adeguatamente addestrato.

Ogni unità di siero/plasma da donatore usata nella preparazione di questo prodotto è stata testata con una metodica approvata dalla FDA statunitense e trovata non reattiva per la presenza di HBsAG, anticorpi ad HCV ed anticorpi ad HIV 1/2. Anche se questi metodi sono estremamente accurati, non è garantita la localizzazione di tutte le unità infette. Questo prodotto può inoltre contenere altro materiale di provenienza umana per il quale non esiste un test approvato. Poiché nessuna metodologia di test approvata può offrire garanzia completa sull'assenza del virus dell'epatite B (HBV), dell'epatite C (HCV), del virus di immunodeficienza (HIV) o di altri agenti infettivi, tutto il materiale di provenienza umana deve essere trattato in conformità con le buone pratiche di laboratorio adottando le precauzioni appropriate come descritto nei manuale dei Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," quarta edizione, Maggio 1999 o edizione corrente.

#### **REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE**

**ATTENZIONE:** Alcuni reagenti di questo kit contengono sodio azide. La sodio azide può reagire con componenti in piombo o rame e formare quindi azidi metalliche altamente esplosive. Al momento dello smaltimento, lavare con abbondante acqua al fine di evitare la formazione di azide (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE). Per ulteriori informazioni, consultare "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," nel manuale Guide-Safety Management No. CDC-22 pubblicato dai Centri per il controllo e la Prevenzione delle malattie di Atlanta, GA, U.S. 1976.

#### **Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 1999/45/CE)**

R 20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Dannoso per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

R 32 - Contact with acids liberates very toxic gas (Il contatto con acidi libera gas altamente tossico).

S28 - After contact with skin, wash immediately with plenty of water (Dopo il contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua).

#### **REAGENTI CONTENENTI ACETONITRILE**

#### **Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 88/379/CEE)**

R11 - Highly flammable (Altamente infiammabile).

R23/24/25 - Toxic by inhalation, in contact with skin and if swallowed (Tossico per inalazione, per contatto con la pelle ed ingestione).

S16 - Keep away from sources of ignition - No smoking (Tenere lontano da fonti di calore e fiamme libere - Non fumare).

S36 - Wear suitable protective clothing (Indossare indumenti protettivi adatti).

S43 - In case of fire, use dry chemical or carbon dioxide (In caso di incendio, usare agenti chimici essiccati o anidride carbonica).

S45 - In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (**In caso di incidente o di malessere, richiedere immediatamente l'intervento di un medico**).

S51 - Use only in well-ventilated areas (Usare solo in luoghi ben ventilati).

#### **REAGENTI CONTENENTI ETANOLO**

#### **AVVERTENZA- INFIAMMABILE**

#### **Frasi di rischio per sostanze pericolose della Comunità Europea (Direttiva del Consiglio 88/379/CEE)**

R11 - Highly flammable (Altamente infiammabile).

S16 - Keep away from sources of ignition - No smoking (Tenere lontano da fonti di calore e fiamme libere - Non fumare).

S43 - In case of fire, use dry chemical or carbon dioxide (In caso di incendio, usare agenti chimici essiccati o anidride carbonica).

#### **REAGENTI CONTENENTI IODIO-125**

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.

3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

**AVVERTENZA:** Questo prodotto contiene un prodotto chimico noto nello Stato della California per provocare cancro.

**ATTENZIONE:** La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

## 6. INDICAZIONI DI POSSIBILE DETERIORAMENTO DEI REAGENTI DEL KIT

- 6.1 La presenza di particolato anomalo in uno qualsiasi dei reagenti (il tampone NSB, l'antisiero e i reagenti precipitanti DAG possono essere torbidi).
- 6.2 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.
- 6.3 Una diminuzione del legame massimo.
- 6.4 Un legame altamente non specifico.

## 7. RACCOLTA DEI CAMPIONI E PREPARAZIONE

Sono richiesti cinquanta (50) microlitri di siero o plasma (EDTA o eparina) per l'estrazione di 25-OH-D; un volume di 150 microlitri consentirà di ripetere le analisi e di fornire un volume adeguato per le operazioni con la pipetta.

Con questo kit si può usare siero o plasma umano. Si possono usare per questa analisi anticoagulanti EDTA o eparina. Si consigliano campioni prelevati a digiuno, anche se non obbligatorio. Il sangue deve essere prelevato in maniera asettica mediante venopuntura in una provetta di vetro da 5 o 10 mL sotto vuoto. Lasciar coagulare il sangue a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugare per 15 minuti usando circa 760 x g\* per ottenere sieri privi di emolisi. Non sono richiesti additivi o conservanti per mantenere l'integrità del campione. Tutto il materiale in plastica, oggetti in vetro o altro materiale che viene a contatto con i campioni deve essere completamente esente da qualsiasi contaminazione. Conservare i campioni di siero o plasma a -20°C o a temperatura inferiore. I campioni possono essere conservati in fiale di plastica o vetro, purché le fiale siano sigillate ermeticamente al fine di evitare l'essiccazione del campione.

Uno studio eseguito da DiaSorin su un numero limitato di campioni ha mostrato che i campioni rimangono stabili fino a 9 settimane se conservati a -20°C. Nessun cambiamento significativo nei valori è stato osservato dopo 3 cicli di gelo e disgelo dei campioni. E' bene evitare cicli di gelo-disgelo ripetuti. I campioni che devono essere trasportati devono generalmente arrivare congelati.

## 8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN

### DOTAZIONE

- Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm.
- NOTA:** L'uso di provette in plastica non è consigliato per questo kit.
- Centrifuga a temperatura controllata adatta per 12 provette da 75 mm.
- Contatore a raggi gamma adatto per il conteggio di iodio-125.
- Mixer Vortex.
- Dispositivo per operazioni con pipetta

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radio in cm}) (\text{rpm})^2$$

- a. Micropipette dosatrici calibrate per inviare 25 µL e 50 µL (errore inferiore o uguale a ± 1%).
- b. Dosatori a ripetizione che utilizzano punte calibrate per inviare 50 µL, 500 µL e 1.0 mL (errore inferiore o uguale a ± 1%).

**NOTA:** Per le procedure di estrazione e analisi descritte più avanti, fare riferimento a "Attrezzature e materiali necessari, non forniti in dotazione" per le specifiche per la pipetta.

## 9. PROCEDURA DI ESTRAZIONE

- 9.1 Preparare 12 provette in vetro da 75 mm monouso per ogni calibratore, controllo e campione.
- 9.2 Aggiungere 500 µL di acetonitrile in ogni provetta.
- 9.3 Sistemare la punta della pipetta contenente 50 µL di calibratore, controllo o campione sotto il livello dell'acetonitrile e LENTAMENTE aggiungerlo all'acetonitrile.
- 9.4 Agitare per 10 secondi nel vortex.
- 9.5 Centrifugare usando  $1200 \times g^*$  per 10 minuti a 20-25°C.
- 9.6 Versare con la pipetta campioni doppi di 25 µL del liquido superficiale in 12 provette da x 75 mm adeguatamente etichettate. **ATTENZIONE:** Fare attenzione di non smuovere il precipitato.
- 9.7 Analizzare i campioni di liquido superficiale in base alla procedura di analisi.

## 10. PROCEDURA DI ANALISI

- 10.1 Lasciar che tutti i reagenti e i campioni si stabilizzino a temperatura ambiente. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C.
- 10.2 Preparare due serie di 12 provette monouso da 75 mm in vetro etichettate in base allo Schema di analisi in ultima pagina.
- 10.3 Aggiungere i reagenti nel seguente modo:
  - a. **Provette per il conteggio totale**  
50 µL di  $^{125}I$  25-OH-D  
1.0 mL di tampone NSB/di aggiunta
  - b. **Provette per legame non specifico (NSB)**  
25 µL di calibratore 0 (estratto)  
50 µL di  $^{125}I$  25-OH-D  
1.0 mL di tampone NSB/di aggiunta
  - c. **Calibratori, controlli e campioni non noti**  
25 µL di calibratore, controllo o campione non noto (estratto)  
50 µL di  $^{125}I$  25-OH-D  
1.0 mL di antisiero 25-OH-D
- 10.4 Agitare lentamente nel Vortex senza formare schiuma e lasciare in incubazione per 90 (+/- 10) minuti a 20-25°C.
- 10.5 Aggiungere 500 µL di complesso precipitante DAG (il complesso precipitante DAG deve essere ben miscelato prima e durante l'uso) in tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale.
- 10.6 Mescolare bene le provette e lasciare in incubazione per 20-25 minuti a 20-25°C.
- 10.7 Aggiungere 500 µL di tampone NSB/di aggiunta in tutte le provette, eccetto le provette per il conteggio totale. Agitare lentamente nel Vortex per miscelare bene le provette. Fare attenzione quando si esegue questa operazione, per evitare schizzi provocati dall'elevato volume di liquido nella provetta.
- 10.8 Centrifugare tutte le provette per 20 minuti a 20-25°C a  $1800 \times g^*$ , eccetto le provette per il conteggio totale.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

- 10.9 Far decantare i liquidi superficiali, eccetto le provette per il conteggio totale, usando un portaprovette con alloggiamento in schiuma o materiale simile, capovolgendo l'alloggiamento in un contenitore adeguato per i rifiuti. Porre l'alloggiamento capovolto su carta assorbente per 2-3 minuti. Asciugare delicatamente le provette per rimuovere tutto il liquido.
- 10.10 In un contatore ad emissione di scintille gamma, contare ogni provetta per un minimo 1 minuto. Ogni provetta deve essere contata per un tempo sufficiente a raggiungere la precisione statistica (vedere la sezione dei risultati: Limiti della procedura).

## 11. COMMENTI ALLA PROCEDURA

- 11.1 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.
- 11.2 Per monitorare completamente la costanza e la validità di un'analisi RIA, si possono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare regolarmente i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit.
  - a. **Conteggi totali**
  - b. **Legame massimo**  
Conteggi medi al minuto (CPM) della Provetta del calibratore 0/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
  - c. **Legame non specifico**  
CPM medio della provetta NSB/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
  - d. **Pendenza della curva del calibratore**  
Ad esempio, monitorare i punti a 80 e 50% della linea del calibratore.

## 12. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due controlli (uno a livello basso-normale ed uno a livello alto-normale) in ogni analisi per monitorare le performance. Si possono utilizzare i controlli disponibili in commercio o i due controlli di riferimento forniti con il kit. I controlli del kit sono stati esaminati da DiaSorin utilizzando il kit DiaSorin 25-Idrossivitamina D <sup>125</sup>I RIA. L'intervallo delle concentrazioni di ogni controllo è stampato sul certificato di analisi e indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori dei controlli ottenuti con dosaggi affidabili.

I controlli devono essere considerati come campioni non noti e analizzati in duplice copia. Conservare le tabelle per il controllo della qualità al fine di verificare le performance dei controlli. Limiti accettabili per le performance verranno stabiliti da ogni singolo laboratorio per ogni livello di controllo utilizzando metodi basati su statistiche ideati per rilevare errori sistematici e casuali. I risultati dei controlli devono corrispondere ai criteri del laboratorio per quanto concerne l'accettabilità prima di riferire i risultati dei test ai pazienti.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di RIA, ognuno tende ad ottenere una curva di calibrazione mediante tracciamento dell'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori per la calibrazione. Il grafico può essere su scala lineare o logaritmica. Ciascun metodo dà essenzialmente gli stessi valori per i controlli e i campioni, anche se certe analisi possono essere più "adatte" per un particolare metodo rispetto ad un altro. Il metodo di calcolo del Laboratorio di controllo qualità di DiaSorin è % di B/B<sub>0</sub> rispetto alla concentrazione di log.

- 13.1 Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.
- 13.2 Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi.
- 13.3 Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione non noto per il CPM corretto del calibratore 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM del calibratore o campione non noto} - \text{CPM di NSB}}{\text{CPM del calibratore 0} - \text{CPM di NSB}} \times 100$$

- 13.4** Utilizzando carta millimetrata per modello log-logit o semi-logaritmica, tracciare la percentuale di B/B<sub>0</sub> per i calibratori 25-OH-D (asse verticale) rispetto alla concentrazione (asse orizzontale).
- 13.5** Tracciare una linea di miglior interpolazione fra i punti.
- 13.6** Interpolare i livelli di 25-OH-D nei campioni non noti dal tracciato.
- 13.7** Se un campione non noto è stato diluito, correggere con il fattore di diluizione idoneo.
- 13.8** Calcolare il legame massimo dividendo il CPM del calibratore 0 per la media dei conteggi totali ottenuta nelle provette dei conteggi totali.
- 13.9** Si possono usare programmi di riduzione automatica dei dati per analizzare i dati. DiaSorin utilizza RIACalc (Pharmacia) con un programma a curva uniforme %B/B<sub>0</sub> rispetto alla concentrazione logaritmica. Altri metodi di riduzione dei dati devono essere convalidati prima di includerli nell'uso regolare.

**TABELLA I**  
Dati campione DiaSorin 25-OH-Vitamina D RIA

| Provetta          | Duplicato<br>CPM                 | Media<br>CPM | Corretto<br>CPM | Percentuale    |                                | Grafico<br>Conc. |
|-------------------|----------------------------------|--------------|-----------------|----------------|--------------------------------|------------------|
|                   |                                  |              |                 | Bound<br>(B/T) | Percent<br>(B/B <sub>0</sub> ) |                  |
| Conteggio totale  | 41878<br>39924                   | 40901        |                 |                |                                |                  |
| NSB               | 555<br>508                       | 531          |                 | 1,3            |                                |                  |
| Calibratore 0     | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822        | 19291           | 48,5           |                                |                  |
| Calibratori       |                                  |              |                 |                |                                |                  |
| 1                 | 14503<br>14442                   | 14472        | 13941           |                | 72,3                           | 5                |
| 2                 | 11005<br>10670                   | 10838        | 10307           |                | 53,4                           | 12               |
| 3                 | 7182<br>7642                     | 7411         | 6880            |                | 35,7                           | 20               |
| 4                 | 4687<br>4622                     | 4654         | 4123            |                | 21,4                           | 40               |
| 5                 | 2768<br>2985                     | 2877         | 2346            |                | 12,2                           | 100              |
| Campioni non noti |                                  |              |                 |                |                                |                  |
| 1                 | 10365<br>10447                   | 10406        |                 |                | 53,9                           | 12,8             |
| 2                 | 4219<br>4720                     | 4634         |                 |                | 24,0                           | 40,4             |

I dati di campioni tipici e una curva di calibratore sono riportati nella TABELLA I e nella FIGURA 1; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

**25-IDROSSIVITAMINA D**  
**ESEMPIO DI CURVA DI CALIBRAZIONE**

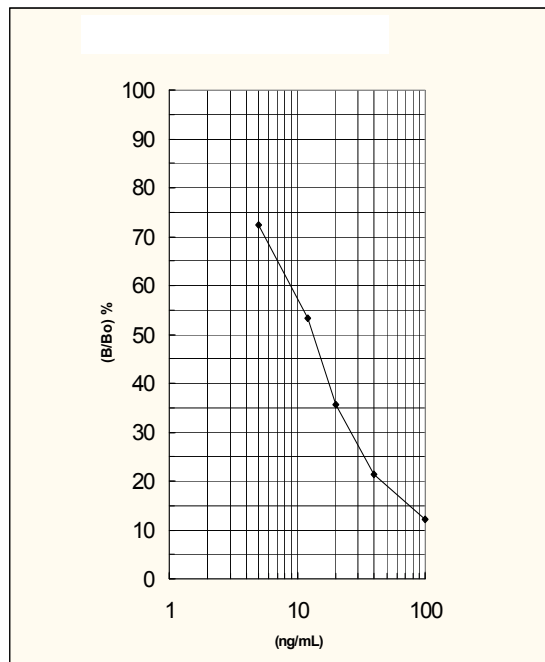


Figura 1

**14. LIMITI DELLA PROCEDURA**

- 14.1 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire errori statistici (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%; 10.000 CPM produrrà un errore dell'1%).
- 14.2 I risultati delle analisi devono essere usati unitamente ad altri dati clinici e di laboratorio al fine di aiutare il medico specialista a prendere decisioni per la scelta terapeutica del singolo paziente.
- 14.3 Gli effetti dovuti a emolisi o lipemia presenti nei campioni del paziente non sono stati presi in considerazione per questo tipo di analisi; tuttavia, l'estrazione con acetonitrile può ridurre eventuali interferenze causate da queste sostanze.
- 14.4 La causa maggiore di imprecisione in questo metodo è con molta probabilità la fase di estrazione. Altre cause di imprecisione possono essere micropipette dosatrici imprecise o reagenti scaduti.
- 14.5 L'anticorpo del kit presenterà una certa reattività incrociata con tutte le forme di di-idrossivitamina D2 e D3 steroidi; tuttavia, nell'uomo, questi composti sono presenti naturalmente solo in concentrazioni picomolari.

**NOTA:** Le caratteristiche di efficacia di questa analisi non sono state studiate sulla popolazione pediatrica.



## 15. VALORI PREVISTI

### Range di riferimento

È importante che ogni laboratorio stabilisca un range di riferimento proprio, rappresentativo della sua popolazione tipica. Fattori quali esposizione agli UV<sup>9,10</sup> stagione,<sup>11,12</sup> razza<sup>7</sup> e abitudini alimentari<sup>8</sup> sono noti per influire sui livelli di 25-OH-D nell'uomo. Una diminuzione dei livelli di vitamina D con l'età è stata dimostrata nella letteratura; tuttavia, le ricerche eseguite nella maggior parte di questi studi sono state condotte nei paesi del Nord Europa, dove è meno presente la luce del sole e l'integrazione alimentare è meno diffusa.<sup>8,15,16</sup> Questo fattore, associato a differenze altamente variabili nei criteri sanitari e dello stato di somministrazione dei farmaci, rende difficile generalizzare l'effetto della sola età sulla situazione di vitamina D.<sup>12</sup> I risultati di studi condotti negli Stati Uniti hanno prodotto risultati ambigui, dove alcuni indicavano la comparsa mentre altri indicavano l'assenza di una diminuzione della vitamina D con l'età. Gli anticonvulsivi sono noti essere una causa della diminuzione dei livelli di 25-OH-D, come pure l'uso prolungato di schermi solari contenenti acido p-aminobenzoico.<sup>17</sup> Un range di riferimento pediatrico per l'uso di questo kit non è stato stabilito da DiaSorin.

DiaSorin ha preso in esame il siero prelevato da 20 uomini e da 24 donne, apparentemente sani, prevalentemente volontari di razza caucasica della regione centro-occidentale degli Stati Uniti, per l'uso del kit DiaSorin 25-Ipdrossivitamina D<sup>125</sup>I RIA. L'età dei volontari era compresa fra 23 e 67 anni. I campioni sono stati prelevati nel mese di ottobre. È stata notata solo una leggera differenza nei livelli di 25-OH-D fra i maschi (media = 21.7 ng/mL) e le femmine (media = 24.1 ng/mL) in questo gruppo di riferimento. La media dell'intera popolazione (n = 44) era di 23.0 ng/mL con un range 2 S.D. di 9.0 - 37.6 ng/mL.

In numerosi paesi è stata osservata una elevata incidenza della carenza subclinica di 25-OH vitamina D in popolazioni normali, apparentemente sane, in particolare nei mesi invernali.<sup>13,14</sup> Letteratura recente ha suggerito i range seguenti per classificare lo stato della 25-OH vitamina D: carenza: 0 - 5 ng/mL (0 - 12,5 nmol/L); insufficienza: 5 - 20 ng/mL (12,5 - 50 nmol/L); ipovitaminosi D: 20 - 40 ng/mL (50 - 100 nmol/L); sufficienza: 40 - 100 ng/mL (100 - 250 nmol/L); tossicità: maggiore di 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

### 16.1 Precisione

La precisione delle analisi è stata valutata dalla DiaSorin mediante la prove di quattro livelli di controllo che comprendono una curva di 40 analisi in 23 giorni operativi. Ogni analisi comprendeva i quattro controlli x 2 estrazioni (4 ripetizioni). L'impostazione dello studio è stata effettuata secondo le linee guida EP5-T2 del documento CLSI.<sup>22</sup> I calcoli dei dati sono stati eseguiti utilizzando SAS PROC VARCOMP. Il modello statistico adottato è un modello lineare con effetti casuali.<sup>23</sup>

| Media (ng/mL) | All'interno dell'analisi (% C.V.) | Imprecisione totale (% C.V.) |
|---------------|-----------------------------------|------------------------------|
| 8,6           | 11,7                              | 9,4                          |
| 22,7          | 10,5                              | 8,2                          |
| 33,0          | 8,6                               | 9,1                          |
| 49,0          | 12,5                              | 11,0                         |

### 16.2 Accuratezza

L'accuratezza dell'analisi è stata controllata mediante diluizione e test di recupero.

Linearità (Parallelismo)

Studio di diluizione seriale di 4 campioni (valori = ng/mL)

| Campione | Non diluito | 1/2  | 1/4  |
|----------|-------------|------|------|
| 1        | 74,6        | 79,4 | 74,8 |
| 2        | 87,8        | 96,4 | 95,2 |
| 3        | 85,6        | 88,2 | 82,4 |
| 4        | 55,2        | 57,8 | 60,4 |

### Recupero

Quantità note di 25-OH-D<sub>3</sub> sono state aggiunte ai campioni di siero umano ed è stata determinata la percentuale di recupero.

| Campione numero | Conc. iniziale (ng/mL) | Quantità aggiunta (ng/mL) | *Conc. prevista (ng/mL) | Conc. misurata (ng/mL) | Recupero |
|-----------------|------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|----------|
| 1               | 15,8                   | 5,0                       | 25,5                    | 24,8                   | 97%      |
|                 |                        | 10,0                      | 35,1                    | 41,8                   | 119%     |
|                 |                        | 25,0                      | 62,7                    | 61,9                   | 99%      |
| 2               | 51,2                   | 5,0                       | 60,6                    | 62,0                   | 102%     |
|                 |                        | 10,0                      | 69,8                    | 73,8                   | 106%     |
|                 |                        | 25,0                      | 96,4                    | 99,4                   | 103%     |
| 3               | 26,6                   | 5,0                       | 36,2                    | 33,5                   | 92%      |
|                 |                        | 10,0                      | 45,7                    | 54,0                   | 118%     |
|                 |                        | 25,0                      | 73,0                    | 82,8                   | 113%     |
| 4               | 57,3                   | 5,0                       | 66,6                    | 63,8                   | 96%      |
|                 |                        | 10,0                      | 75,8                    | 78,1                   | 103%     |
|                 |                        | 25,0                      | 102**                   | 104**                  | 102%     |
| 5               | 41,3                   | 5,0                       | 50,8                    | 48,5                   | 95%      |
|                 |                        | 10,0                      | 60,1                    | 56,1                   | 93%      |
|                 |                        | 25,0                      | 87,0                    | 93,2                   | 107%     |

\* Il calcolo della concentrazione prevista di 25-OH-D comprende il fattore di diluizione introdotto dalla soluzione che viene aggiunta.

\*\* Questi sono valori estrapolati, la concentrazione misurata è > 100 ng/mL (calibratore principale)

### 16.3 Sensibilità Analitica (limiti di rilevazione)

La precisione di questa analisi, se definita come quantità minore differenziata da zero a 2 deviazioni standard sotto il CPM medio del calibratore zero (n = 20), si è dimostrata essere inferiore o uguale a 1,5 ng/mL. Tale livello di sensibilità vale sia per l'uso del calibratore "1" che per il calibratore "supplementare".

### 16.4 Specificità Analitica

I dati sulla reattività incrociata dell'antisiero utilizzato in questo kit sono espressi come rapporto di concentrazione di 25-OH-D rispetto alla concentrazione della sostanza reagente incrociata ad inibizione del 50% di legame massimo.

| Steroide       | % di reattività incrociata |
|----------------|----------------------------|
| Vitamina D2    | 0,8                        |
| Vitamina D3    | 0,8                        |
| 25-OH-D2       | 100                        |
| 25-OH-D3       | 100                        |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                        |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                        |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                        |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                        |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0                       |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0                       |

**FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA**

## SCHEMA DI ANALISI

1. Estrarre i campioni: versare 500 uL di acetonitrile in una provetta di vetro e lentamente aggiungere 50 uL di calibratore, controllo o campione del paziente sotto la superficie di acetonitrile, Agitare nel Vortex per 10 secondi e centrifugare usando 1200 x g\* per 10 minuti a 20-25°C.
2. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

| Provette/Reagenti          | Conteggi totali | NSB    | CAL 0-6 | Controlli e campioni non noti |
|----------------------------|-----------------|--------|---------|-------------------------------|
| Calibratori 0 estratti     | -               | 25 µL  | -       | -                             |
| Calibratori estratti       | -               | -      | 25 uL   | -                             |
| Controlli estratti         | -               | -      | -       | 25 uL                         |
| Campioni non noti estratti | -               | -      | -       | 25 uL                         |
| Tracciatore                | 50 uL           | 50 uL  | 50 uL   | 50 uL                         |
| Tampone NSB/di aggiunta    | 1,0 mL          | 1,0 mL | -       | -                             |
| Antisiero 25-OH-D          | -               | -      | 1,0 mL  | 1,0 mL                        |

3. Mescolare bene; lasciare in incubazione per 90 minuti (+/- 10 minuti) a 20-25°C.
4. Versare 500 uL di complesso precipitante DAG in tutti i recipienti, eccetto nelle provette per il conteggio totale.
5. Mescolare bene; lasciare in incubazione per 20-25 minuti a 20-25°C.
6. Versare 500 uL di tampone NSB/di aggiunta nel recipiente, eccetto nelle provette per il conteggio totale.
7. Centrifugare utilizzando 1800 x g\* per 20 minuti.
8. Far decantare i liquidi superficiali.
9. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma per 60 secondi o più.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

## KIT DE RADIOIMUNOENSAIO DE 25-HIDROXIVITAMINA D <sup>125</sup>I

### 1. USO INDICADO

PARA USO DIAGNÓSTICO *IN VITRO*,

Este kit destina-se à determinação quantitativa de 25-hidroxivitamina D (25-OH-D) e de outros metabólitos de vitamina D hidroxilados no soro ou plasma humanos para ser usado na avaliação da suficiência de vitamina D. Os resultados dos ensaios devem ser usados em conjunto com outros dados clínicos e laboratoriais para ajudar o médico a tomar decisões de gestão individual de pacientes numa população adulta.

### 2. RESUMO E EXPLICAÇÃO

À medida que o calciferol (Vitamina D) entra na circulação, é metabolizado de diversas formas, sendo a principal delas o 25-hidroxiciferol (25-OH-D). O primeiro passo no metabolismo da vitamina D, hidroxilação 25, ocorre principalmente no fígado.<sup>1</sup> Só uma pequena quantidade de 25-OH-D é metabolizada no rim para outros metabólitos dihidroxivitamina D no homem.<sup>2,3</sup> Como o 25-OH-D é a forma circulatória predominante de vitamina D na população normal, este é considerado o índice mais fiável do estado da vitamina D.<sup>4</sup>

As duas formas principais de 25-OH-D são o colecalciferol (vitamina D<sub>3</sub>) e o ergocalciferol (vitamina D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> A Vitamina D<sub>3</sub> deriva principalmente de acções da luz ultravioleta na pele enquanto a D<sub>2</sub> deriva apenas de fontes alimentares. Como estes dois compostos semelhantes fornecem várias contribuições para o estado geral de vitamina D do indivíduo, é importante que ambas as formas sejam igualmente medidas.<sup>6,7</sup> Várias pesquisas forneceram informações sobre os níveis circulatórios de metabolismo de 25-OH-D e o seu significado fisiológico.

A medição de 25-OH-D está-se a tornar cada vez mais importante na gestão de pacientes com vários problemas de metabolismo de cálcio associados ao raquitismo, à hipocalcemia neonatal, à gravidez, à osteodistrofia nutricional e renal, ao hipoparatiroidismo e à osteoporose pós-menopausal.<sup>8-10</sup> NOTA: As características do desempenho do ensaio de DiaSorin 25-OH-D não foram estabelecidas numa população pediátrica.

### 3. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O ensaio de DiaSorin 25-OH-D consiste num procedimento de duas fases. O primeiro procedimento envolve uma extracção rápida de 25-OH-D e de outros metabólitos hidroxilados do soro ou plasma com acetonitrilo. Após a extracção, a amostra tratada é então testada usando um procedimento de equilíbrio de radioimunoensaio. O método de radioimunoensaio (RIA) baseia-se num anticorpo específico para 25-OH-D. A amostra, o anticorpo e o traçador são incubados durante 90 minutos a 20-25°C. A fase de separação é completada após uma incubação de 20 minutos a 20-25°C com um segundo complexo de anticorpos. Um tampão NSB/solução tampão é adicionado após esta incubação e antes da centrifugação para ajudar a reduzir as ligações não específicas.

### 4. REAGENTES FORNECIDOS NO KIT

|                                   |                  |
|-----------------------------------|------------------|
| Calibradores 25-OH-D              | 6 frascos/1 mL   |
| Tampão NSB/Solução tampão 25-OH-D | 1 garrafa/70 mL  |
| Anti-soro 25-OH-D                 | 1 garrafa/105 mL |
| Traçador 25-OH-D                  | 1 frasco/6 mL    |
| Complexo precipitante 25-OH-D DAG | 2 frascos/30 mL  |
| Controlos 25-OH-D                 | 2 frascos/1 mL   |
| Acetonitrilo 25-OH-D              | 2 frascos/15 mL  |
| Número de testes                  | 100              |

ARMAZENAMENTO: Ao ser recebido, o kit deve ser armazenado a 2-8°C. Depois de abrir, armazene cada reagente a 2-8°C até a data de validade no rótulo. Os reagentes não devem ser usados após a data de validade. A data de validade do kit é indicada no rótulo externo e corresponde à data de validade do traçador.

Não misture reagentes de lotes diferentes.

**4.1 Tampão NSB/Solução tampão 25-OH-D:** reagente pronto a usar.

Tampão de fosfato-gelatina contendo 0.1% de azida de sódio, Este componente possui uma função dupla, Pode ser usado como tampão NSB ou como solução tampão.

**4.2 Calibradores 25-OH-D<sub>3</sub>:** reagente pronto a usar.

Seis calibradores (25-OH-D<sub>3</sub>) com concentrações entre 0-100 ng/mL são pré-diluídos em soro humano processado com 0.1% de azida de sódio, Manuseie estes reagentes com cuidado (consulte a secção Avisos e Precauções), Os calibradores do kit são calibrados usando uma quantificação UV tendo sido verificados por meio de análise HPLC, Os calibradores do kit demonstram permutabilidade com amostras de pacientes quando usados com reagentes e com o procedimento operacional deste teste de diagnóstico in vitro tal como recomendado.

**NOTA:** Se preferir, pode ser criado um calibrador "Opcional" (2,5ng/mL) diluindo o calibrador "1" do kit 1:2 no calibrador zero do kit (i.e. 100 uL "1" + 100 uL "0"), Esta diluição deve ser realizada antes da extracção sendo depois extraída como inserção por produto.

**4.3 Anti-soro 25-OH-D:** reagente pronto a usar.

Soro anti-25-OH-D de cabra é diluído em tampão de gelatina e fosfato contendo 0,1% de azida de sódio.

**4.4 Traçador 25-OH-D<sub>3</sub>:** reagente pronto a usar.

Um análogo iodado [<sup>125</sup>I] de 25-OH-D<sub>3</sub> é diluído num tampão de etanol-fosfato, Manuseie este reagente com cuidado (consulte Avisos e Precauções).

**4.5 Complexo precipitante Anti-cabra burro (DAG):** reagente pronto a usar.

Soro anti-cabra de burro, soro normal de cabra e glicol polietileno são diluídos num tampão de BSA-borato contendo sulfato de gentamicina e 0.1% de azida de sódio, Misture durante 5-10 minutos antes e durante o uso para assegurar a obtenção de uma suspensão homogénea.

**4.6 Controlos 25-OH-D:** reagente pronto a usar.

Soro humano contendo 0.1% de azida de sódio é fixado com quantidades apropriadas de 25-OH-D<sub>3</sub> para obter concentrações de controlo dentro dos intervalos especificados, Misture bem e trate como se fossem amostras desconhecidas, O Controlo 1 representa um intervalo baixo-normal e o Controlo 2 representa um intervalo alto-normal. O intervalo das concentrações para cada controlo está imprimido no certificado de análise e indica os limites definidos pela DiaSorin para os valores dos controlos obtidos com ensaios fiáveis. Manuseie estes reagentes com cuidado (consulte Avisos e Precauções).

**4.7 Acetonitrilo:** reagente pronto a usar.

Acetonitrilo, Adequado para o uso com este kit, Manuseie este reagente com cuidado (consulte Avisos e Precauções), Este produto contém borracha natural seca.

## 5. AVISOS E PRECAUÇÕES

PARA USO DIAGNÓSTICO IN VITRO.

Não recomendado para o uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

**CUIDADO:** Este dispositivo deve ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, laboratórios clínicos, hospitais, veterinários ou entidades de pesquisa, Os testes devem ser realizados apenas por pessoal de laboratório devidamente qualificado e treinado.

### REAGENTES COM MATERIAL DE FONTE HUMANA

#### Trate como se fossem potencialmente infecciosos.

Cada unidade de doador de soro/plasma usados na preparação deste produto foi testado por um método aprovado pelo FDA americano e determinado como sendo não reactivo para a presença de HBsAg, anticorpo para HCV e anticorpo para HIV 1/2, Embora estes métodos sejam bastante precisos, não garantem que todas as unidades infectadas sejam detectadas, Este produto também pode conter outros materiais de origem humana para os quais não há teste aprovado, Como nenhum método de teste conhecido pode oferecer segurança total em relação à ausência do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV), do vírus HIV ou de outros agentes infecciosos, todos os produtos que contêm materiais de origem humana

devem ser manuseados de acordo com boas práticas laboratoriais usando as precauções adequadas tal como descrito no Manual dos Centros Americanos para Controlo e Prevenção de Doenças e Institutos Nacionais de Saúde, "Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos," (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories), 4ª edição, Maio 1999, ou edição actual.

#### **REAGENTES COM AZIDA DE SÓDIO**

**CUIDADO:** Alguns reagentes presentes neste kit contêm azida de sódio. A azida de sódio pode reagir com chumbo ou cobre para formar azidas de metal altamente explosivo. Ao eliminar, lave com grande quantidade de água para impedir a formação de azida (Directiva do Conselho 1999/45/EC). Para maiores informações, consulte "Descontaminação de drenos de pias para remover Sais de azida," no Manual Guia-Gestão de Segurança N° CDC-22 emitido pelos Centros de Controlo e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, U.S. 1976.

#### **Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 1999/45/EC)**

R 20/21/22 - Nocivo pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.

R 32 - O contacto com ácidos liberta gás muito tóxico.

S28 - Após contacto com a pele, lave imediatamente com água em abundância.

#### **REAGENTES COM ACETONITRILÓ**

#### **Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 88/379/EEC)**

R11 - Altamente inflamável.

R23/24/25 - Tóxico pela inalação, em contacto com a pele e se ingerido.

S16 - Mantenha distância de fontes de ignição — Não fumar.

S36 - Use roupas de protecção adequadas.

S43 - Em caso de fogo, use um extintor químico a seco ou de dióxido de carbono.

S45 - Em caso de acidente ou caso se sinta mal, procure imediatamente um médico.

S51 - Use apenas em áreas bem ventiladas.

#### **REAGENTES COM ETANOL**

#### **ADVERTÊNCIA - INFLAMÁVEL**

#### **Frases de Risco de Substâncias Perigosas da Comunidade Europeia (Directiva do Conselho 88/379/EEC)**

R11 - Altamente inflamável.

S16 - Mantenha distância de fontes de ignição — Não fumar.

S43 - Em caso de fogo, use um extintor químico a seco ou de dióxido de carbono.

#### **REAGENTES COM IODO-125**

Este kit contém material radioactivo que não excede 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) de iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebam rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão chegou a acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.

5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e em seguida lavadas com detergente alcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica: A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

**ADVERTÊNCIA:** Este produto contém um elemento químico que provoca cancro, segundo o Estado da Califórnia.

**ATENÇÃO:** O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

## 6. INDICAÇÕES DE POSSÍVEL DETERIORAÇÃO DOS REAGENTES DO KIT

- 6.1 A presença de partículas anormais em qualquer um dos reagentes, (O tampão NSB, o anti-soro e os reagentes de precipitação podem apresentar um aspecto turvo.)
- 6.2 Um deslocamento na inclinação ou na posição da curva do calibrador em relação à que é normalmente obtida.
- 6.3 Uma diminuição na ligação máxima.
- 6.4 Uma ligação não específica alta.

## 7. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE ESPÉCIMES

São necessários cinquenta (50) microlitros de soro ou plasma (EDTA ou Heparina) para a extracção de 25-OH-D; um volume de 150 microlitros permitirá repetir a análise e fornecerá igualmente um volume adequado de pipetagem.

Pode-se usar tanto soro humano como plasma neste kit. Os anticoagulantes EDTA ou heparina podem ser usados com este ensaio. Recomenda-se o uso de um espécime em jejum, mas não é necessário. O sangue deve ser recolhido assepticamente por venipunctura num tubo de vidro vazio de 5 ou 10 mL. Deixe o sangue coagular à temperatura ambiente (15-25°C), Centrifugue durante 15 minutos usando aproximadamente  $760 \times g^*$  para obter soro sem hemólise. Não são necessários aditivos ou preservativos para manter a integridade da amostra. Qualquer plástico, vidro ou outro material que entrar em contacto com o espécime deve estar completamente descontaminado. Armazene as amostras de soro ou plasma a uma temperatura de -20°C ou inferior. Os espécimes podem ser armazenados em frascos de vidro ou de plástico, desde que os frascos sejam hermeticamente fechados para impedir a dissecação da amostra.

Um estudo realizado pela DiaSorin num número limitado de amostras de pacientes mostrou que as amostras estiveram estáveis até um máximo de 9 semanas quando armazenadas a -20°C. Não foi observada nenhuma mudança significativa nos valores após 3 ciclos de congelação-descongelação das amostras. Devem-se evitar ciclos repetidos de congelação-descongelação. Os espécimes transportados devem geralmente chegar congelados.

## 8. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

- Tubos de vidro descartáveis de borossilicato, 12 x 75 mm.  
**NOTA:** Os tubos de plástico não são adequados para usar com este kit.
- Centrífuga controlada por temperatura para acomodar tubos de 12 x 75 mm.
- Contador gama capaz de contar iodo-125.
- Misturador de vórtice.
- Dispositivos para pipetar.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raggio in cm}) (\text{rpm})^2$$

- a. Micropipetadores calibrados para administrar 25 µL e 50 µL (imprecisão menor que ou igual a ± 1%),
- b. distribuidores de repetição com pontas calibradas para administrar 50 µL, 500 µL e 1.0 mL (imprecisão menor que ou igual a ± 1%),

**NOTA:** Para os procedimentos de extracção e de ensaio descritos abaixo, consulte "Equipamentos e Materiais Necessários Não Fornecidos" para as especificações da pipeta,

## 9. PROCEDIMENTO DE EXTRACÇÃO

- 9.1 Prepare tubos de vidro descartáveis rotulados de 12 x 75 mm para cada calibrador, amostra de paciente e controlo.
- 9.2 Adicione 500 µL de acetoneitrilo a cada tubo.
- 9.3 Coloque a ponta da pipeta contendo 50 µL de calibrador, amostra de paciente ou de controlo abaixo da superfície do acetoneitrilo e adicione LENTAMENTE ao acetoneitrilo.
- 9.4 Misture durante 10 segundos.
- 9.5 Centrifugue usando 1200 x g\* durante 10 minutos a 20-25°C.
- 9.6 Pipete alíquotas duplicadas de 25 µL do sobrenadante em tubos separados de 12 x 75 mm devidamente rotulados, **CUIDADO:** Tome as devidas precauções para não perturbar os grânulos.
- 9.7 Analise os sobrenadantes de acordo com o procedimento do ensaio.

## 10. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

- 10.1 Permita que todos os reagentes e amostras se equilibrem até à temperatura ambiente, Não deixe os reagentes atingir temperaturas acima de 25°C.
- 10.2 Prepare tubos de vidro descartáveis de 12 x 75 mm duplamente rotulados de acordo com o Esquema do Ensaio na última página.
- 10.3 Adicione reagentes da seguinte forma:
  - a. **Total de tubos de contagem**  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL de Tampão NSB/solução tampão
  - b. **Tubos de ligação não específica (NSB)**  
25 µL de 0 calibrador (extraído)  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL de Tampão NSB/solução tampão
  - c. **Calibradores, controlos, e amostras desconhecidas**  
25 µL de calibrador, controlo ou amostra desconhecida (extraído)  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL de anti-soro 25-OH-D
- 10.4 Misture com cuidado sem fazer espuma e incube durante 90 (+/- 10) minutos a 20-25°C.
- 10.5 Adicione 500 µL de complexo precipitante DAG (o complexo precipitante DAG deve ser bem misturado antes e durante o uso) a todos os tubos excepto os tubos de contagem total.
- 10.6 Misture bem os tubos e incube durante 20-25 minutos a 20-25°C.

$$*g = (1118 \times 10^{-3}) (\text{raio em cm}) (\text{rpm})^2$$



- 10.7 Adicione 500 uL de tampão NSB/solução tampão a todos os tubos excepto os tubos de contagem total, Agite com cuidado para misturar bem os tubos, Tenha cuidado ao efectuar este passo para evitar derramamentos devido ao grande volume de líquido no tubo.
- 10.8 Centrifugue todos os tubos durante 20 minutos a 20-25°C a 1800 x g\*, excepto os de contagem total.
- 10.9 Decante os sobrenadantes, excepto os tubos de contagem total, usando um suporte para tubos em espuma ou equivalente e invertendo o suporte num dispositivo adequado de eliminação, Coloque o suporte invertido em papel absorvente durante 2-3 minutos, Seque com cuidado os tubos para assegurar a remoção da totalidade do líquido.
- 10.10 Num contador de cintilação gama, conte cada tubo pelo menos durante 1 minuto, Cada tubo deve ser contado por tempo suficiente para atingir precisão estatística, (consulte a secção de resultados: Limitação do Procedimento.)

## 11. COMENTÁRIOS SOBRE O PROCEDIMENTO

- 11.1 Adicione cada alíquota de reagente ao terço inferior do tubo de ensaio para garantir a mistura completa dos reagentes.
- 11.2 Para monitorizar completamente o desempenho consistente de um ensaio RIA, há factores adicionais que devem ser verificados, A DiaSorin sugere a verificação regular dos parâmetros seguintes para assegurar o desempenho consistente do kit.
  - a. **Contagens totais**
  - b. **Ligação máxima**  
Média de contagens por minuto (CPM) de 0 Tubo calibrador/CPM média do Total de tubos de contagem.
  - c. **Ligação não específica**  
CPM médio de Tubo NSB/CPM Médio do total dos tubos de contagem.
  - d. **Inclinação da curva do calibrador**  
Por exemplo, monitorize os pontos 80 e 50% da linha do calibrador.

## 12. CONTROLO DE QUALIDADE

Cada laboratório deve incluir pelo menos dois controlos (um no nível baixo-normal e um no nível alto-normal) em cada ensaio para monitorizar o desempenho do ensaio, Podem ser utilizados controlos disponíveis comercialmente ou os dois controlos fornecidos com o kit, Os controlos do kit foram avaliados pela DiaSorin usando DiaSorin 25-Hidroxivitamina D <sup>125</sup>I RIA kit. O intervalo das concentrações para cada controlo está imprimido no certificado de análise e indica os limites definidos pela DiaSorin para os valores dos controlos obtidos com ensaios fiáveis.

Os controlos devem ser tratados como se fossem espécimes desconhecidos e testados duas vezes, Devem-se manter tabelas de controlo de qualidade para acompanhar o desempenho do controlo, Os limites aceitáveis de desempenho devem ser determinados por cada laboratório para cada nível de controlo usando métodos de base estatística concebidos para detectar tanto erros sistemáticos como erros aleatórios, Os resultados do controlo devem estar de acordo com os critérios do laboratório de aceitabilidade antes de relatar resultados de testes pacientes.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. CÁLCULO DE RESULTADOS

Existem vários métodos para calcular resultados de RIAs, Cada um baseia-se em obter uma curva de calibragem determinando a extensão da ligação em relação às concentrações declaradas dos calibradores, Este gráfico pode ser em escala linear ou logarítmica, Cada um destes métodos apresenta essencialmente os mesmos resultados para controlos e amostras, embora certos ensaios possam “encaixar-se” melhor num método em particular relativamente a outro, O método de cálculo para o Laboratório de Controlo de Qualidade DiaSorin é % B/B<sub>0</sub> versus a concentração do registo.

- 13.1** Calcule o CPM médio para cada calibrador, controlo e amostra desconhecida.  
**13.2** Subtraia o CPM médio dos tubos NSB de todas as contagens.  
**13.3** Divida o CPM corrigido de cada calibrador, controlo ou amostra desconhecida pelo CPM corrigido do calibrador 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM do calibrador de amostra desconhecida} - \text{CPM de NSB}}{\text{CPM do calibrador 0} - \text{CPM de NSB}} \times 100$$

- 13.4** Usando 2 papéis de gráfico ciclo semi-log ou log-logit, determine a percentagem B/B<sub>0</sub> para calibradores 25-OH-D (eixo vertical) versus a concentração (eixo horizontal).  
**13.5** Desenhe uma linha de melhor ajuste através dos pontos.  
**13.6** Interpole os níveis de 25-OH-D nas amostras desconhecidas a partir do gráfico.  
**13.7** Se uma amostra desconhecida tiver sido diluída, corrija para o factor de diluição apropriado.  
**13.8** Calcule a ligação máxima dividindo o CPM do calibrador 0 pela média de contagens totais obtida nos tubos de contagem total.  
**13.9** É possível utilizar programas automatizados de redução de dados para analisar os dados, A DiaSorin utiliza RIACalc (Pharmacia) com %B/B<sub>0</sub> versus concentração do log, programa de SPLINE-suave ajustada, Os outros métodos de redução de dados devem ser validados antes de serem incorporados para uso regular.

**TABELA I**

Dados de amostra DiaSorin 25-OH-D Vitamina D RIA

| Tubo                   | CPM Duplicado                    | CPM Médio | CPM Corrigido | Percentagem Ligação (B/T) | Percentagem (B/B <sub>0</sub> ) | Gráf. Conc. (ng/mL) |
|------------------------|----------------------------------|-----------|---------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------|
| Contagem Total         | 41878<br>39924                   | 40901     |               |                           |                                 |                     |
| NSB                    | 555<br>508                       | 531       |               | 1.3                       |                                 |                     |
| Calibrador 0           | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822     | 19291         | 48.5                      |                                 |                     |
| Calibradores           |                                  |           |               |                           |                                 |                     |
| 1                      | 14503<br>14442                   | 14472     | 13941         |                           | 72.3                            | 5                   |
| 2                      | 11005<br>10670                   | 10838     | 10307         |                           | 53.4                            | 12                  |
| 3                      | 7182<br>7642                     | 7411      | 6880          |                           | 35.7                            | 20                  |
| 4                      | 4687<br>4622                     | 4654      | 4123          |                           | 21.4                            | 40                  |
| 5                      | 2768<br>2985                     | 2877      | 2346          |                           | 12.2                            | 100                 |
| Amostras desconhecidas |                                  |           |               |                           |                                 |                     |
| 1                      | 10365<br>10447                   | 10406     |               |                           | 53.9                            | 12.8                |
| 2                      | 4219<br>4720                     | 4634      |               |                           | 24.0                            | 40.4                |

A TABELA 1 e a FIGURA 1 apresentam os dados típicos de calibragem e uma curva de calibrador; estas informações são apenas para referência e não devem ser usadas para o cálculo de nenhum valor.

**25-HIDROXYVITAMINA D  
CURVA DO CALIBRADOR DE AMOSTRA**

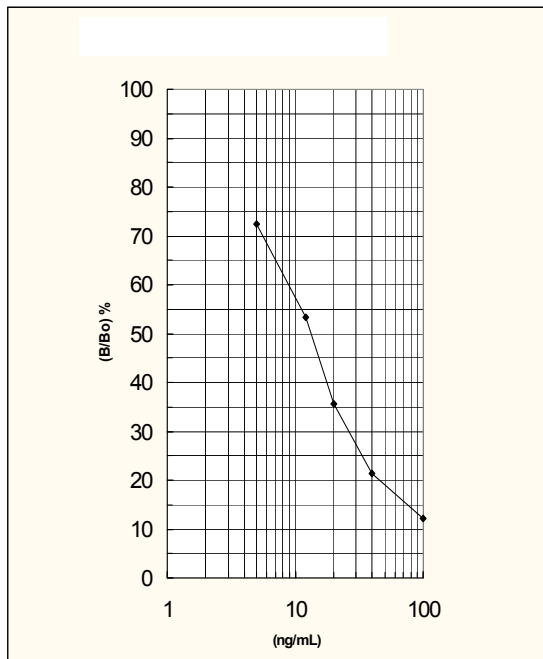


Figura 1

**14. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO**

- 14.1 Devem ser feitas contagens suficientes para evitar erros estatísticos (por exemplo, a acumulação de 2,000 CPM levará a um erro de 5%; 10,000 CPM levará a um erro de 1%).
- 14.2 Os resultados do ensaio devem ser usados em conjunto com outros dados clínicos e laboratoriais para ajudar o clínico a tomar decisões individualizadas de gestão do paciente.
- 14.3 Os efeitos devido a hemólise ou lipemia presentes nas amostras do paciente não foram avaliados neste ensaio; no entanto, espera-se que a extração do acetonitrilo minimize qualquer interferência provocada por estas substâncias.
- 14.4 A maior fonte de imprecisão neste método deve ser o passo de extração. Outras fontes de imprecisão processual podem ser micropipetadores imprecisos ou reagentes fora do prazo.
- 14.5 O kit anticorpo demonstrará certa reactividade cruzada com todas as formas de dihidroxivitamina D2 e esteróides D3; no entanto, em humanos, estes compostos estão naturalmente presentes em concentrações picomolares.

**NOTA:** As características de desempenho deste ensaio não foram estabelecidas numa população pediátrica.

## 15. VALORES ESPERADOS

### INTERVALO DE REFERÊNCIA

É importante para cada laboratório estabelecer o seu próprio intervalo de referência representativo da sua população típica. Sabe-se que factores como a exposição UV<sup>9,10</sup> a estação do ano,<sup>11,12</sup> a raça,<sup>7</sup> e a dieta<sup>8</sup> afectam os níveis de 25-OH-D nos humanos. Ficou demonstrada na literatura uma diminuição nos níveis de vitamina D com a idade; no entanto, as pesquisas para a maioria destes estudos foram conduzidas nos países do norte da Europa, onde há menos luz do sol e há uma fortificação de alimentos menos difundida.<sup>8,15,16</sup> Isto, aliado às diferenças altamente variáveis nos critérios de saúde e estado de medicação, torna difícil generalizar o efeito da idade apenas no estado da vitamina D.<sup>12</sup> Resultados de alguns estudos realizados nos E,U,A, levaram a resultados obscuros, alguns mostrando a ocorrência e outros a ausência de diminuição do estado da vitamina D com a idade. Os anticonvulsivos mostraram causar uma diminuição nos níveis de 25-OH-D assim como o uso a longo prazo de protetor solar com ácido p-aminobenzóico.<sup>17</sup> Não foi estabelecido um intervalo de referência pediátrico para o DiaSorin usando este kit.

A DiaSorin avaliou soro recolhido a 20 homens e 24 mulheres, aparentemente saudáveis, predominantemente voluntários caucasianos do centro-oeste americano usando o kit DiaSorin 25-Hidroxitamina D<sup>125I</sup> RIA. A idade dos voluntários estava no intervalo dos 23 - 67 anos. As amostras foram recolhidas durante o mês de Outubro. Só se verificou uma pequena diferença nos níveis de 25-OH-D entre homens (média = 21.7 ng/mL) e mulheres (média = 24.1 ng/mL) neste grupo de referência. A média de toda a população (n = 44) foi 23.0 ng/mL com uma faixa de 2 S.D, 9,0 – 37.6 ng/mL.

Uma alta prevalência da carência subclínica de vitamina D 25-OH entre populações aparentemente sãs foi observada em muitos países, especialmente nos meses do Inverno.<sup>13,14</sup> A bibliografia recente sugeriu os seguintes intervalos para a classificação do status da vitamina D 25-OH: carência: 0 a 5 ng/mL (0 – 12.5 nmol/L); insuficiência: 5 a 20 ng/mL (12.5 - 50 nmol/L); hipovitaminose D: 20 a 40 ng/mL (50 - 100 nmol/L); quantidade suficiente: 40 a 100 ng/mL (100 - 250 nmol/L); e toxicidade: mais de 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

### 16.1 Precisão

A precisão do ensaio foi avaliada pela DiaSorin testando quatro níveis de controlo na curva durante 23 dias de funcionamento em 40 ensaios. Cada ensaio incluiu os quatro controlos x 2 extracções (4 réplicas). O projecto do estudo foi consistente com as directivas EP5-T2 do documento CLSI.<sup>22</sup> Os cálculos de dados foram feitos usando SAS PROC VARCOMP. O modelo estatístico ajustado é um modelo linear de efeitos aleatórios.<sup>23</sup>

| Média (ng/mL) | Ensaio (% C.V.) | Imprecisão Total (% C.V.) |
|---------------|-----------------|---------------------------|
| 8.6           | 11.7            | 9.4                       |
| 22.7          | 10.5            | 8.2                       |
| 33.0          | 8.6             | 9.1                       |
| 49.0          | 12.5            | 11.0                      |

### 16.2 Precisão

A precisão do ensaio foi verificada pela diluição e através do teste de recuperação.

Linearidade (Paralelismo)

Estudo em série da diluição de 4 amostras de paciente (valores = ng/mL)

| Amostra | Não diluído | 1/2  | 1/4  |
|---------|-------------|------|------|
| 1       | 74.6        | 79.4 | 74.8 |
| 2       | 87.8        | 96.4 | 95.2 |
| 3       | 85.6        | 88.2 | 82.4 |
| 4       | 55.2        | 57.8 | 60.4 |

### Recuperação

Quantidades conhecidas de 25-OH-D<sub>3</sub> foram adicionadas a amostras de soro de pacientes e a percentagem de recuperação foi determinada.

| Amostra Número | Conc. Inicial (ng/mL) | Quantidade fixada (ng/mL) | *Conc. esperada (ng/mL) | Conc. medida (ng/mL) | Recuperação |
|----------------|-----------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|-------------|
| 1              | 15.8                  | 5.0                       | 25.5                    | 24.8                 | 97%         |
|                |                       | 10.0                      | 35.1                    | 41.8                 | 119%        |
|                |                       | 25.0                      | 62.7                    | 61.9                 | 99%         |
| 2              | 51.2                  | 5.0                       | 60.6                    | 62.0                 | 102%        |
|                |                       | 10.0                      | 69.8                    | 73.8                 | 106%        |
|                |                       | 25.0                      | 96.4                    | 99.4                 | 103%        |
| 3              | 26.6                  | 5.0                       | 36.2                    | 33.5                 | 92%         |
|                |                       | 10.0                      | 45.7                    | 54.0                 | 118%        |
|                |                       | 25.0                      | 73.0                    | 82.8                 | 113%        |
| 4              | 57.3                  | 5.0                       | 66.6                    | 63.8                 | 96%         |
|                |                       | 10.0                      | 75.8                    | 78.1                 | 103%        |
|                |                       | 25.0                      | 102**                   | 104**                | 102%        |
| 5              | 41.3                  | 5.0                       | 50.8                    | 48.5                 | 95%         |
|                |                       | 10.0                      | 60.1                    | 56.1                 | 93%         |
|                |                       | 25.0                      | 87.0                    | 93.2                 | 107%        |

\* O cálculo de concentração de 25-OH-D esperada inclui o factor de diluição introduzido pela solução de fixação.

\*\* Estes valores são extrapolados. a concentração medida é de > 100 ng/mL (calibrador superior).

### 16.3 Sensibilidade Analítica (Limites de detecção)

A sensibilidade deste ensaio, quando definida como a menor quantidade diferenciada de zero a dois desvios padrão abaixo do cpm médio do calibrador zero (n = 20), mostrou-se igual ou abaixo de 1.5 ng/mL. Este nível de sensibilidade aplica-se tanto ao uso do calibrador "1" como ao calibrador "Opcional".

### 16.4 Especificidade Analítica

Os dados sobre a reactividade cruzada do anti-soro usado neste kit são expressos como a razão da concentração de 25-OH-D para a concentração de substância reagente cruzada a 50% de inibição de ligação máxima.

| Esteróide      | % Reactividade cruzada |
|----------------|------------------------|
| Vitamina D2    | 0.8                    |
| Vitamina D3    | 0.8                    |
| 25-OH-D2       | 100                    |
| 25-OH-D3       | 100                    |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                    |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                    |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                    |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                    |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11.0                   |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11.0                   |

**CONSULTE A ÚLTIMA PÁGINA PARA OBTER REFERÊNCIAS**

## ESQUEMA DO ENSAIO

1. Extraia as amostras: Deite 500 uL de acetonitrilo num tubo de vidro e adicione lentamente 50 uL de calibrador, controlo ou amostra de paciente abaixo da superfície do acetonitrilo. Misture durante 10 segundos e centrifugue usando  $1200 \times g^*$  durante 10 minutos a 20-25°C.
2. Deite os reagentes de acordo com o seguinte esquema:

| Tubos/Reagentes                  | Contagens totais | NSB    | Cal 0-6 | Controlos e amostras desconhecidas |
|----------------------------------|------------------|--------|---------|------------------------------------|
| 0 Calibradores extraídos         | -                | 25 µL  | -       | -                                  |
| Calibradores extraídos           | -                | -      | 25 uL   | -                                  |
| Controlos extraídos              | -                | -      | -       | 25 uL                              |
| Amostras desconhecidas extraídas | -                | -      | -       | 25 uL                              |
| Traçador                         | 50 uL            | 50 uL  | 50 uL   | 50 uL                              |
| NSB/solução tampão               | 1.0 mL           | 1.0 mL | -       | -                                  |
| Anti-soro 25-OH-D                | -                | -      | 1.0 mL  | 1.0 mL                             |

3. Misture bem; incube durante 90 minutos (+/- 10 minutos) a 20-25°C.
4. Deite 500 uL de complexo precipitante DAG em todos os poços, excepto os tubos de contagem total.
5. Misture bem; incube durante 20-25 minutos a 20-25°C.
6. Deite 500 uL de NSB/solução tampão em todos os poços, excepto os tubos de contagem total.
7. Centrifugue usando  $1800 \times g^*$  durante 20 minutos.
8. Decante os sobrenadantes.
9. Conte cada tubo num contador gama durante 60 segundos ou mais.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raio em cm}) (\text{rpm})^2$$

## 25-HYDROXYVITAMIN D <sup>125</sup>I RIA KIT

### 1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK *IN VITRO*.

Satsen är avsedd för kvantitativ bestämning av 25-hydroxy-D-vitamin (25-OH-D) och andra hydroxylerade D-vitaminmetaboliter i humant serum eller plasma och ska användas för att bedöma eventuell D-vitaminbrist. Resultaten från testet ska användas i kombination med övriga kliniska data och laboratoriedata för att underlätta för läkaren att fatta beslut om enskilda patienters behandling i en vuxen patientpopulation.

### 2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

När kalciferol (D-vitamin) kommer in i cirkulationen metaboliseras det till flera former. Den dominerande bland dessa är 25-hydroxycalciferol (25-OH-D). Det första steget i metaboliseringen av D-vitamin, 25-hydroxyleringen, sker huvudsakligen i levern.<sup>1</sup> Hos människa metaboliseras endast en liten mängd 25-OH-D i njuren till andra metaboliter av typen dihydroxy-D-vitamin.<sup>2,3</sup> Eftersom 25-OH-D är den dominerande cirkulerande formen av D-vitamin hos normalpopulationen, anses den vara den mest tillförlitliga indikatorn på D-vitaminstatus.<sup>4</sup>

De två huvudsakliga formerna av 25-OH-D är kolekalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) och ergokalciferol (vitamin D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> Vitamin D<sub>3</sub> bildas främst genom att ultraviolett ljus påverkar huden, medan D<sub>2</sub> däremot endast kommer från födan. Eftersom dessa båda modersubstanser ingår i skilda proportioner i individens totala D-vitaminstatus, är det viktigt att båda formerna mäts på ett likvärdigt sätt.<sup>6,7</sup> Det finns en stor mängd forskningsresultat som ger information om halterna av cirkulerande 25-OH-D-metaboliter och deras fysiologiska betydelse.

Mätning av 25-OH-D får allt större betydelse för bedömning och uppföljning av patienter med olika störningar i kalciummetabolismen vid rakit, neonatal hypokalcemi, graviditet, nutritionell och renal osteodystrofi, hypoparathyroidism och postmenopausal osteoporos.<sup>8-10</sup> OBS! Prestanda för DiaSorin 25-OH-D-testet har inte kontrollerats i en pediatrik population.

### 3. ANALYSPRINCIP

DiaSorin 25-OH-D-testet består av två steg. I det första steget gör man en snabb extraktion av 25-OH-D och andra hydroxylerade metaboliter från serum eller plasma med hjälp av acetonitril. Efter extraktionen testas det behandlade provet med hjälp av jämvikts-RIA. RIA-metoden är baserad på en specifik antikropp mot 25-OH-D. Provet, antikroppen och spårämnet inkuberas i 90 minuter vid 20-25°C. Därefter åstadkommer man en fassetparation genom att inkubera 20 minuter vid 20-25°C i närvaro av ett utfällningskomplex med en sekundär antikropp. Efter inkuberingen tillsätter man före centrifugering en NSB/tillsatsbuffert som bidrar till att reducera den ospecifika bindningen.

### 4. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| 25-OH-D kalibreringslösningar  | 6 flaskor/1 mL  |
| 25-OH-D NSB/tillsatsbuffert    | 1 flaska/70 mL  |
| 25-OH-D antiserum              | 1 flaska/105 mL |
| 25-OH-D spårämne               | 1 flaska/6 mL   |
| 25-OH-D DAG utfällningskomplex | 2 flaskor/30 mL |
| 25-OH-D kontroller             | 2 flaskor/1 mL  |
| 25-OH-D acetonitril            | 2 flaskor/15 mL |
| Antal test                     | 100             |

FÖRVARING: Öppnad förpackning förvaras vid 2-8°C. När förpackningen öppnats förvaras varje reagens vid 2-8°C till det utgångsdatum som anges på etiketten. Reagensen får ej användas efter utgångsdatum. Utgångsdatum för satsen anges på etiketten på ytterförpackningen och motsvarar utgångsdatum för spårämnet.

Reagens från skilda batcher får ej blandas.

**4.1 25-OH-D NSB/tillsatsbuffert:** reagens färdigt för användning

Fosfat-gelatinbuffert med 0.1 % natriumazid. Denna komponent har en dubbel funktion; den fungerar både som NSB-buffert (non-specific binding; ospecifik bindning) och som tillsatsbuffert.

**4.2 25-OH-D<sub>3</sub> kalibreringslösningar:** reagens färdiga för användning

Sex (25-OH-D<sub>3</sub>) kalibreringslösningar med halter i området 0-100 ng/mL, färdigspädda i humant serum innehållande 0.1 % natriumazid. Hantera dessa reagens försiktigt (se Varningar och försiktighetsåtgärder). Kalibreringslösningarna i satsen har kalibrerats genom UV-mätning och verifierats genom HPLC-analys. Kalibreringslösningarna i satsen kan betraktas som likvärdiga med patientprover, när de används med de reagens och metodanvisningar som rekommenderas för detta diagnostiska in vitro-test.

**OBS!** Vid behov kan man skapa en "extra" kalibreringslösning (2.5 ng/mL) genom att späda kalibreringslösning "1" 1:2 med kalibreringslösningen noll (d.v.s. 100 µL "1" + 100 µL "0"). Denna spädning ska utföras före extraktion och lösningen ska därefter extraheras i enlighet med bipacksedeln till produkten.

**4.3 25-OH-D antiserum:** reagens färdigt för användning.

Anti-25-OH-D-serum från get, spätt i fosfat-gelatinbuffert med 0.1 % natriumazid.

**4.4 25-OH-D<sub>3</sub> spårämne:** reagens färdigt för användning.

En joderad [<sup>125</sup>I] analog till 25-OH-D<sub>3</sub> spädd i en etanol-fosfatbuffert. Hantera reagenset försiktigt (se Varningar och försiktighetsåtgärder).

**4.5 Fällningskomplex av typen anti-getserum från åsna (Donkey Anti-Goat; DAG):** reagens färdigt för användning.

Anti-getserum från åsna, normalt getserum och polyetylenglykol är spädda i en BSA-boratbuffert med gentamycinsulfat och 0.1 % natriumazid. Blanda reagenset i 5-10 minuter före och under användning, så att en homogen suspension med säkerhet bildas.

**4.6 25-OH-D kontroller:** reagens färdiga för användning.

Humant serum med 0.1 % natriumazid och med tillsats av korrekt mängd 25-OH-D<sub>3</sub> för att erhålla kontrollhalter inom de angivna områdena. Blanda noggrant och behandla dem på samma sätt som okända prov. Kontroll 1 motsvarar en låg-normal halt, medan kontroll 2 motsvarar en hög-normal halt. Referensområdet avseende resp kontrollers koncentration visas på analyscertifikatet och visar de gränser som fastställts av DiaSorin för de kontrollvärden som erhållits med tillförlitliga test. Hantera dessa reagens försiktigt (se Varningar och försiktighetsåtgärder).

**4.7 Acetonitril:** reagens färdigt för användning.

Acetonitril, av lämplig kvalitet för denna sats. Hantera reagenset försiktigt (se Varningar och försiktighetsåtgärder). Denna produkt innehåller torrt naturgummi.

## 5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

Ej avsett för vare sig invärtes eller utvärtes bruk på människor eller djur.

**FÖRSIKTIGT!** Denna produkt får endast tas emot, förvärfas, ägas och användas av läkare, kliniska laboratorier, sjukhus, veterinärer och forskningsinstitutioner. Analyserna ska utföras av laboratoriepersonal med adekvat utbildning och praktisk erfarenhet.

### REAGENS SOM INNEHÅLLER MATERIAL AV HUMANT URSPRUNG

#### Behandlas som potentiellt smittfarligt.

Varje donerad enhet serum/plasma som använts för beredning av produkten har testats med en metod godkänd av USA:s läkemedelsverk (FDA) och befunnits negativ vad gäller förekomst av HBsAg, antikroppar mot HCV och antikroppar mot HIV 1/2. Även om dessa metoder är mycket tillförlitliga, utgör de ingen garanti för att samtliga infekterade enheter upptäcks. Produkten kan även innehålla annat material av humant ursprung för vilket det inte finns något godkänt test. Eftersom ingen känd testmetod kan ge en fullständig garanti för att det inte förekommer hepatit-B-virus (HBV), hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agens, ska alla produkter som innehåller material av humant ursprung hanteras i enlighet med god laboratoriepraxis och med lämpliga försiktighetsåtgärder enligt handboken "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" från U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, 4:e upplagan, maj 1999, eller aktuell upplaga.



#### **REAGENS SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID**

**FÖRSIKTIGT!** Vissa reagens i satsen innehåller natriumazid. Natriumazid kan reagera med bly och koppar i avloppsledningarna så att det bildas explosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man spola efter med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC). För ytterligare information hänvisar vi till avsnittet "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" i handboken Safety Management No. CDC-22 utgiven av Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta. USA 1976.

#### **Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 1999/45/EC)**

R 20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.

R 32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

S28 - Vid kontakt med huden tvätta genast med mycket vatten.

#### **REAGENS SOM INNEHÅLLER ACETONITRIL**

#### **Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 88/379/EEC)**

R11 - Mycket brandfarligt.

R23/24/25 - Giftigt vid inandning, hudkontakt och förtäring.

S16 - Förvaras åtskilt från antändningskällor - Rökning förbjuden.

S36 - Använd lämpliga skyddskläder.

S43 - Vid brandsläckning använd pulver eller koldioxid.

S45 - Vid olycksfall, illamående eller annan påverkan, kontakta omedelbart läkare.

S51 - Sörj för god ventilation.

#### **REAGENS SOM INNEHÅLLER ETANOL**

#### **VARNING - BRANDFARLIGT**

#### **Europeiska Gemenskapens Riskfraser för farliga preparat (EU-kommissionens direktiv 88/379/EEC)**

R11 - Mycket brandfarligt.

S16 - Förvaras åtskilt från antändningskällor - Rökning förbjuden.

S43 - Vid brandsläckning använd pulver eller koldioxid.

#### **REAGENS SOM INNEHÅLLER JOD-125**

Satsen innehåller radioaktivt material som ej överstiger 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) jod-125. Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en allmän licens:

Detta radioaktiva material får endast tas emot, förvärvas, ägas och användas av läkare, veterinärer med praktik inom veterinärmedicin, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester in vitro eller laboratorietester in vitro, vilka ej innebär någon invärtes eller utvärtes administrering av materialet, eller av strålning från det, till människor eller djur. För mottagande, förvärv, innehav, användning och överlåtelse gäller de regler och den allmänna licens som utfärdats av den amerikanska Nuclear Regulatory Commission eller av den stat med vilken kommissionen har ingått ett avtal för utövande av regulatorisk myndighet.

1. Radioaktivt material får endast förvaras på en speciellt avsedd plats.
2. Endast auktoriserad personal får ha tillgång till radioaktivt material.
3. Pipettera aldrig radioaktivt material med munnen.
4. Undvik att äta eller dricka i lokaler där radioaktivt material används.
5. Ytor där spill kan förekomma skall torkas av och därefter rengöras med ett alkaliskt rengöringsmedel eller radiologisk dekontamineringslösning. Alla glasvaror som används måste sköljas noga med vatten innan de diskas tillsammans med andra glasvaror för laboratoriebruk.

För mottagningar och institutioner som tar emot radioisotoper under en specifik licens:

När ni tar emot, använder, överlåter och kasserar radioaktivt material gäller reglerna och villkoren i er specifika licens.

**VARNING!** Produkten innehåller en kemikalie som enligt staten Kalifornien är känd för att orsaka cancer.

**OBSERVERA!** Den radioaktivitet som anges på bipacksedeln kan skilja sig något från den aktivitet som anges på etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet. Etiketterna på kartongen och på flaskan med spårämnet anger den verkliga radioaktivitetsmängden vid kalibreringsdatum, medan bipacksedeln anger den teoretiska radioaktiviteten för satsen.

## 6. TECKEN SOM KAN TYDA PÅ EN KVALITETSFÖRSÄMRING HOS REAGENSEN I SATSEN

- 6.1 Förekomst av onormalt partikelformigt material i något av reagensen (NSB-buffert, antiserum och DAG fällningsreagens kan normalt vara grumliga.)
- 6.2 En förändring av kalibreringskurvans läge eller lutning jämfört med vad som normalt erhålles.
- 6.3 En sänkning av maximal bindning.
- 6.4 En hög ospecifik bindning

## 7. PROVTAGNING OCH PROVHANTERING

Det behövs femtio (50) mikroliter serum eller plasma (EDTA- eller heparin-) för 25-OH-D-extraktionen; med en volym på 150 mikroliter kan man upprepa analysen samtidigt som man får marginal för pipetteringen.

Satsen kan användas både med humant serum och human plasma. Antikoagulanterna EDTA eller heparin kan användas med denna testsats. Fasteprov rekommenderas men är ej ett krav. Blodprovet bör tas med aseptisk teknik genom venpunktion med ett 5 eller 10 mL rör av vacutainertyp. Låt blodet koagulera i rumstemperatur (15-25°C). Centrifugera i 15 minuter vid cirka 760 x g\* så att hemolysfria serumprover erhålles. Inga tillsatser eller konserveringsmedel behövs för att bibehålla intakta prov. Alla plastartiklar, glasvaror och annan materiel som kommer i kontakt med provet måste vara fullkomligt fria från kontaminerande material. Serum- eller plasmaprover kan lagras vid -20°C eller lägre. Proven kan förvaras i glas- eller plaströr, förutsatt att de är lufttätt förslutna så att vatten inte avdunstar.

I en studie som DiaSorin utfört på ett begränsat antal patientprov visade sig proven vara stabila i upp till 9 veckor när de förvarades vid -20°C. Ingen signifikant förändring av värdena sågs efter det att proven genomgått 3 cykler med frysning-upptining. Upprepade frysnings-upptiningscykler bör undvikas. Prov som måste transporteras bör i allmänhet vara frysta.

## 8. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL

- Engångs borosilikatrör. 12 x 75 mm.  
**OBS!** Plaströr är ej lämpliga för detta test.
- Temperaturreglerad centrifug som passar för 12 x 75 mm-rör.
- Gammaräknare som kan räkna jod-125.
- Vortex-blandare.
- Pipetteringshjälpmedel
  - a. Mikropipetter kalibrerade för 25 µL och 50 µL (med ett precisionsfel som är mindre än eller lika med ± 1 %).
  - b. Repeterande dispensrar med spetsar som är kalibrerade för 50 µL, 500 µL och 1.0 mL (med ett precisionsfel som är mindre än eller lika med ± 1 %).

**OBS!** I fråga om extraktions- och testningsprocedurerna nedan hänvisar vi till "Ej tillhandahållen men nödvändig utrustning och materiel" för pipettspecifikationer.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raio em cm}) (\text{rpm})^2$$

## 9. EXTRAKTIONSPROCEDUR

- 9.1 Gör iordning märkta 12 x 75 mm glasrör av engångstyp för varje kalibrator, kontroll och patientprov.
- 9.2 Pipettera 500 µL acetonitril i varje rör.
- 9.3 Placera en pipettspets med 50 µL kalibreringslösning, kontroll eller patientprov under ytan på acetonitrilen och tillsätt detta LÅNGSAMT till acetonitrilen.
- 9.4 Vortexa i 10 sekunder.
- 9.5 Centrifugera vid 1200 x g\* i 10 minuter vid 20-25°C.
- 9.6 Pipettera dubblettprov à 25 µL från supernatanten till två olika, på lämpligt sätt märkta 12 x 75 mm-rör. **FÖRSIKTIGT!** Var noga med att inte röra upp pelleten.
- 9.7 Testa supernatanterna enligt testproceduren.

## 10. TESTPROCEDUR

- 10.1 Låt alla reagens och prov anta rumstemperatur. Se till att reagensen ej blir varmare än 25°C.
- 10.2 Ställ i ordning märkta 12 x 75 mm engångsglasrör för dubbelprov enligt Lathund för testet på sista sidan.
- 10.3 Tillsätt reagens enligt följande:
  - a. **Rör för total aktivitet**  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL NSB/tillsatsbuffert
  - b. **Rör för ospecifik bindning (NSB)**  
25 µL 0-kalibrering (extraherad)  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL NSB/tillsatsbuffert
  - c. **Kalibreringslösningar, kontroller och okända prov**  
25 µL kalibreringslösning, kontroll eller okänt prov (extraherade)  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL 25-OH-D antiserum
- 10.4 Vortexa försiktigt utan att det bildas skum och inkubera i 90 (+/- 10) minuter vid 20-25°C.
- 10.5 Tillsätt 500 µL DAG utfällningskomplex (utfällningskomplexet måste blandas noga före och under användning) till samtliga rör utom totalaktivitetsrören.
- 10.6 Blanda väl och inkubera rören i 20-25 minuter vid 20-25°C.
- 10.7 Tillsätt 500 µL NSB/tillsatsbuffert till alla rör utom totalaktivitetsrören. Vortexa rören försiktigt så att innehållet blandas väl. Var försiktig vid detta steg, eftersom vätskan står högt i rören och skulle kunna stänka ut.
- 10.8 Centrifugera samtliga rör utom totalaktivitetsrören i 20 minuter vid 20-25°C och 1800 x g\*.
- 10.9 Håll av supernatanterna, utom från totalaktivitetsrören. Använd ett provrörsställ av frigolit eller dylikt och vänd stället upp och ner över ett lämpligt avfallskärl. Ställ det upp-och-ner-vända stället på absorberande papper i 2-3 minuter. Tryck försiktigt ett filterpapper mot mynningen på rören så att all vätska säkert suggs upp.
- 10.10 Räkna varje rör minst 1 minut i en gammascintillationsräknare. Varje rör ska räknas under tillräckligt lång tid för att man ska erhålla statistiskt säkra resultat. (Se avsnittet om resultat under Metodbegränsningar.)

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radie i cm}) (\text{rpm})^2$$

## 11. KOMMENTARER TILL PROCEDURERNA

- 11.1 Tillsätt alla reagens till den nedersta tredjedelen av provröret så att reagensen kan blandas fullständigt.
- 11.2 För att bekräfta att ett RIA-test ger konsekventa resultat kan man kontrollera ett antal andra faktorer. DiaSorin rekommenderar att man regelbundet kontrollerar följande parametrar för att vara säker på att satsen ger konsekventa resultat.
- Totalaktivitet**
  - Maximal bindning**  
Medelvärde av antal knäpp per minut (CPM) för röret med 0-lösning/ CPM-medelvärdet för totalaktivitetsrören.
  - Ospecifik bindning**  
CPM-medelvärdet för NSB-röret / CPM-medelvärdet för totalaktivitetsrören.
  - Kalibreringskurvas lutning**  
Följ exempelvis kalibreringskurvas punkter för 80 % och 50 %.

## 12. KVALITETSKONTROLL

Varje laboratorium bör ta med minst två kontroller (en med låg-normal nivå och en med hög-normal nivå) i varje assaykörning för att kontinuerligt övervaka metodegenskaperna. Kommersiellt tillgängliga kontroller eller de båda referenskontrollerna i satsen kan användas. Kontrollerna i satsen har utvärderats av DiaSorin med användning av satsen DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D <sup>125</sup>I RIA. Referensområdet avseende resp kontrollers koncentration visas på analyscertifikatet och visar de gränser som fastställts av DiaSorin för de kontrollvärden som erhållits med tillförlitliga test.

Kontrollerna ska behandlas exakt som okända prov och köras som duplikat. Man bör kontinuerligt föra in kontrollvärdena i ett diagram för att kunna följa hur väl kontrollerna ligger. Godtagbara områden för varje kontroll bör fastställas av varje enskilt laboratorium med hjälp av statistiska metoder för att påvisa både systematiska och slumpmässiga fel. Resultaten för kontrollerna måste uppfylla laboratoriets kriterier för godkännande innan resultaten från patientproverna rapporteras.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. RESULTATBERÄKNING

Det finns många olika metoder för att beräkna resultaten från RIA-test. Alla är baserade på att man tar fram en kalibreringskurva genom att plotta bindningsgraden mot de angivna koncentrationerna hos kalibreringslösningarna. Diagrammet kan ha antingen linjär eller logaritmisk skala. Samtliga metoder ger i stort sett samma värden för kontroller och prov, även om en viss beräkningsmetod kan "passa" bättre för vissa assayer än för andra. Den beräkningsmetod som används på DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium är % B/B<sub>0</sub> avsatt mot logaritmen för koncentrationen.

- 13.1 Beräkna medel-CPM för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov.
- 13.2 Subtrahera medel-CPM för NSB-rören från alla värden.
- 13.3 Dividera det korrigerade CPM-värdet för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov med det korrigerade CPM-värdet för 0-lösningen.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM för kalibreringslösning eller okänt prov} - \text{CPM för NSB}}{\text{CPM för 0-lösningen} - \text{CPM för NSB}} \times 100$$

- 13.4 Använd ett lin-log-papper över två tiopotenser eller log-log-papper och plotta procent B/B<sub>0</sub> för kalibreringslösningarna (lodräta axeln) mot koncentrationen (vågräta axeln).
- 13.5 Rita en bästa anpassad linje genom punkterna.
- 13.6 Avläs 25-OH-D-halterna i de okända proven från diagrammet.
- 13.7 Om ett okänt prov har späts, korrigerar man för spädningsfaktorn.
- 13.8 Beräkna maximal bindning genom att dividera CPM för 0-lösningen med medelvärdet för totalaktivitetsrören.

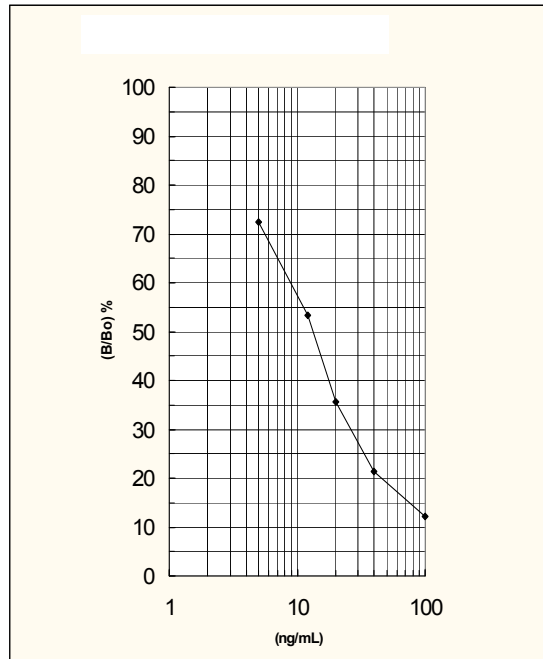
- 13.9** Man kan även analysera data med hjälp av automatiska datareduceringsprogram. DiaSorin använder RIACalc (Pharmacia) med mjuk anpassning till SPLINE-funktioner för %B/B<sub>0</sub> mot log koncentration. Andra datareduktionsmetoder måste valideras innan de används rutinmässigt.

**TABELL I**  
Exempeldata för DiaSorin 25-OH-D Vitamin D RIA

| Rör                   | CPM i<br>duplikat                | Medel-<br>CPM | Korrigerad<br>CPM | Procent<br>bundet<br>(B/T) | Procent<br>(B/B <sub>0</sub> ) | Konc. Enl.<br>Diagr.<br>(ng/mL) |
|-----------------------|----------------------------------|---------------|-------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Totalaktivitet        | 41878<br>39924                   | 40901         |                   |                            |                                |                                 |
| NSB                   | 555<br>508                       | 531           |                   | 1,3                        |                                |                                 |
| 0-lösning             | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822         | 19291             | 48,5                       |                                |                                 |
| Kalibreringslösningar |                                  |               |                   |                            |                                |                                 |
| 1                     | 14503<br>14442                   | 14472         | 13941             |                            | 72,3                           | 5                               |
| 2                     | 11005<br>10670                   | 10838         | 10307             |                            | 53,4                           | 12                              |
| 3                     | 7182<br>7642                     | 7411          | 6880              |                            | 35,7                           | 20                              |
| 4                     | 4687<br>4622                     | 4654          | 4123              |                            | 21,4                           | 40                              |
| 5                     | 2768<br>2985                     | 2877          | 2346              |                            | 12,2                           | 100                             |
| Okända prov           |                                  |               |                   |                            |                                |                                 |
| 1                     | 10365<br>10447                   | 10406         |                   |                            | 53,9                           | 12,8                            |
| 2                     | 4219<br>4720                     | 4634          |                   |                            | 24,0                           | 40,4                            |

Typiska provdata och en kalibreringskurva visas i TABELL I och FIGUR 1; denna information är endast avsedd som ett exempel och ska inte användas för att beräkna några värden.

**25-HYDROXYVITAMIN D**  
**EXEMPEL PÅ KALIBRERINGSKURVA**



**Figur 1**

**14. METODBEGRÄNSNINGAR**

- 14.1 Aktiviteten i rören måste räknas under tillräckligt lång tid för att man ska kunna undvika statistiska fel (till exempel ger en räkning av 2 000 CPM ett fel på 5 %; 10 000 CPM ger ett fel på 1 %).
- 14.2 Resultaten från testet skall användas i kombination med övriga kliniska data och laborierdata för att underlätta när läkaren fattar beslut om den enskilda patientens behandling.
- 14.3 Effekterna av hemolys och lipemi i patientproverna har inte utvärderats för denna assay; acetonitrilextraktionen förväntas dock minimera påverkan från dessa ämnen.
- 14.4 Den främsta källan till precisionsfel i metoden är troligen extraktionssteget. Andra felkällor kan vara inexakta mikropipetter eller för gamla reagens.
- 14.5 Antikroppen i satsen uppvisar viss korsreaktivitet med alla former av dihydroxyvitamin-D2- och D3-steroider; hos människa förekommer dock dessa föreningar normalt endast i koncentrationer av storleksordningen picomolar.

**OBS!** Prestanda för testet har inte kontrollerats i en pediatrik population.

## 15. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

### Referensområde

Det är viktigt att varje laboratorium upprättar ett eget referensområde, som är representativt för dess typiska patientunderlag. Faktorer som UV-exponering<sup>9,10</sup> årstid,<sup>11,12</sup> ras,<sup>7</sup> och intag med födan<sup>8</sup> är alla kända att påverka 25-OH-D-nivåerna hos människor. En sänkning av D-vitaminivåerna med åldern har påvisats i litteraturen; undersökningarna i de flesta av dessa studier har dock utförts i nordeuropeiska länder, där det finns mindre solljus och berikningen av livsmedel är mindre utbredd.<sup>9,15,16</sup> Detta, tillsammans med de stora variationerna i hälsokriterier och medicinering, gör det svårt att dra några generella slutsatser om en renodlad ålderseffekt på D-vitaminstatus.<sup>12</sup> Vid studier i USA har resultaten varit tveviga, såtillvida att vissa studier visar att det sker en nedgång av D-vitaminstatus med åldern, och andra inte. Antiepileptika har visat sig ge en sänkning av 25-OH-D-nivåerna, liksom långvarig användning av solskydd som innehåller p-aminobensoesyra.<sup>17</sup> DiaSorin har inte tagit fram något referensområde för barn med denna sats.

Utvärderade DiaSorin serum från 20 män och 24 kvinnor utan påtagliga hälsoproblem (till största delen vita frivilliga från den amerikanska Mellanvästern), med hjälp av DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D<sup>125I</sup> RIA kit. Försökspersonernas ålder låg mellan 23 och 67 år. Proven togs i oktober. Det observerades endast en liten skillnad mellan 25-OH-D-nivåerna hos män (medelvärde = 21.7 ng/mL) och kvinnor (medelvärde = 24.1 ng/mL) i denna referensgrupp. Medelvärdet för hela populationen (n = 44) var 23.0 ng/mL, med ett område inom 2 standardavvikelser på 9.0 - 37.6 ng/mL.

En hög prevalens av subklinisk 25-OH-D-brist i normala, till synes friska populationer har iakttagits i många länder, speciellt under vintermånaderna.<sup>13,14</sup> I den senaste litteraturen har följande intervall föreslagits för klassificering av 25-hydroxyvitamin D-status: Brist: 0 - 5 ng/mL (0 - 12.5 nmol/L); Otillräckligt nivå: 5 - 20 ng/mL (12.5 - 50 nmol/L); D-hypovitaminosis: 20 - 40 ng/mL (50 - 100 nmol/L); Tillräcklig nivå: 40 - 100 ng/mL (100 - 250 nmol/L); och Toxisk nivå: över 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. SPECIFIKA PRESTANDA

### 16.1 Precision

DiaSorin utvärderade assayens precision genom att köra fyra kontrollhalter som täckte hela mätområdet i 40 testkörningar under 23 arbetsdagar. I varje testkörning ingick de fyra kontrollerna x 2 extraktioner (fyrdubbla prov). Studieprotokollet uppfyllde riktlinjerna i dokumentet EP5-T2 från CLSI.<sup>22</sup> Databeräkningarna utfördes med SAS PROC VARCOMP. Den statistiska modell som användes var en linjär modell för slumpmässiga effekter.<sup>23</sup>

| Medelvärde (ng/mL) | Inom körningen (% C.V.) | Totalt precisionsfel (% C.V.) |
|--------------------|-------------------------|-------------------------------|
| 8,6                | 11,7                    | 9,4                           |
| 22,7               | 10,5                    | 8,2                           |
| 33,0               | 8,6                     | 9,1                           |
| 49,0               | 12,5                    | 11,0                          |

### 16.2 Riktighet

Riktigheten för assayen har kontrollerats genom ett spädnings- och ett utbytetest.

Linearitet (parallelitet)

Seriespädningsstudie av 4 patientprover (värden = ng/mL)

| Prov | Outspätt | 1/2  | 1/4  |
|------|----------|------|------|
| 1    | 74.6     | 79.4 | 74.8 |
| 2    | 87.8     | 96.4 | 95.2 |
| 3    | 85.6     | 88.2 | 82.4 |
| 4    | 55.2     | 57.8 | 60.4 |

## UTBYTE

Kända mängder av 25-OH-D<sub>3</sub> tillsattes till patientprover (serum) och procent utbyte bestämdes.

| Prov nummer | Urspr. konc. (ng/mL) | Mängd tillsatt (ng/mL) | *Förväntad konc. (ng/mL) | Uppmätt konc. (ng/mL) | Utbyte |
|-------------|----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------|--------|
| 1           | 15,8                 | 5,0                    | 25,5                     | 24,8                  | 97%    |
|             |                      | 10,0                   | 35,1                     | 41,8                  | 119%   |
|             |                      | 25,0                   | 62,7                     | 61,9                  | 99%    |
| 2           | 51,2                 | 5,0                    | 60,6                     | 62,0                  | 102%   |
|             |                      | 10,0                   | 69,8                     | 73,8                  | 106%   |
|             |                      | 25,0                   | 96,4                     | 99,4                  | 103%   |
| 3           | 26,6                 | 5,0                    | 36,2                     | 33,5                  | 92%    |
|             |                      | 10,0                   | 45,7                     | 54,0                  | 118%   |
|             |                      | 25,0                   | 73,0                     | 82,8                  | 113%   |
| 4           | 57,3                 | 5,0                    | 66,6                     | 63,8                  | 96%    |
|             |                      | 10,0                   | 75,8                     | 78,1                  | 103%   |
|             |                      | 25,0                   | 102**                    | 104**                 | 102%   |
| 5           | 41,3                 | 5,0                    | 50,8                     | 48,5                  | 95%    |
|             |                      | 10,0                   | 60,1                     | 56,1                  | 93%    |
|             |                      | 25,0                   | 87,0                     | 93,2                  | 107%   |

\* I beräkningen av den förväntade halten av 25-OH-D ingår den spädningsfaktor som orsakas av lösningen med tillsats.

\*\* Detta är extrapolerade värden; den uppmätta koncentrationen är > 100 ng/mL (högsta kalibreringslösningen)

### 16.3 Analytisk Känslighet (detektionsgränser)

Känsligheten hos assayen, definierat som den lägsta koncentration som kan särskiljas från noll vid 2 standardavvikelser under medel-CPM för 0-kalibreringslösningen (n = 20), har visat sig ligga på eller under 1,5 ng/mL. Denna känslighetsnivå gäller vid användning både av kalibreringslösning "1" och av den "extra" kalibreringslösningen.

### 16.4 Analytisk Specificitet

Data för korsreaktiviteten för det antiserum som används i satsen uttrycks som kvoten mellan koncentrationen av 25-OH-D och koncentrationen av det korsreagerande ämnet vid 50 % hämning av maximal bindning.

| Steroid        | % korsreaktivitet |
|----------------|-------------------|
| Vitamin D2     | 0,8               |
| Vitamin D3     | 0,8               |
| 25-OH-D2       | 100               |
| 25-OH-D3       | 100               |
| 24.25-(OH)2-D2 | 100               |
| 24.25-(OH)2-D3 | 100               |
| 25.26-(OH)2-D2 | 100               |
| 25.26-(OH)2-D3 | 100               |
| 1.25-(OH)2-D2  | 11,0              |
| 1.25-(OH)2-D3  | 11,0              |

FÖR REFERENSER HÄNVISAS TILL SISTA SIDAN



## LATHUND FÖR TESTET

1. Extrahera proven: Pipettera 500 µL acetonitril i ett glasrör och tillsätt långsamt 50 µL kalibreringslösning, kontroll eller patientprov UNDER YTAN på acetonitrilen. Vortexa i 10 sekunder och centrifugera i 10 minuter vid 1200 x g\* och 20-25°C.
2. Pipettera reagens enligt följande schema:

| Rör/Reagens                         | Total aktivitet | NSB    | Kal 0-6 | Kontroller och okända prov |
|-------------------------------------|-----------------|--------|---------|----------------------------|
| Extraherade 0 kalibreringslösningar | -               | 25 µL  | -       | -                          |
| Extraherade kalibreringslösningar   | -               | -      | 25 uL   | -                          |
| Extraherade kontroller              | -               | -      | -       | 25 uL                      |
| Extraherade okända prov             | -               | -      | -       | 25 uL                      |
| Spårämne                            | 50 uL           | 50 uL  | 50 uL   | 50 uL                      |
| NSB/tillsatsbuffert                 | 1.0 mL          | 1.0 mL | -       | -                          |
| 25-OH-D antiserum                   | -               | -      | 1.0 mL  | 1.0 mL                     |

3. Blanda väl; inkubera i 90 minuter (+/-10 minuter) vid 20-25°C.
4. Tillsätt 500 µL DAG fällningskomplex i varje rör, utom i totalaktivitetsrören.
5. Blanda väl; inkubera i 20-25 minuter vid 20-25°C.
6. Tillsätt 500 µL NSB/tillsatsbuffert i varje rör, utom i totalaktivitetsrören.
7. Centrifugera vid 1800 x g\* i 20 minuter.
8. Håll av supernatanterna.
9. Räkna varje rör i en gammräknare i minst 60 sekunder.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radie i cm}) (\text{rpm})^2$$

## 25-HYDROXYVITAMIN D <sup>125</sup>I RIA KÉSZLET

### 1. FELHASZNÁLÓI TERÜLET

#### KIZÁRÓLAG IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA

A készlet a 25-hydroxivitamin D (25-OH-D) és egyéb hydroxilált vitamin D metabolit kvantitatív meghatározására alkalmas humán szérumból, vagy plazmából a vitamin D mennyiségének vizsgálatához. Az assay eredménye egyéb klinikai és laboratóriumi eredményekkel együtt alkalmas a felnőtt populáció kezelési stratégiájának kialakítására.

### 2. A TESZT ÁTTEKINTÉSE ÉS MAGYARÁZATA

A kalciferol (Vitamin D) a keringésbe jut és átalakul különböző formákban; a legfőbb ezek közül a 25-hydroxikalciferol (25-OH-D). A Vitamin D metabolizmus első lépésének, a 25 hydroxilációnak legfőbb helyszíne a máj.<sup>1</sup> Csak kis mértékű 25-OH-D metabolizmus megy végbe a vesékben egyéb dihydroxivitamin D metabolitokat eredményezve a szervezetben.<sup>2,3</sup> Mivel a 25-OH-D az uralkodó keringő formája a vitamin D-nek normál populációban, így ez alkalmas a vitamin D állapotának megfelelő monitorozására.<sup>4</sup>

A 25-OH-D két fő formája a kolekalciferol (vitamin D<sub>3</sub>) és az ergokalciferol (vitamin D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> A Vitamin D<sub>3</sub> főként ultraviola fény hatására keletkezik a bőrben D<sub>2</sub> -ből főként diétás forrásanyagokból. Mivel a két forma pontosan jellemzi az egyén vitamin D státuszát, fontos, hogy a két formát együttesen mérjük.<sup>6,7</sup> Amegfelelő meghatározás információt nyújt a keringő 25-OH-D metabolitokról és azok fiziológiai jelentőségéről.

A 25-OH-D kiemelkedően fontos a kalcium metabolizmushoz kötött angolkórban, neonatális hypokalcémiában szenvedő betegek, terhesek, valamint táplálkozási és vese osteodistrophiában, hypoparathyroidosis-ban és postmenopausális osteoporosis-ban szenvedő betegek esetén.<sup>6,8-10</sup> Megjegyzés: A DiaSorin 25-OH-D assay nem alkalmas a gyermekgyógyászatban történő alkalmazásra.

### 3. MEGHATÁROZÁS ELVE

A DiaSorin 25-OH-D assay egy két-lépéses eljárás. Az első lépésben az 25-OH-D és egyéb hydroxilált metabolitok gyors extrakciója történik szérumból, vagy plazmából acetonitril segítségével. Az extrakciót követően, egy egyensúlyi RIA mérés kerül kivitelezésre. A RIA mérés egy a 25-OH-D-re specifikus antitest használatán alapul. A minta, antitest és tracer inkubálása 90 percig 20-25°C-on történik. A második antitesttel történő 20 perces 20-25°C-on történő inkubáció után szeparációs lépés következik precipitáló komplex segítségével. Az inkubálás és a centrifugálás között NSB/Addíciós puffer kerül bemérésre a nem specifikus kötődések csökkentésére.

### 4. A KÉSZLET TARTALMA

|                                 |               |
|---------------------------------|---------------|
| 25-OH-D Kalibrátorok            | 6 üveg/1 mL   |
| 25-OH-D NSB/Addíciós Puffer     | 1 üveg/70 mL  |
| 25-OH-D Antiszérum              | 1 üveg/105 mL |
| 25-OH-D Tracer                  | 1 üveg/6 mL   |
| 25-OH-D DAG Precipitáló Komplex | 2 üveg/30 mL  |
| 25-OH-D Kontrollok              | 2 üveg/1 mL   |
| 25-OH-D Acetonitril             | 2 üveg/15 mL  |
| Meghatározások száma            | 100           |

TÁROLÁS: A címkén feltüntetettek alapján a készlet 2-8°C-on tárolandó. Felnyitást követően mindegyik reagens a címkén feltüntetett lejárati ideig 2-8°C-on tartandó. A reagensek nem használhatók fel a lejárati időt követően. A készlet külső címkéjén feltüntetett lejárati idő megegyezik a tracer lejárati idejével.

A különböző gyártású készletek reagenseit szigorúan tilos összekeverni.

**4.1 25-OH-D NSB/Addíciós Puffer:** felhasználásra kész

Foszfát-zselatin puffer 0.1% sodium azid-ot tartalmaz. Ez a komponens kettős funkciót lát el. NSB pufferként és Addíciós pufferként is szolgálhat.

**4.2 25-OH-D<sub>3</sub> Kalibrátorok:** felhasználásra kész

Hat (25-OH-D<sub>3</sub>) kalibrátor a 0-100 ng/mL koncentráció tartományban, humán szérumban, 0.1%-os Na-azid-ot tartalmaz. Kezelje ezeket a reagenseket gondosan (Előírásoknak és Szabályoknak megfelelően).

A készlet kalibrátorai UV meghatározással lett hitelesítve és HPLC analízissel lett megerősítve. A készlet kalibrátorai bizonyítottan helyettesíthetőek páciens mintákkal, ha a tesztet a felhasználói utasításnak megfelelően használják.

**MEGJEGYZÉS:** Ha opcionális kalibrátort kíván használni (2.5ng/mL) azt elkészítheti a kal. 1-ből a kal. 0-val hígítva 1:2 arányban (pl.: 100 uL "1" + 100 uL "0"). A hígítást a készlet leírásának megfelelően az extrakciós lépés előtt kell elvégezni .

**4.3 25-OH-D Antiszérum:** felhasználásra kész

Kecske anti-25-OH-D szérum, foszfát-zselatin puffer-el hígított, 0.1% sodium azid-ot tartalmaz.

**4.4 25-OH-D<sub>3</sub> Tracer:** felhasználásra kész

I-125 [<sup>125</sup>I]-tel jelölt 25-OH-D<sub>3</sub> analóg etanol-foszfát pufferben. Kezelje ezeket a reagenseket gondosan (Előírásoknak és Szabályoknak megfelelően).

**4.5 Szamar Anti-Kecske (DAG) Precipitáló Komplex:** felhasználásra kész

Szamar anti-kecske szérum, normál kecske szérum, és polietilén-glikol BSA-borát pufferben, gentamicin-szulfátot és 0.1%-os Na-azid-ot tartalmaz. Keverje fel használat előtt 5-10 perccel és használat közben a megfelelő homogenitás eléréséhez .

**4.6 25-OH-D Kontrollok:** felhasználásra kész

Humán szérum, 0.1%-os Na-azid-ot tartalmaz, ismert mennyiségű 25-OH-D<sub>3</sub> hozzáadásával érik el a megfelelő kontroll tartományt. Alaposan keverje össze és ismeretlen mintaként kezelje. Kontroll 1 reprezentálja az alacsony normál tartományt és a Kontroll 2 reprezentálja a magas normál tartományt. Minden kontroll koncentrációtartománya az analízis tanúsítványon feltüntetve és a DiaSorin által megállapított határokat tükrözi olyan kontrollértékekre amelyek megbízható vizsgálatok során tapasztaltak. Kezelje ezeket a reagenseket gondosan (Előírásoknak és Szabályoknak megfelelően).

**4.7 Aceto-nitril:** felhasználásra kész

Acetonitril. Ezen készletnél alkalmas a használatra. Kezelje ezeket a reagenseket gondosan (Előírásoknak és Szabályoknak megfelelően). Természetes száraz gyantát tartalmaz.

**5. Figyelmeztetések és óvintézkedés**

CSAK IN VITRO DIAGNOSZTIKAI HASZNÁLATRA!

Emberek, állatok in vivo kezelése tilos.

**FÖRSIKTIGT!** Denna produkt får endast tas emot. förvarvas. ägas och användas av läkare. kliniska laboratorier. sjukhus. veterinärer och forskningsinstitutioner. Analyserna ska utföras av laboratoriepersonal med adekvat utbildning och praktisk erfarenhet.

**HUMÁN EREDETŰ ANYAGOKAT TARTALMAZÓ REAGENSEK**

**Potenciális infektológiai forrásként kezelendőek.**

Minden szérum/plazma donor egység a U.S. FDA szabályai szerint ki lett vizsgálva és negatív eredményt adott HBsAg-re, HCV antitestre és HIV 1/2 antitestre nézve. Bár az ellenőrzés nagy pontossággal törekszik nem garantálható, hogy valamennyi fertőző tényező kimutatásra kerül. A készlet tartalmaz olyan humán eredetű anyagokat is amelyek nem esnek tesztelés alá. Mivel nem ismert olyan metodika amely teljes biztonsággal kizárja a hepatitis B vírus (HBV), hepatitis C vírus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) vagy egyéb infektológiai ágens jelenlétét, minden humán eredetű anyagot különösen nagy óvintézkedések mellett kell a laboratóriumban kezelni a U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4th., May 1999 vagy későbbi előírásainak megfelelően.

## **SODIUM AZID TARTALMÚ REAGENSEK**

**FIGYELMEZTETÉS:** A készlet néhány reagense sodium-azid-ot tartalmaz. A sodium-azid ólom és réz tartalmú vízvezetékekkel reakcióba lépve robbanásveszélyes fém-azidokat képez. A hulladékot bő vízzel eressze le a felszabaduló azidok kitapadásának megakadályozására. További információkat a "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," in the Manual Guide-Safety Management No. CDC-22 issued by the Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 1976 olvashat.

### **European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive**

R 20/21/22 - Belégzése, bőrrel történő érintkezése és lenyelése káros!

R 32 - Savakkal kapcsolatba lépve nagyon toxikus gázok szabadulnak fel.

S 28 - Bőrrel történő érintkezését követően azonnal bő vízzel mossa le.

## **ACETONITRIL TARTALMÚ REAGENSEK**

### **European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 88/379/EEC)**

R11 - Nagyon tűzveszélyes!

R23/24/25 - Belégzése, bőrrel történő érintkezése és lenyelése toxikus!

S16 - Tartsa távol mindennemű tűzforrástól — Tilos a dohányzás.

S36 - Megfelelő védőruka viselete kötelező!

S43 - Tűz esetén használjon vegyszert, vagy szén-dioxidot.

S45 - Baleset, vagy rosszullét esetén azonnal kérjen orvosi segítséget.

S51 - Csak jól szellőztetett területen használja!

## **ETANOL TARTALMÚ REAGENSEK**

### **FIGYELMEZTETÉS- TŰZVESZÉLYES**

### **European Communities Hazardous Substance Risk Phrases (Council Directive 88/379/EEC)**

R11 - Nagyon tűzveszélyes!

S16 - Tartsa távol mindennemű tűzforrástól — Tilos a dohányzás.

S43 - Tűz esetén használjon vegyszert, vagy szén-dioxidot

## **I-125 TARTALMÚ REAGENSEK**

Ez a készlet olyan I-125 tartalmú anyagokat tartalmaz, melyek radioaktivitása nem haladja meg a 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) értéket. Helyes előkészítés és megfelelő laboratóriumi gyakorlat szükséges az anyagok tárolásánál, kezelésénél és a hulladékkezelésnél.

Egyetemes szabályok radioizotopok kezeléséhez:

Ezeket a radioaktív anyagokat csak orvosok, vagy állatorvosok szerezhetik be, birtokolhatják és használhatják humán és állat gyógyászatban, klinikai laboratóriumokban, vagy kórházakban kizárólag in vitro klinikai, vagy laboratóriumi tesztekben, melyek nem foglalják magukban a humán, illetve állati szervezet külső, vagy belső kezelését, arra irányuló sugárzást. Ezen termékek beszerzése, birtoklása, használata, szállítása a U.S. Nuclear Regulatory Commission szabályozása alá esik.

1. A radioaktív anyagokat körülhatárolt, speciálisan jelölt területen kell tárolni.
2. A radioaktív anyagokhoz csak arra jogosult személyek férhetnek.
3. Tilos a radioaktív anyagok szájjal történő pipettázása.
4. A radioaktív munkához kijelölt területen enni és inni tilos.
5. A területet, ahová radioaktív anyag löttyen ki, fel kell törölni, majd alkali detergensekkel, vagy radioaktivitást dekontamináló oldattal kell felmosni. Az üvegedényeket alaposan ki kell öblíteni vízzel mielőtt más laboratóriumi edénnyel együtt kerülne mosásra.

A radioaktív anyagok kezelésénél a következő speciális szabályok érvényesek:

A radioaktív anyagok kezelésének, használatának, szállításának és hulladékkezelésének szabályozása saját szabályozás alá esik.

**FIGYELMEZTETÉS:** A készlet olyan anyagokat tartalmaz, amelyet a Kaliforniai Államban rákkeltőnek minősítenek.

**FIGYELMEZTETÉS:** A csomagolás mellékletén feltüntetett radioaktivitás érték némileg eltér a dobozon és a tracer üvegcsé címkéjén feltüntetett radioaktivitás értékektől. A dobozon és a tracers üveg címkéjén feltüntetett érték a kalibráció idején mért aktuális radioaktivitást mutatja, míg a csomagolás mellékleteként feltüntetett érték a készlet teoretikus radioaktivitását adja meg.

## 6. A KÉSZLET ROMLÁSÁT JELZŐ JELLEMZŐK

- 6.1 Abnormális partikulum szemcsék a készlet valamely reagensében. (NSB puffer, antiszérum és DAG precipitáló reagens zavarossága.)
- 6.2 A görbe lejtésének, vagy a görbe helyzetének normálistól való eltolódása.
- 6.3 A maximális kötés csökkenése.
- 6.4 Magas nonspecifikus nulla kötődés.

## 7. MINTA GYŰJTÉS ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

Ötven (50) mikroliter szérum, vagy plazma (EDTA vagy Heparinos) szükséges a 25-OH-D extrakcióhoz; a 150 mikroliter térfogat elegendő az ismételt analízishez és a pipettázási térfogat is elegendő.

A készlethez humán szérum, vagy plazma egyaránt használható. Antikoagulánsként EDTA, vagy heparin alkalmazható. Az éhgyomri mintavétel ajánlott, de nem szükségszerű. A vért aseptikus körülmények között kell venni 5, vagy 10 mL-es üveg csőbe. Hagyja a vért szobahőmérsékleten (15-25°C) megalvadni. Centrifugálja 15 percig 760 x g\* -on, hogy hemolízis mentes szérumot kapjon. Adalék, vagy tartósítószer használata tilos. Minden műanyag, üveg és egyéb eszköznek, amely a mintával érintkezik kontamináció mentesnek kell lennie. Tárolja a szérum, vagy plazma mintákat -20°C-on, vagy az alatt. A minták tárolhatók üveg, vagy műanyag csövekben, olyan hosszan ameddig a cső zárása úgy biztosítható, hogy a minta nem szárad be. A DiaSorin tanulmányt készített limitált számú páciens mintával, mely szerint a minta stabilitását 9 hétig megőrzi -20°C-on. Szignifikáns változás nem figyelhető meg 3-szori fagyasztás-olvasztás hatására. Ennek ellenére az ismételt fagyasztás-olvasztást lehetőség szerint kerülje. A mintákat fagyasztva kell szállítani.

## 8. MEGHATÁROZÁSHOZ SZÜKSÉGES EGYÉB ANYAGOK

- Renedelkezésre álló bórszilikát üvegek, 12 x 75 mm.  
**MEGJEGYZÉS:** Műanyag csövek nem alkalmasak e készlet használatánál.
- Hőmérséklet kontrollált centrifuga 12 x 75 mm-es csövekhez.
- I-125 mérésére alkalmas gammaszámláló.
- Vortex mixer.
- Pipetták:
  - a. Micropipetták: 25 µL és 50 µL-es (pontatlanság mértéke ± 1%).
  - b. Kalibrált sorozatadagoló hegyekkel: 50 µL, 500 µL and 1.0 mL (pontatlanság mértéke ± 1%).

**NOTE:** A "Meghatározáshoz szükséges egyéb anyagokban" feltüntetett anyagok az extrakciós lépéshez szükségesek.

## 9. EXTRAKCIÓS LEÍRÁS

- 9.1 Felíratozza a rendelkezésre álló 12 x 75 mm-es üveg csöveket a kalibrátoroknak, kontrollokknak, páciens mintáknak megfelelően.
- 9.2 Mérjen 500 µL aceto-nitrilt minden csőbe.
- 9.3 Mérjen be 50 µL of kalibrátort, kontrollt, vagy páciens mintát ÓVATOSAN az aceto-nitril felszíne alá.
- 9.4 Vortexelje 10 másodpercig.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius in cm}) (\text{rpm})^2$$

- 9.5 Centrifugálja 1200 x g\*-vel 10 percig 20-25°C-on.
- 9.6 Pipetázzon 25 µL aliquotot duplikátumban a felülúszóból az előre felíratott 12 x 75 mm-es csövekbe. **FIGYELEM:** Óvatosan nehogy felzavarja a leülepedett részt.
- 9.7 Assay felülúszó alkalmas a meghatározásra.

## 10. MÓDSZER LEÍRÁS

- 10.1 Hagyja valamennyi reagenst és mintát szobahőmérsékletre melegedni. Ne hagyja a reagenseket 25°C felett.
- 10.2 Felíratozza a 12 x 75 mm-es üveg csöveket duplikátumban az utolsó oldalon lévő Teszt protokoll alapján.
- 10.3 Mérje be a következő reagenseket:
  - a. **Totál beütés cső**  
50 µL of <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL of NSB/Addíciós puffer
  - b. **Nonspecifikus kötés cső (NSB)**  
25 µL of 0 kalibrátor (extraktált)  
50 µL of <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL of NSB/Addíciós puffer
  - c. **Kalibrátorok, kontrollok, és ismeretlen minták**  
25 µL of kalibrátor, kontroll, vagy ismeretlen minta (extraktált)  
50 µL of <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL of 25-OH-D antiszérum
- 10.4 Vortexelje alaposan, elkerülve a habképződést és inkubálja 90 (+/- 10) percig 20-25°C-on.
- 10.5 Adjon 500 µL DAG precipitáló komplexet (DAG precipitáló komplexet használat előtt és közben alaposan keverje össze) minden csőhöz, kivéve a totál csövet.
- 10.6 Keverje össze alaposan, majd inkubálja 20-25 percet 20-25°C-on.
- 10.7 Adjon 500 uL of NSB/Addíciós puffert minden csőhöz, kivéve a totál csövet. Vortexelje össze alaposan. Járjon el óvatosan ennél a lépésnél, hogy a nagy volumen miatt ki ne fröccsenjen.
- 10.8 Centrifugálja valamennyi csövet 20 percig 20-25°C-on 1800 x g\*-vel, kivéve a totál beütésszámot.
- 10.9 Szívja le a felülúszót, kivéve a totál-t, hableszívót, vagy ennek megfelelő eszközt, hogy az a szennyes tartályba jusson. Helyezze a lefordított rack-et itatós papírra. Itassa le az összes folyadékot a csőről.
- 10.10 Szintillációs gammaszámlálóval mérje le valamennyi csövet legalább 1 perces mérésidővel. Mérje a csöveket megfelelő ideig, hogy az elegendő legyen a statisztikai pontosság eléréséhez. (Nézz meg az eredmény részt: Az eljárás korlátai.)

## 11. MEGJEGYZÉS AZ ELJÁRÁSHOZ

- 11.1 Mérjen minden reagenst a cső alsó harmadába, ezzel is elősegítve a reagensek keveredését .
- 11.2 A teljes monitorozás szabályainak megfelelően a laboratóriumnak ellenőriznie kell az adicional faktort. DiaSorin azt javasolja, hogy a következő paramétereket minden assay futtatás előtt ellenőrizze.
  - a. **Totál beütésszám**
  - b. **Maximum kötődés**  
A null kalibrátorra mért percenkénti átlag beütés (CPM) /Totál cső átlag CPM értéke

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{sugár cm-ben}) (\text{rpm})^2$$

**c. Nonspecifikus kötés**

NSB cső átlag CPM értéke/ Totál cső átlag CPM értéke.

**d. A kalibrációs görbe meredeksége**

Például, a 80 és 50%-os kalibrációs pontok ellenőrzése.

## 12. MINŐSÉGBIZTOSÍTÁS

Valamennyi laboratóriumban minden futtatásnál le kell mérni mindkét kontrollt (alacsony normál és magas normál tartományból), hogy valamennyi eredmény kiadható legyen. A kereskedelmi forgalomban kapható, vagy a két referencia kontroll használható. A DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D <sup>125</sup>I RIA készletben lévő kontrollokat a DiaSorin bevizsgálta. Minden kontroll koncentrációtartománya az analízis tanúsítványon feltüntetve és a DiaSorin által megállapított határokat tükrözi olyan kontrollértékekre amelyeket megbízható vizsgálatok során tapasztaltak.

A kontrollokat úgy kell kezelni, mint a páciens mintákat és duplikátumban kell mérni. A minőségbiztosítás méréseit táblázatban kell vezetni. Javasolt valamennyi kontroll saját laboratóriumra jellemző értékét meghatározni és statisztikus módszerekkel kiszűrni a szisztemás és random hibákat. A kontroll eredményeknek összhangban kell lennie a laboratóriumi kritériumokkal, hogy az eredmény kiadható legyen.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. EREDMÉNYEK KALKULÁCIÓJA

Több eljárás létezik RIA készletek kiértékelésére. Valamennyi a kalibrációs görbe felvételén alapul, mely nem más mint a mért kötődés a koncentráció függvényében árázva. A görbe felvétel lineáris, vagy logaritmikus skálán történik. Valamennyi eljárás megközelítőleg ugyanazt a kontroll, illetve páciens mintákat adja, az illesztésben különbségek vannak. A DiaSorin Quality Control Laboratórium % B/B<sub>0</sub> - log koncentráció összefüggést alkalmaz a koncentráció meghatározásához.

**13.1** Számítsa ki az átlag CPM értéket valamennyi kalibrátorra, kontrollra és páciens mintára.

**13.2** Vonja ki az NSB átlag értékét, valamennyi átlag CPM értékből.

**13.3** Ossa el a korrigált kalibrátor, kontroll, páciens minta CPM értékeket a Kalibrátor 0 korrigált CPM értékével .

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM kalibrátor, ismeretlen minta} - \text{CPM NSB}}{\text{CPM kalibrátor 0} - \text{CPM NSB}} \times 100$$

**13.4** Használjon semi-log, vagy log-logit milliméterpapírt, ábrázolja a kalibrátorokhoz tartozó B/B<sub>0</sub> értékeket (Y-tengely) a koncentráció függvényében (x-tengely).

**13.5** Vegye fel a legjobb illesztésű görbét.

**13.6** Határozza meg az ismeretlen minták 25-OH-D koncentrációját interpolációval.

**13.7** Ha a minta hígítva volt, korrigálja az eredményt a hígítási faktorial.

**13.8** Számolja ki a maximális kötődés mértékét a kalibrátor 0-hoz tartozó CPM és atotál csőre mért teljes beütésszám hányadosaként.

**13.9** Automata kiértékelő rendszerek is használhatóak az eredmények értékeléséhez. A DiaSorin a RIACalc (Pharmacia)-ot használja amely a %B/B<sub>0</sub> -log koncentráció alapján értékeli, smooth-SPLINE görbe illesztéssel. Egyéb adat kiértékelő programot először el kell fogadtatni.

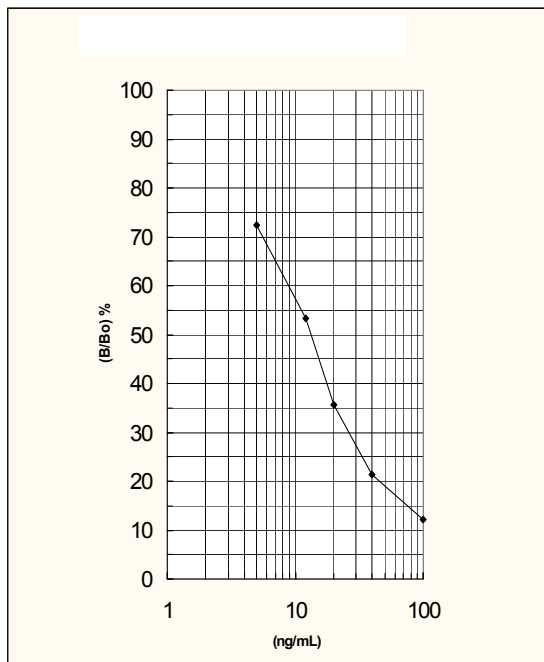
**TÁBLÁZAT I**  
DiaSorin 25-OH-D Vitamin D RIA Minta adatok

| Cső                      | Duplikátum<br>CPM                | Átlag<br>CPM | Korrigált<br>CPM | Százalékos<br>kötődés<br>(B/T) | Százalék<br>(B/B <sub>0</sub> ) | Ábrázolt<br>Konc.<br>(ng/mL) |
|--------------------------|----------------------------------|--------------|------------------|--------------------------------|---------------------------------|------------------------------|
| Totál<br>beütés-<br>szám | 41878                            | 40901        |                  |                                |                                 |                              |
|                          | 39924                            |              |                  |                                |                                 |                              |
| NSB                      | 555<br>508                       | 531          |                  | 1.3                            |                                 |                              |
| 0 Kalibrátor             | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822        | 19291            | 48.5                           |                                 |                              |
| Kalibrátorok             |                                  |              |                  |                                |                                 |                              |
| 1                        | 14503<br>14442                   | 14472        | 13941            |                                | 72.3                            | 5                            |
| 2                        | 11005<br>10670                   | 10838        | 10307            |                                | 53.4                            | 12                           |
| 3                        | 7182<br>7642                     | 7411         | 6880             |                                | 35.7                            | 20                           |
| 4                        | 4687<br>4622                     | 4654         | 4123             |                                | 21.4                            | 40                           |
| 5                        | 2768<br>2985                     | 2877         | 2346             |                                | 12.2                            | 100                          |
| Ismeretlen minta         |                                  |              |                  |                                |                                 |                              |
| 1                        | 10365<br>10447                   | 10406        |                  |                                | 53.9                            | 12.8                         |
| 2                        | 4219<br>4720                     | 4634         |                  |                                | 24.0                            | 40.4                         |

Egy tipikus kalibrátor adatsor és kalibrációs görbe látható az I. TÁBLÁZATBAN és az 1. ÁBRÁN; ezek az értékek csak példák, ezért ne használja az eredmények kalkulációjához



### 25-HYDROXYVITAMIN D MINTA STANDARD GÖRBE



Ábra 1

#### 14. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI

- 14.1 A beütésszám csökkenti a statisztikai hibát (például: 2,000 CPM érték 5%-os hibát okozhat; 10,000 CPM 1%-hibát okozhat).
- 14.2 Az eredmények kiértékelését együttesen kell végezni más klinikai és laboratóriumi eredményekkel a megfelelő kezelési stratégia kiválasztásához.
- 14.3 A haemolízis és a lipémia nem okozza az eredmények torzulását, mert az aceto-nitril használatával ezen befolyásoló hatások kiküszöbölhetőek.
- 14.4 A legnagyobb hibaforrás a metodikában az extrakciós eljárás. Hibaforrást jelenthet még a mikropipetta pontatlansága és a lejárt készlet használata.
- 14.5 A készletben található antitest keresztreakciót ad a dihidroxivitamin D2 és D3 szteroidok különböző formáival; ám fiziológiásan a humán szérumban ezek csak pikomoláris nagyságrendben vannak jelen .

**MEGJEGYZÉS:** Az assay karakterisztikája nem gyermekgyógyászati felhasználásra lett kialakítva.

## 15. VÁRT ÉRTÉKEK

### Referencia tartomány

Fontos, hogy valamennyi laboratórium saját referencia tartományt határozzon meg, mely jól tükrözi a populációra jellemző értékeket. Különböző tényezők, mint az UV hatás<sup>9,10</sup> évszakok,<sup>11,12</sup> életpálya,<sup>7</sup> és az étrendi szokások nagy mértékben befolyásolják a 25-OH-D szintet. Az irodalom beszámol az öregedéssel járó szint csökkenéssel; ugyanígy három észak európai tanulmány is bizonyítja, a kevesebb napsütés és kevesebb táplálékfelvétel illetően hatását.<sup>8,15,16</sup> Ezek a nagy variabilitást mutató különbségek bonyolultá teszik az egészség kritériumainak, gyógykezelés státuszának megítélését és kizárják, hogy csak a kor legyen meghatározó a D-vitamin státusz megítélésénél.<sup>12</sup> Az U.S. –ban végzett tanulmányok is hasonló eredményeket mutattak a vitamin D státuszra vonatkozóan a kor függvényében. A görcsoldók 25-OH-D szint csökkenést okoznak hosszú távú használat esetén p-aminobenzoesavvá alakulás miatt.<sup>17</sup> A DiaSorin nem határozta meg a gyermekgyógyászati normál tartományokat a készletre.

DiaSorin 20 férfit és 24 nőt vizsgált a DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D<sup>125I</sup> RIA készlettel, akik bizonyítottan egészségesek, többségében fehér bőrű önkéntesek voltak középnyugat U.S.-ból. Az önkéntesek életkora 23 és 67 év között volt. A mintákat Októberben vették le. Csupán minimális különbség volt megfigyelhető a férfiak (átlag = 21.7 ng/mL) és a nők (átlag = 24.1 ng/mL) 25-OH-D szintje között ebben a referencia csoportban. A teljes populáció átlaga (n = 44) 23.0 ng/mL-nek és a 2 SD –vel számított tartomány 9.0 – 37.6 ng/mL-nek adódott.

Nagy megbízhatósággal 25 OH Vitamin D deficienciára nézve normálnak tekinthető egészséges populációt vizsgáltak több országban, téli hónapokban.<sup>13,14</sup> A legfrissebb irodalmak a következő osztályozásokat alkalmazzák a 25 OH Vitamin D státuszban: Hiány: 0 - 5 ng/mL (0 - 12.5 nmol/L); Elégtelenség: 5 - 20 ng/mL (12.5 - 50 nmol/L); Hypovitaminosis D: 20 - 40 ng/mL (50 - 100 nmol/L); Normál: 40 - 100 ng/mL (100 - 250 nmol/L); és Toxikus: több mint 100 ng/mL(> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. ANALITIKAI JELLEMZŐK

### 16.1 Precizitás

Az assay precizitását a DiaSorin 4 kontrollal vizsgálta 23 napon keresztül 40 futtatásban. Minden futtatásnál mind a négy kontroll indítva lett két extraktummal (4 replikátum). A tanulmány alapját a NCCLS Document EP5-T2 irányelvei adták.<sup>22</sup> Az eredmények kiértékelése a SAS PROC VARCOMP-val történt. A statisztikai modell illesztés random effekt lineáris modellen alapul.<sup>23</sup>

| Átlag (ng/mL) | Intra assay (% C.V.) | Teljes eltérés (% C.V.) |
|---------------|----------------------|-------------------------|
| 8.6           | 11.7                 | 9.4                     |
| 22.7          | 10.5                 | 8.2                     |
| 33.0          | 8.6                  | 9.1                     |
| 49.0          | 12.5                 | 11.0                    |

### 16.2 Megbízhatóság

Az assay megbízhatósága visszanyerési és hígítási teszt segítségével lett ellenőrizve .

#### LINEARITÁS (SOROZATHÍGÍTÁS)

Sorozat hígítási tanulmány 4 minta használatával (mértékegység = ng/mL)

| Minta | Hígítatlan | 1/2  | 1/4  |
|-------|------------|------|------|
| 1     | 74.6       | 79.4 | 74.8 |
| 2     | 87.8       | 96.4 | 95.2 |
| 3     | 85.6       | 88.2 | 82.4 |
| 4     | 55.2       | 57.8 | 60.4 |

### Visszanyerés

Ismert mennyiségű 25-OH-D<sub>3</sub> került hozzáadásra páciens mintához, majd a visszanyerés százaléka lett meghatározva.

| Minta szám | Kiindulási konc. (ng/mL) | Hozzáadott konc. (ng/mL) | *Várt konc. (ng/mL) | Mért konc. (ng/mL) | Visszanyerés |
|------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|--------------|
| 1          | 15.8                     | 5.0                      | 25.5                | 24.8               | 97%          |
|            |                          | 10.0                     | 35.1                | 41.8               | 119%         |
|            |                          | 25.0                     | 62.7                | 61.9               | 99%          |
| 2          | 51.2                     | 5.0                      | 60.6                | 62.0               | 102%         |
|            |                          | 10.0                     | 69.8                | 73.8               | 106%         |
|            |                          | 25.0                     | 96.4                | 99.4               | 103%         |
| 3          | 26.6                     | 5.0                      | 36.2                | 33.5               | 92%          |
|            |                          | 10.0                     | 45.7                | 54.0               | 118%         |
|            |                          | 25.0                     | 73.0                | 82.8               | 113%         |
| 4          | 57.3                     | 5.0                      | 66.6                | 63.8               | 96%          |
|            |                          | 10.0                     | 75.8                | 78.1               | 103%         |
|            |                          | 25.0                     | 102**               | 104**              | 102%         |
| 5          | 41.3                     | 5.0                      | 50.8                | 48.5               | 95%          |
|            |                          | 10.0                     | 60.1                | 56.1               | 93%          |
|            |                          | 25.0                     | 87.0                | 93.2               | 107%         |

\* A várt 25-OH-D koncentráció a hozzáadott oldat hígítási faktorával került meghatározásra.

\*\* Az értékek extrapolációval lettek meghatározva, > 100 ng/mL (legmagasabb kalibrátor)

### 16.3 Analitikai Szenzitivitás (Detektálási határ)

A szenzitivitás az a legkisebb mennyiség érték, mely a nullától 2 SD-val tér el. Ez az érték a 0. kalibrátor mérésével (n=20) 1.5 ng/mL-nek adódott. A szenzitivitási érték a kalibrátor 1 és egy szabadon választott kalibrátor használatával került meghatározásra.

### 16.4 Analitikai Specificitás

Az adatok százalékos formában fejezik ki a keresztreakciót 25-OH-D –ra 50%-os maximális kötés gátlás feltétele mellett.

| Szteroid       | % Keresztreakció |
|----------------|------------------|
| Vitamin D2     | 0.8              |
| Vitamin D3     | 0.8              |
| 25-OH-D2       | 100              |
| 25-OH-D3       | 100              |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100              |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100              |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100              |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100              |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11.0             |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11.0             |

### AZ IRODALOM ALAPJÁN

## TESZT PROTOKOLL

1. Minták extrakciója: Mérjen be 500 uL aceto-nitrilt üveg csőbe és óvatosan adjon hozzá 50 uL kalibrátort, kontrollt, mintát az aceto-nitril felszíné alá mérve. Vortexelje 10 másodpercig, majd centrifugálja 1200xg\* -vel 10 percig 20-25°C-on.
2. A következő reagenseket mérje be a csövekbe:

| Csővek/Reagensek             | Totál  | NSB    | Kal<br>0-6 | Kontrollok és<br>ismeretlen minták |
|------------------------------|--------|--------|------------|------------------------------------|
| 0 Extraktált Kalibrátorok    | -      | 25 µL  | -          | -                                  |
| Extraktált Kalibrátorok      | -      | -      | 25 uL      | -                                  |
| Extractált Kontrollok        | -      | -      | -          | 25 uL                              |
| Extractált ismeretlen minták | -      | -      | -          | 25 uL                              |
| Tracer                       | 50 uL  | 50 uL  | 50 uL      | 50 uL                              |
| NSB/Addíciós puffer          | 1.0 mL | 1.0 mL | -          | -                                  |
| 25-OH-D Antiszérum           | -      | -      | 1.0 mL     | 1.0 mL                             |

3. Alapos keverés; inkubáció 90 perc (+/- 10 perc) 20-25°C-on.
4. Mérjen valamennyi csőbe 500 uL DAG precipitáló komplexet, kivéve a totált.
5. Alapos keverés; inkubáció 20-25 perc 20-25°C-on.
6. Mérjen valamennyi csőbe 500 uL NSB/Addíciós Puffert, kivéve a totált.
7. Centrifugálja 1800 x g\*-vel 20 percig.
8. Öntse le a felülúszót.
9. Mérje le valamennyi csövet gamma számlálóval legalább 60 másodpercig.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{sugár cm-ben}) (\text{rpm})^2$$

## TEST <sup>125</sup>I RIA KE STANOVENÍ 25-HYDROXYVITAMÍNU D

### 1. POUŽITÍ

URČENO K DIAGNOSTICKÉMU POUŽITÍ *IN VITRO*.

Tato souprava je určena ke kvantitativnímu stanovení 25-hydroxyvitamínu D (25-OH-D) a dalších hydroxylovaných metabolitů vitamínu D v lidském séru nebo plazmě k vyhodnocení dostatku vitamínu D. Při rozhodování o léčbě dospělých pacientů je nutné, aby kliničtí lékaři využívali výsledky stanovení společně s dalšími klinickými a laboratorními údaji.

### 2. SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Jakmile kalciferol (vitamín D) vstoupí do oběhu, je metabolizován na několik forem; hlavní z nich je 25-hydroxykalciferol (25-OH-D). První krok metabolizace vitamínu D, 25 hydroxylace, probíhá hlavně v játrech.<sup>1</sup> Pouze malé množství 25-OH-D je v lidském těle metabolizováno v ledvinách na jiné metabolity dihydroxyvitamínu D.<sup>2,3</sup> Jelikož převládající oběhová forma vitamínu D u jedince různým způsobem, je důležité měřit obě formy považována za nejspolehlivější ukazatel stavu vitamínu D.<sup>4</sup>

Dvě hlavní formy 25-OH-D jsou cholekalciferol (vitamín D<sub>3</sub>) a ergokalciferol (vitamín D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> Vitamín D<sub>3</sub> je získáván především působením ultrafialového záření na pokožku, zatímco D<sub>2</sub> je získáván pouze ze stravy. Jelikož tyto dvě mateřské složky přispívají k celkovému stavu vitamínu D u jedince různým způsobem, je důležité měřit obě formy stejně.<sup>6,7</sup> Velká část výzkumu poskytuje informace o metabolismu cirkulujících úrovní 25-OH-D a jejich fyziologické významnosti.

Měření 25-OH-D je považováno za stále významnější při léčbě pacientů s různými poruchami metabolizace kalcia spojenými s rachitidou, neonatální hypokalcémií, těhotenstvím, nutriční a renální osteodystrofií, hypoparathyroidismem a postmenopauzální osteoporózou.<sup>6,8-10</sup> POZNÁMKA: Výkonnostní charakteristika testu DiaSorin 25-OH-D nebyla stanovena pro pediatrické pacienty.

### 3. PRINCIP ANALÝZY

Test DiaSorin 25-OH-D sestává z dvoustupňového postupu. První stupeň obsahuje rychlou extrakci 25-OH-D a dalších hydroxylovaných metabolitů ze séra nebo plasmy acetonitrilem. Po extrakci se připravený vzorek analyzuje pomocí rovnovážné RIA. Metoda RIA je založena protilátkách se specificitou pro 25-OH-D. Vzorek, protilátka a izotopový indikátor se inkubují 90 minut při 20-25°C. Separace fází se provádí po 20 minutách inkubace při 20-25°C precipitační složkou – druhou protilátkou. Po této inkubaci a před centrifugací se přidá pufr NSB / přísada k usnadnění redukce nespecifických vazeb.

### 4. REAGENCIE DODANÁ V TESTU

|                                    |                      |
|------------------------------------|----------------------|
| 25-OH-D – kalibrátory              | 6 lahvíček po 1 ml   |
| 25-OH-D pufr NSB / přísada         | 1 lahvička po 70 ml  |
| 25-OH-D – antisérum                | 1 lahvička po 105 ml |
| 25-OH-D – izotopový indikátor      | 1 lahvička po 6 ml   |
| 25-OH-D – precipitační komplex DAG | 2 lahvičky po 30 ml  |
| 25-OH-D – kontrolní vzorky         | 2 lahvičky po 1 ml   |
| 25-OH-D – acetonitril              | 2 lahvičky po 15 ml  |
| Počet testů                        | 100                  |

UCHOVÁVÁNÍ: Po přijetí je nutno soupravu uchovávat při teplotě 2-8°C. Po otevření uchovávejte každé reagens při teplotě 2-8°C do uplynutí data expirace vyznačeného na obalu. Reagencie nelze použít po uplynutí data expirace. Datum expirace testu je uvedeno na vnějším štítku a odpovídá datu expirace izotopového indikátoru.

Reagencie z různých šarží se nesmí navzájem kombinovat.

**4.1 25-OH-D pufr NSB / přísada:** reagens připravené k použití

Želatinový pufr s fosforečnanem, obsahující 0,1% azidu sodného. Tato komponenta má dvojí funkci. Slouží jako pufr NSB a jako přísadový pufr.

**4.2 25-OH-D<sub>3</sub> – kalibrátory:** reagens připravené k použití

Šest kalibrátorů (25-OH-D<sub>3</sub>) v koncentracích od 0 do 100 pg/ml, předem rozpuštěných ve zpracovaném lidském séru, obsahující 0,1% azidu sodného. Zacházejte s těmito reagensy opatrně (viz Varování a zvláštní opatření). Kalibrátory testu jsou kalibrovány pomocí UV kvantifikace a byly ověřeny analýzou HPLC. Kalibrátory testu vykazují komutativnost se vzorky pacientů, pokud jsou používány s reagensy a provozními postupy tohoto diagnostického testu in vitro dle uvedených doporučení.

**POZNÁMKA:** Je-li třeba, lze vytvořit „volitelný“ kalibrátor (2,5 ng/ml) zředěním kalibrátoru ze sady „1“ v poměru 1:2 s kalibrátorem ze sady nula (tj. 100 µl „1“ + 100 µl „0“). Toto zředění je třeba provést před extrakcí a poté extrahovat podle příbalové informace produktu.

**4.3 25-OH-D – antisérum :** reagens připravené k použití.

Sérum s kožními protilátkami proti 25-OH-D, ředěné fosfátovým želatinovým pufrem obsahujícím 0,1% azidu sodného.

**4.4 25-OH-D<sub>3</sub> – izotopový indikátor:** reagens připravené k použití

Analog 25-OH-D<sub>3</sub> značný jódem [<sup>125</sup>I], rozpuštěný v ethanol-fosfátovém pufru. Zacházejte s tímto reagens opatrně (viz Varování a zvláštní opatření).

**4.5 Precipitační komplex (oslí protikozí protilátky – DAG)** reagens připravené k použití.

Oslí protikozí sérum, normální kozí sérum a polyethylen glykol, rozpuštěné v BSA-boritanovém pufru obsahujícím gentamicin sulfát a 0,1% azidu sodného. Míchejte 5 až 10 minut před použitím a v jeho průběhu, aby se zachovala homogenní struktura suspenze.

**4.6 25-OH-D – kontrolní vzorky:** reagens připravené k použití.

Lidské sérum obsahující 0,1% azidu sodného, s přidavkem příslušného množství 25-OH-D<sub>3</sub> k získání kontrolních koncentrací v rámci specifikovaných rozsahů. Důkladně promíchejte a zacházejte s nimi stejně jako s neznámými vzorky. Kontrolní vzorek 1 reprezentuje dolní limit normálního rozsahu, kontrolní vzorek 2 reprezentuje horní limit normálního rozsahu. Rozsah koncentrací každé kontroly je uveden na certifikátu testu a indikuje limity zavedené firmou DiaSorin pro hodnoty kontrol, které lze získat ve spolehlivých stanoveních. Zacházejte s těmito reagensy opatrně (viz Varování a zvláštní opatření).

**4.7 Acetonitril:** reagens připravené k použití.

Acetonitril. Vymezené použití s touto sadou. Zacházejte s tímto reagens opatrně (viz Varování a zvláštní opatření). Tento výrobek obsahuje suchý přírodní latex.

## 5. VÁROVÁNÍ A ZVLÁŠTNÍ OPATŘENÍ

URČENO K DIAGNOSTICKÉMU POUŽITÍ IN VITRO.

Není určeno k vnitřnímu ani vnějšímu použití u lidí ani zvířat.

**UPOZORNĚNÍ:** Tento test mohou přijímat, pořizovat, vlastnit a používat pouze lékaři, klinické laboratoře, nemocnice, veterinární lékaři nebo výzkumná zařízení. Testy smí provádět pouze příslušně kvalifikovaný a vyškolený zdravotnický personál.

### REAGENCIE OBSAHUJÍ MATERIÁL LIDSKÉHO PŮVODU

**Nakládejte s nimi, jako by byla potenciálně infekční.**

Každá jednotka séra/plazmy jednoho dárce, použitá při přípravě tohoto výrobku, byla testována metodou schválenou FDA USA a bylo zjištěno, že je nereaktivní na přítomnost HbsAg, protilátek proti HCV a protilátek proti HIV1/2. Ačkoli jsou tyto metody velmi přesné, nezaručují, že budou detekovány všechny infikované jednotky. Tento výrobek rovněž může obsahovat další materiál lidského původu, pro který neexistuje schválený test. Vzhledem k tomu, že žádná známá testovací metoda nemůže nabídnout úplnou jistotu, že výrobek neobsahuje virus hepatitidy B, virus hepatitidy C (HCV), virus lidské imunodeficiency (HIV) ani další infekční agens, je nutné se všemi výrobky, které obsahují materiál lidského původu, nakládat v souladu se správnou laboratorní praxí a používat vhodná bezpečnostní opatření popsaná v manuálu středisek pro kontrolu a prevenci onemocnění / státních zdravotních ústavů

„Biologická bezpečnost v mikrobiologických a biomedicínských laboratořích“ (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories), 4. vydání, květen 1999, nebo současné vydání.

#### **REAGENCIE OBSAHUJÍCÍ AZID SODNÝ**

**UPOZORNĚNÍ:** Některé reagenty v této soupravě obsahují azid sodný. Azid sodný může reagovat s olověným a měděným potrubím za vzniku vysoce výbušných azidů kovů. Při likvidaci propláchněte potrubí velkým množstvím vody, zabráníte tak kumulaci azidu (Směrnice Rady 1999/45/EC). Další informace naleznete v dokumentu „Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts“ v příručce Manual Guide-Safety Management No. CDC-22, vydané Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, 1976.

#### **Rizikové věty nebezpečných látek podle Evropského společenství (Směrnice Rady 1999/45/EC)**

R 20/21/22 – Zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití.

R 32 – Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.

S28 – Při styku s kůží okamžitě omyjte velkým množstvím vody.

#### **REAGENCIE OBSAHUJÍCÍ ACETONITRIL**

#### **Rizikové věty nebezpečných látek podle Evropského společenství (Směrnice Rady 88/379/EEC)**

R11 – Vysoce hořlavý.

R23/24/25 – Toxický při vdechování, styku s kůží a při požití.

S16 – Chraňte před otevřeným ohněm. Zákaz kouření.

S36 – Používejte vhodný ochranný oděv.

S43 – V případě požáru použijte suché chemické hasivo nebo oxid uhličitý.

S45 – V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc.

S51 – Používejte pouze v dobře větraných prostorách.

#### **REAGENCIE OBSAHUJÍCÍ ETHANOL**

#### **VAROVÁNÍ – HOŘLAVINA**

#### **Rizikové věty nebezpečných látek podle Evropského společenství (Směrnice Rady 88/379/EEC)**

R11 – Vysoce hořlavý.

S16 – Chraňte před otevřeným ohněm. Zákaz kouření.

S43 – V případě požáru použijte suché chemické hasivo nebo oxid uhličitý.

#### **REAGENCIE OBSAHUJÍCÍ JÓD-125**

Tato souprava obsahuje radioaktivní materiál v dávce nepřevyšující 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) jódu-125. Při uskladnění tohoto materiálu, manipulaci s ním a jeho likvidaci se musí používat příslušná opatření a zásady správné laboratorní praxe.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci obecné licence:

Tento radioaktivní materiál mohou obdržet, nabývat, vlastnit a používat pouze lékaři, veterináři, kteří vykonávají veterinární praxi, klinické laboratoře nebo nemocnice, a to pouze pro účely klinických nebo laboratorních testů in vitro, při nichž není materiál ani záření, jež z něj vychází, aplikováno vnitřně ani vnějšně lidem ani zvířatům. Jeho obdržení, nabytí, držení, užívání a přeprava podléhá předpisům a obecné licenci Komise pro dohled nad jadernou bezpečností USA (U.S. Nuclear Regulatory Commission) nebo státu, s nímž komise uzavřela dohodu o výkonu regulační pravomoci.

1. Skladování radioaktivního materiálu se musí omezovat pouze na určený prostor.
2. Přístup k radioaktivnímu materiálu smí mít pouze oprávněný personál.
3. Radioaktivní materiál nepipetujte ústy.
4. Při práci v prostorech určených k práci s radioaktivním materiálem nejezte, nepijte ani nekuřte.
5. V případě rozlití je nutno materiál setřít, potom omýt alkalickým detergentem nebo roztokem k radiologické dekontaminaci. Veškeré použité sklo se musí úplně umýt vodou před mytím s jiným laboratorním sklem.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci specifické licence:

přijetí, použití, transport a likvidace radioaktivních materiálů podléhá předpisům a podmínkám specifické licence.

**VAROVÁNÍ:** Tento výrobek obsahuje chemickou látku, o níž je státu Kalifornie známo, že způsobuje rakovinu.

**POZOR:** Hodnoty radioaktivity uvedené na příbalové informaci v balení se mohou mírně lišit od hodnot uvedených na označení krabice a na označení lahvičky s izotopovým indikátorem. Označení krabice a lahvičky s izotopovým indikátorem označuje množství radioaktivity k datu kalibrace; příbalová informace v balení označuje teoretickou radioaktivitu soupravy.

## 6. PŘÍZNAKY MOŽNÉHO ZHORŠENÍ JAKOSTI REAGENCIÍ V SOUPRAVĚ

- 6.1 Přítomnost abnormálních pevných částic v kterémkoli reagens. (Pufr NSB, antisérum a precipitační reagens DAG mohou být zakalené).
- 6.2 Posun sklonu nebo polohy kalibrační křivky ve srovnání s běžně získanou křivkou.
- 6.3 Pokles maximální vazebné kapacity.
- 6.4 Vysoká nespecifická vazba.

## 7. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

K extrakci 25-OH-D je třeba padesát (50) mikrolitrů séra nebo plazmy (EDTA nebo heparin); objem 150 mikrolitrů umožní opakovanou analýzu a také bude postačovat k adekvátnímu pipetování.

V této soupravě může být použito lidské sérum nebo plazma. S touto soupravou lze použít antikoagulanty EDTA. Doporučuje se použít vzorky odebrané nalačno, není to však nutné. Odběr krve se musí provést aseptickou venepunkcí do 5 ml nebo 10 ml evakuované skleněné zkumavky. Nechte krev vysrážet při pokojové teplotě (15-25°C). Centrifugujte 15 minut přibližně při 760 x g\* k získání séra bez produktů hemolýzy. K zachování integrity vzorku není nutné přidání konzervačních látek ani přísad. Veškeré plasty, sklo a další materiál, které přicházejí do styku se vzorkem, musí být bez jakékoli kontaminace. Vzorky séra nebo plazmy skladujte při teplotě -20°C nebo nižší. Vzorky lze uchovávat ve skleněných nebo plastových zkumavkách; tyto však musí být pevně uzavřené, aby se předešlo vysušení vzorku.

Studie provedená firmou DiaSorin s omezeným počtem patientských vzorků prokázala stabilitu vzorků až po dobu 9 týdnů, byly-li skladovány při teplotě 20°C. Po 3 cyklech zmrazení a rozmrazení vzorky nevykazují žádné podstatné změny. Zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorků. Při transportu musí být vzorky obecně zmrazené.

## 8. POTŘEBNÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Jednorázové zkumavky z borokřemičitého skla, 12 x 75 mm.  
**POZNÁMKA:** Použití plastových zkumavek s touto soupravou není vhodné.
- Centrifuga s regulovanou teplotou, která pojme 12 x 75 mm zkumavky.
- Detektor gama záření citlivý na jód-125.
- Třepačka vortex.
- Pipetovací zařízení
  - a. Mikropipety kalibrované na 25 µL a 50 µL (přesnost nižší nebo rovna ± 1%).
  - b. Dispensory schopné opakovaně dávkovat s hroty kalibrovanými na 50 µL, 500 µL a 1,0 ml (nepřesnost menší nebo rovna ± 1%).

**POZNÁMKA:** Specifikace pipetování pro níže uvedené postupy extrakce a stanovení viz část „Potřebný materiál a vybavení, které nejsou součástí dodávky“.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{poloměr v cm}) (\text{ot/min})^2$$



## 9. POSTUP EXTRAKCE

- 9.1 Vytvořte sadu skleněných zkumavek na jedno použití 12 x 75 mm pro každý kalibrátor a pro kontrolní a patientský vzorek.
- 9.2 Do každé zkumavky přidejte 500 µl acetonitrilu.
- 9.3 Umístěte pipetovací špičku obsahující 50 µL kalibrátoru, kontrolního vzorku nebo patientského vzorku, pod hladinu acetonitrilu a POMALU je přidejte do acetonitrilu.
- 9.4 Promíchejte na třepačce vortex 10 sekund.
- 9.5 Centrifugujte při 1200 x g\* po dobu 10 minut při teplotě 20-25°C.
- 9.6 Ze supernatantu odpipetujte duplicitní vzorky (25 µL) do oddělené, vhodně označené zkumavky 12 x 75 mm. **UPOZORNĚNÍ:** Dávejte pozor, abyste nepoškodili tabletu.
- 9.7 Podle postupu stanovení analyzujte supernatanty.

## 10. POSTUP STANOVENÍ

- 10.1 Všechny reagenty a vzorky nechte temperovat na pokojovou teplotu. Zabráňte zahřátí reagentů na teplotu více než 25°C.
- 10.2 Vytvořte sadu označených zkumavek na jedno použití 12 x 75 mm podle schématu testu uvedeného na poslední straně.
- 10.3 Přidejte reagenty v následujícím pořadí:
  - a. **Zkumavky ke stanovení celkového počtu impulsů**  
50 µl <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 ml pufru NSB / přísady
  - b. **Zkumavky na nespecifickou vazbu (NSB)**  
25 µL kalibrátoru 0 (extrahovaný)  
50 µl <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 ml pufru NSB / přísady
  - c. **Kalibrátory, kontrolní a neznámé vzorky**  
25 µL kalibrátoru, kontrolního nebo neznámého vzorku (extrahované)  
50 µl <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 ml antiséra 25-OH-D
- 10.4 Jemně promíchejte na třepačce vortex (nesmí dojít k napěnění) a inkubujte 90 minut (+/-10 minut) při 20-25°C.
- 10.5 Do každé zkumavky kromě zkumavek ke stanovení celkového počtu impulsů přidejte 500 µL precipitační složky DAG (precipitační složku DAG je třeba před použitím a v jeho průběhu důkladně promíchat).
- 10.6 Zkumavky dobře promíchejte a inkubujte 20-25 minut při 20-25°C.
- 10.7 Přidejte 500 µl pufru NSB / přísady do všech zkumavek kromě zkumavek ke stanovení celkového počtu impulsů. Jemně promíchejte na třepačce vortex, aby se obsah dobře promíchal. Při provádění tohoto kroku postupujte opatrně, abyste zabránili rozstříknutí kvůli vysokému obsahu kapaliny ve zkumavce.
- 10.8 Všechny zkumavky kromě zkumavek ke stanovení celkového počtu impulsů centrifugujte 20 minut při 20-25°C a při 1800 x g\*.
- 10.9 Slijte všechny supernatanty (kromě zkumavek ke stanovení celkového počtu impulsů) za použití držáku z pěnového plastu nebo ekvivalentního zařízení tak, že držák obrátíte do příslušné nádoby na odpad. Obrácený držák umístěte na absorpční papír na dobu 2-3 minuty. Zkumavky jemně osušte, aby se odstranila veškerá kapalina.
- 10.10 Každou zkumavku změřte detektorem gamma záření po dobu 1 minuty. Každou zkumavku je třeba měřit dostatečnou dobu, aby byla zachována přesnost statistického zpracování. (Viz část s výsledky: Omezení postupu.)

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{poloměr v cm}) (\text{ot/min})^2$$

## 11. POZNÁMKY K POSTUPU

- 11.1 Přidejte každou alikvotní část reagentie do dolní třetiny testovací zkumavky; zajistíte tak dokonalé promíchání reagentií.
- 11.2 K dokonalému monitorování soustavné kvality testu RIA je možno kontrolovat další faktory. Společnost DiaSorin doporučuje k zajištění soustavné kvality testu pravidelné kontroly následujících parametrů.
- Celkový počet impulsů**
  - Maximální vazba**  
Průměrný počet částic za minutu (CPM) zkumavek s nulovým kalibrátorem / průměrná hodnota CPM zkumavek TC.
  - Nespecifická vazba**  
Průměrný počet částic za minutu (CPM) zkumavek NSB / průměrná hodnota CPM zkumavek TC.
  - Sklon kalibrační křivky**  
Na každé kalibrační křivce například monitorujte body 80 a 50%.

## 12. ŘÍZENÍ JAKOSTI

K monitorování funkce testu musí každá laboratoř při každém testu použít nejméně dva kontrolní vzorky (jeden kontrolní vzorek s dolním limitem normálního rozsahu a jeden kontrolní vzorek s horním limitem normálního rozsahu). Lze použít komerčně dostupné kontrolní vzorky nebo dva referenční vzorky dodané se soupravou. Kontrolní vzorky vyhodnotila společnost DiaSorin pomocí testu DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D<sup>125</sup>I RIA. Rozsah koncentrací každé kontroly je uveden na certifikátu testu a indikuje limity zavedené firmou DiaSorin pro hodnoty kontrol, které lze získat ve spolehlivých stanoveních.

S kontrolními vzorky je nutno zacházet jako s neznámými vzorky a musí se testovat duplicitně. Funkce kontrolních vzorků se musí sledovat prostřednictvím grafů kontroly kvality. Přijatelné limity funkčnosti je nutno určit pro každou individuální laboratoř a pro každou úroveň kontroly pomocí statistických metod určených k detekci náhodných i systémových chyb. Kontrolní výsledky musí splňovat kritéria laboratoře co se týče přijatelnosti před hlášením výsledků testů pacientů.<sup>18,19,20</sup>

## 13. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Existuje mnoho metod výpočtu výsledků testů RIA. Všechny jsou založeny na získání kalibrační křivky zakreslením rozsahu vazby v závislosti na stanovených koncentracích kalibrátorů. Tento graf může být v lineárních nebo logaritmických souřadnicích. Každá z těchto metod poskytuje v zásadě stejné hodnoty kontrolních vzorků a vzorků, ačkoli některé testy se mohou lépe „hodit“ pro jednu metodu, a jiné pro druhou. Metoda výpočtu laboratoře kontroly kvality společnosti DiaSorin je závislost % B/B<sub>0</sub> na logaritmickém průběhu koncentrace.

- 13.1 Vypočítejte průměrnou hodnotu CPM pro každý kalibrační, kontrolní a neznámý vzorek.
- 13.2 Odečtete průměrnou hodnotu CPM od hodnot pro zkumavky NSB pro všechna měření.
- 13.3 Vydělte korigovaný CPM každého kalibrátoru, kontrolního vzorku nebo vzorku pacienta upraveným CPM kalibrátoru 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM kalibrátoru nebo vzorku pacienta} - \text{CPT zkumavky NSB}}{\text{CPM kalibrátoru 0} - \text{CPM zkumavky NSB}} \times 100$$

- 13.4 Za použití 2fázového papíru typu semi-log nebo log/logit zakreslete procentuální B/B<sub>0</sub> (%) pro kalibrátory 25-OH-D (na svislou osu) a koncentraci (na vodorovnou osu).
- 13.5 Body spojte optimální křivkou.

- 13.6** Interpolujte koncentrace 25-OH-D ve vzorcích pacienta z grafu kalibrátorů.
- 13.7** Pokud byl některý z neznámých vzorků zředěn, proveďte korekci podle příslušného dilučního faktoru.
- 13.8** Vypočítejte maximální vazbu dělením CPM nulového kalibrátoru průměrným celkovým výsledkem získaným pro zkumavky TC.
- 13.9** K analýze dat lze také použít programy na automatickou redukci dat. Firma DiaSorin používá systém RIACalc (Pharmacia) s programem typu „smooth-SPLINE fit“ používajícím závislost  $\%B/B_0$  na logaritmickém průběhu koncentrace. Další metody redukce dat se musí před začleněním do normálního použití validovat.

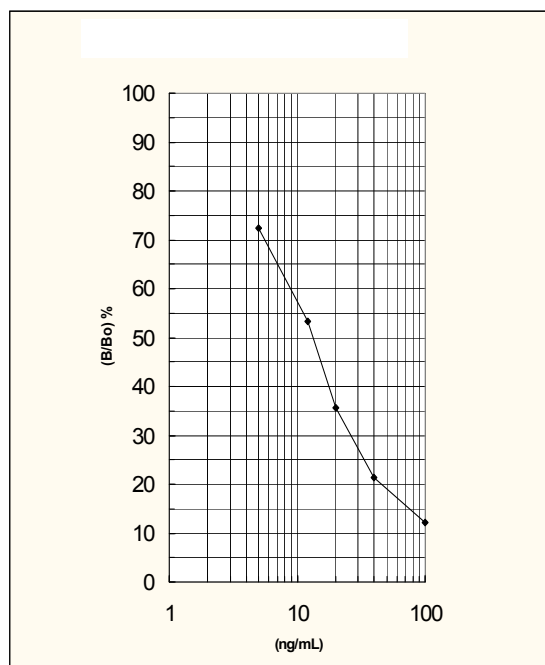
**TABULKA I**

Vzorová data testu DiaSorin 25-OH-D Vitamin D RIA

| Zkumavka              | Paralelní CPM                    | Průměrný CPM | Korigovaný CPM | Navázané procento (B/T) | Procento (B/B <sub>0</sub> ) | Graf konc. (ng/ml) |
|-----------------------|----------------------------------|--------------|----------------|-------------------------|------------------------------|--------------------|
| Celkový počet impulsů | 41878                            | 40901        |                |                         |                              |                    |
| NSB                   | 39924<br>555<br>508              | 531          |                | 1,3                     |                              |                    |
| Kalibrátor 0          | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822        | 19291          | 48,5                    |                              |                    |
| Kalibrátory           |                                  |              |                |                         |                              |                    |
| 1                     | 14503<br>14442                   | 14472        | 13941          |                         | 72,3                         | 5                  |
| 2                     | 11005<br>10670                   | 10838        | 10307          |                         | 53,4                         | 12                 |
| 3                     | 7182<br>7642                     | 7411         | 6880           |                         | 35,7                         | 20                 |
| 4                     | 4687<br>4622                     | 4654         | 4123           |                         | 21,4                         | 40                 |
| 5                     | 2768<br>2985                     | 2877         | 2346           |                         | 12,2                         | 100                |
| Neznámé vzorky        |                                  |              |                |                         |                              |                    |
| 1                     | 10365<br>10447                   | 10406        |                |                         | 53,9                         | 12,8               |
| 2                     | 4219<br>4720                     | 4634         |                |                         | 24,0                         | 40,4               |

Údaje typických vzorků a kalibrační křivku viz TABULKA I a OBRÁZEK 1; tyto informace slouží pouze jako referenční údaj a nelze je použít k výpočtu.

#### STANDARDNÍ KŘIVKA VZORKU 25-HYDROXYVITAMÍNU D



OBRÁZEK 1

#### 14. OMEZENÍ POSTUPU

- 14.1 Doba detekce musí být dostatečně dlouhá, aby se zamezilo zanesení statistické chyby (např. při akumulaci 2000 CPM bude chyba 5% a při 10000 CPM bude chyba 1%).
- 14.2 Při rozhodování o léčbě jednotlivých pacientů je nutné, aby kliničtí lékaři využívali výsledky testů společně s dalšími klinickými a laboratorními údaji.
- 14.3 Vliv hemolýzy nebo lipémie ve vzorcích pacientů nebyl u tohoto testu vyhodnocován; nicméně u extrakce acetonitrem se předpokládá, že minimalizuje jakoukoli interferenci způsobovanou těmito vlivy.
- 14.4 Největším zdrojem nepřesností v této metodě je pravděpodobně extrakce. Mezi ostatní zdroje procedurální nepřesnosti mohou patřit nepřesné mikropipetory nebo reagentie s prošlou dobou životnosti.
- 14.5 Protilátka obsažená v testu vykazuje jistou křížovou reaktivitu se všemi formami dihydroxyvitaminu D2 a steroidů D3; nicméně u lidí se tyto látky vyskytují pouze v pikomolárních koncentracích.

**POZNÁMKA:** Výkonnostní charakteristika tohoto testu nebyla stanovena pro pediatrické pacienty.

## 15. PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY

### Referenční rozmezí

Je důležité, aby každá laboratoř stanovila své vlastní referenční rozmezí, které je reprezentativní pro její typickou populaci. Je známo, že koncentrace 25-OH-D u lidí ovlivňují faktory jako např. vystavení vlivu UV záření<sup>9,10</sup>, roční období<sup>11,12</sup>, rasa<sup>7</sup> a přijímaná strava<sup>8</sup>. V literatuře byl prokázán pokles vitamínu D úměrný věku; nicméně výzkum prováděný ve většině těchto studií byl proveden v severoevropských zemích, kde se vyskytuje méně slunečního záření a kde je méně rozšířená fortifikace potravin<sup>8,15,16</sup>. Tato skutečnost spolu s vysokou variabilitou rozdílů v zdravotních kritériích a ve stavu léčení znesnadňuje generalizaci vlivu věku samotného na stav vitamínu D<sup>12</sup>. Výsledky ze studií provedených v USA jsou nejednoznačné; některé vykazují výskyt a druhé nepřítomnost poklesu obsahu vitamínu D v závislosti na věku. Bylo prokázáno, že antikonvulziva způsobují pokles hladiny 25-OH-D, stejně jako dlouhodobé používání ochranných opalovacích krémů s kyselinou p-aminobenzoovou<sup>17</sup>. U tohoto testu společnost DiaSorin nestanovila pediatrické referenční rozmezí.

Společnost DiaSorin za použití testu DiaSorin 25-Hydroxyvitamin D<sup>125I</sup> RIA vyhodnotila sérum odebrané 20 mužům a 24 ženám, zjevně zdravým dobrovolníkům, bělochům ze středovýchodu USA. Věk dobrovolníků byl mezi 23 a 67 lety. Vzorky byly odebrány během měsíce října. V této referenční skupině byl zjištěn pouze malý rozdíl mezi koncentracemi 25-OH-D u mužů (průměr = 21,7 ng/ml) a u žen (průměr = 24,7 ng/ml). Průměr pro celou skupinu (n = 44) byl 23,0 ng/ml s rozsahem + 2 SD 9,0–37,6 ng/ml.

Vysoká prevalence subklinického deficitu 25 OH vitamínu D mezi normálními zjevně zdravými jedinci byla pozorována v mnoha zemích, zejména v zimních měsících<sup>13,14</sup>. V nedávno zveřejněné literatuře je navržena následující klasifikace hladiny 25 OH vitamínu D: deficit: 0 až 5 ng/ml (0-12,5 nmol/l); nedostatek: 5 až 20 ng/ml (12,5-50 nmol/l); hypovitaminóza D: 20 až 40 ng/ml (50-100 nmol/l); dostatek: 40 až 100 ng/ml (100-250 nmol/l); a toxicita: vyšší než 100 ng/ml (>250 nmol/l).<sup>24</sup>

## 16. SPECIFICKÉ FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

### 16.1 Přesnost

Přesnost testu byla hodnocena společností DiaSorin testováním čtyř kontrolních rozmezí koncentrací v celém rozsahu křivky, a to po dobu 23 pracovních dnů za použití 40 testů. Každý test zahrnoval čtyři kontrolní vzorky a dvě extrakce (4 replikáty). Design studie byl konzistentní se směrnicemi CLSI (EP5-T2).<sup>22</sup> Výpočet dat byl proveden pomocí SAS PROC VARCOMP. Použitý statistický model je lineární model pro náhodné vlivy.<sup>23</sup>

| Průměr (ng/ml) | V rámci testu (% CV.) | Celková nepřesnost (% CV.) |
|----------------|-----------------------|----------------------------|
| 8,6            | 11,7                  | 9,4                        |
| 22,7           | 10,5                  | 8,2                        |
| 33,0           | 8,6                   | 9,1                        |
| 49,0           | 12,5                  | 11,0                       |

### 16.2 Správnost

Správnost stanovení byla ověřena pomocí dilučního testu a testu výtěžnosti.

#### LINEARITA (PARALELNOST)

Sériový diluční test 4 patientských vzorků (hodnoty = ng/ml)

| Vzorek | Neředěný | 1/2  | 1/4  |
|--------|----------|------|------|
| 1      | 74,6     | 79,4 | 74,8 |
| 2      | 87,8     | 96,4 | 95,2 |
| 3      | 85,6     | 88,2 | 82,4 |
| 4      | 55,2     | 57,8 | 60,4 |

### Výtěžnost

Ke vzorkům séra pacientů bylo přidáno známé množství 25-OH-D<sub>3</sub> a bylo stanoveno procento výtěžnosti.

| Vzorek č. | Poč. konc. (ng/ml) | Přidané množství (ng/ml) | *Předpokl. konc. (ng/ml) | Naměřená konc. (ng/ml) | Výtěžnost |
|-----------|--------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|-----------|
| 1         | 15,8               | 5,0                      | 25,5                     | 24,8                   | 97%       |
|           |                    | 10,0                     | 35,1                     | 41,8                   | 119%      |
|           |                    | 25,0                     | 62,7                     | 61,9                   | 99%       |
| 2         | 51,2               | 5,0                      | 60,6                     | 62,0                   | 102%      |
|           |                    | 10,0                     | 69,8                     | 73,8                   | 106%      |
|           |                    | 25,0                     | 96,4                     | 99,4                   | 103%      |
| 3         | 26,6               | 5,0                      | 36,2                     | 33,5                   | 92%       |
|           |                    | 10,0                     | 45,7                     | 54,0                   | 118%      |
|           |                    | 25,0                     | 73,0                     | 82,8                   | 113%      |
| 4         | 57,3               | 5,0                      | 66,6                     | 63,8                   | 96%       |
|           |                    | 10,0                     | 75,8                     | 78,1                   | 103%      |
|           |                    | 25,0                     | 102**                    | 104**                  | 102%      |
| 5         | 41,3               | 5,0                      | 50,8                     | 48,5                   | 95%       |
|           |                    | 10,0                     | 60,1                     | 56,1                   | 93%       |
|           |                    | 25,0                     | 87,0                     | 93,2                   | 107%      |

\* Výpočet předpokládané koncentrace 25-OH-D zahrnuje diluční faktor zavedený přidáním roztokem.

\*\* Toto jsou extrapolované hodnoty; naměřená koncentrace je > 100 ng/ml (kalibrátor horního limitu)

### 16.3 Analytická citlivost (detekční limity)

Bylo zjištěno, že citlivost tohoto testu, definovaná jako nejmenší množství odlišitelné od nuly při dvojnásobku standardní odchylky pod střední hodnotu cpm kalibrátoru nuly (n=20), je nižší než 1,5 ng/ml. Úroveň citlivosti se vztahuje na použití kalibrátoru „1“ a „volitelného“ kalibrátoru.

### 16.4 Analytická specifita

Údaje o křížové reaktivitě antiséra použitého v této soupravě jsou vyjádřeny jako poměr koncentrace 25-OH-D ke koncentraci zkřížené reagující látky při 50% potlačení maximální vazby.

| Steroid        | Zkřížená reaktivita (%) |
|----------------|-------------------------|
| Vitamín D2     | 0,8                     |
| Vitamín D3     | 0,8                     |
| 25-OH-D2       | 100                     |
| 25-OH-D3       | 100                     |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                     |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                     |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                     |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                     |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0                    |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0                    |

**SEZNAM LITERATURY VIZ POSLEDNÍ STRANA**

## SCHÉMA ANALÝZY

1. Extrakce vzorků: Nadávkuje 500 µl acetonitrilu do skleněné zkumavky a pod povrch acetonitrilu pomalu přidejte 50 µl kalibrátoru nebo kontrolního vzorku či vzorku pacienta. 10 sekund promíchejte na třepačce Vortex a odstředte při 1200 x g\* po dobu 10 minut při teplotě 20-25°C.
2. Reagens dávkuje podle následujícího schématu:

| Zkumavky/reagens             | Celkový počet impulsů | NSB    | Kal. 0-6 | Kontrolní a neznámé vzorky |
|------------------------------|-----------------------|--------|----------|----------------------------|
| Extrahované 0 kalibrátory    | -                     | 25 µl  | -        | -                          |
| Extrahované kalibrátory      | -                     | -      | 25 µl    | -                          |
| Extrahované kontrolní vzorky | -                     | -      | -        | 25 µl                      |
| Extrahované neznámé vzorky   | -                     | -      | -        | 25 µl                      |
| Izotopový indikátor          | 50 µl                 | 50 µl  | 50 µl    | 50 µl                      |
| Pufr NSB/přísada             | 1,0 ml                | 1,0 ml | -        | -                          |
| Antisérum 25-OH-D            | -                     | -      | 1,0 ml   | 1,0 ml                     |

3. Dobře promíchejte; inkubujte 90 minut (±10 minut) při 20-25°C.
4. Přidejte 500 µl precipitační složky DAG do všech zkumavek kromě zkumavek TC.
5. Dobře promíchejte a inkubujte 20-25 minut při 20-25°C.
6. Přidejte 500 µl pufru NSB/přísady do všech zkumavek kromě zkumavek TC.
7. Centrifugujte při 1800 x g\* po dobu 20 minut.
8. Slijte supernatanty.
9. Každou zkumavku měřte detektorem gama záření po dobu 60 minut nebo déle.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{poloměr v cm}) (\text{ot/min})^2$$

## 25-HYDROKSYVITAMIN D <sup>125</sup>I RIA-KIT

### 1. BRUKSOMRÅDE

FOR BRUK TIL *IN VITRO*-DIAGNOSTIKK.

Dette kitet er beregnet på kvantitativ determinasjon av 25-hydroksyvitamin D (25-OH-D) og andre hydroksylerte vitamin D-metabolitter i humant serum eller human plasma som skal brukes i vurderingen av vitamin D-suffisiens. Analyseresultater skal brukes i sammenheng med øvrige kliniske data og laboratoriedata for å hjelpe klinikerne med å ta beslutninger om individuell pasientstyring i en voksen pasientpopulasjon.

### 2. SAMMENDRAG OG FORKLARING

Når kalisiferol (vitamin D) kommer inn i sirkulasjonen, metaboliseres det til flere former. Hovedformen er 25-hydroksykalsiferol (25-OH-D). Det første trinnet i metabolismen av vitamin D, 25-hydroksyleringen, skjer hovedsakelig i leveren.<sup>1</sup> Hos mennesker metaboliseres kun en liten mengde 25-OH-D i nyrene til andre metabolitter av typen dihydroksy-D-vitamin.<sup>2,3</sup> Siden 25-OH-D er den dominerende sirkulerende formen av vitamin D hos normalpopulasjonen, anses den å være det mest pålitelige indisium på vitamin D-status.<sup>4</sup>

De to hovedformene av 25-OH-D er kolekalsiferol (vitamin D<sub>3</sub>) og ergokalsiferol (vitamin D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> Vitamin D<sub>3</sub> dannes hovedsakelig fra effektene til ultrafiolett lys på huden, mens D<sub>2</sub> utelukkende kommer fra kostholdet. Siden begge disse overordnede substansene bidrar på flere måter til individets samlede vitamin D-status, er det viktig at begge former måles i lik grad.<sup>6,7</sup> En stor mengde forskning har gitt informasjon om sirkulasjonsnivåene av 25-OH-D-metabolisme og deres fysiologiske betydning.

Målingen av 25-OH-D får stadig større betydning for styringen av pasienter med ulike forstyrrelser i kalsiummetabolismen ved rakitt, neonatal hypokalsemi, graviditet, ernæringsmessig og renal osteodystrofi, hypoparathyroidisme og postmenopausal osteoporose.<sup>6,8-10</sup> NB: Utførelsesegenskapene til DiaSorin 25-OH-D-analysen har ikke blitt etablert i en pediatrik populasjon.

### 3. ANALYSEPRINSIPPER

DiaSorin 25-OH-D-analysen består av to trinn. Den første prosedyren involverer en hurtig ekstraksjon av 25-OH-D og andre hydrolyserte metabolitter fra serum eller plasma ved hjelp av acetonitril. Etter ekstraksjonen analyseres den behandlede prøven ved hjelp av en likevekts-RIA-prosedyre. RIA-metoden er basert på et spesifikt antistoff med spesifisitet mot 25-OH-D. Prøven, antistoffet og sporstoffet inkuberes i 90 minutter ved 20-25°C. Faseseparasjon oppnås deretter ved å inkubere i 20 minutter ved 20-25°C med et utfellingskompleks med et sekundært antistoff. Etter denne inkubasjonen tilsettes NSB/tilsetningsbuffer før sentrifugering for å bidra til å redusere uspesifikk binding.

### 4. REAGENSER SOM FØLGER MED KITET

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| 25-OH-D kalibratorer           | 6 flasker/1 mL  |
| 25-OH-D NSB/tilsetningsbuffer  | 1 flaske/70 mL  |
| 25-OH-D antiserum              | 1 flaske/105 mL |
| 25-OH-D sporstoff              | 1 flaske/6 mL   |
| 25-OH-D DAG utfellingskompleks | 2 flasker/30 mL |
| 25-OH-D kontroller             | 2 flasker/1 mL  |
| 25-OH-D acetonitril            | 2 flasker/15 mL |
| Antall tester                  | 100             |



OPPBEVARING: Ved mottak skal kitet oppbevares ved 2-8°C. Etter åpning skal hver reagens oppbevares ved 2-8°C til utløpsdatoen som angis på etiketten. Reagenser må ikke brukes etter at de er gått ut på dato. Utløpsdatoen på kitet angis på den eksterne etiketten og tilsvarer utløpsdatoen på flasken med sporstoff.

Reagenser fra ulike partier må ikke blandes.

**4.1 25-OH-D NSB/tilsetningsbuffer:** reagens klar til bruk

Fosfat-gelatinbuffer med 0,1 % natriumazid. Denne komponenten har en dobbel funksjon. Den fungerer både som NSB-buffer og tilsetningsbuffer.

**4.2 25-OH-D<sub>3</sub>-kalibratører:** reagens klar til bruk

Seks (25-OH-D<sub>3</sub>) kalibratører ved konsentrasjoner i området 0-100 ng/mL forhåndsfortynnes i behandlet humant serum som inneholder 0,1 % natriumazid. Disse reagensene må behandles med omhu (se Advarsler og forholdsregler). Kitets kalibratører kalibreres ved hjelp av UV-kvantifisering og har blitt verifisert gjennom HPLC-analyse. Kit-kalibratørene kan betraktes som likeverdige med pasientprøver når de brukes med reagensene og operasjonsprosedyren som er anbefalt for denne diagnostiske in vitro-testen.

**MERK:** Ved behov kan en "ekstra" kalibrator (2,5 ng/mL) opprettes ved å fortynne kit-kalibratøren "1" 1:2 med kit-kalibratøren null (dvs. 100 µL "1" + 100 µL "0"). Denne fortynningen skal utføres før ekstraksjon og deretter ekstraheres i overensstemmelse med pakningsvedlegget.

**4.3 25-OH-D antiserum:** reagens klar til bruk.

Anti-25-OH-D-serum fra geit fortynnes i fosfat-gelatinbuffer med 0,1 % natriumazid.

**4.4 25-OH-D<sub>3</sub> sporstoff:** reagens klar til bruk.

En jodert [<sup>125</sup>I] analog til 25-OH-D<sub>3</sub> fortynnes i en etanol-fosfatbuffer. Disse reagensene må behandles med omhu (se Advarsler og forholdsregler).

**4.5 Utfellingskompleks av typen anti-geitserum fra esel (Donkey Anti-Goat – DAG):** reagens klar til bruk.

Anti-geitserum fra esel, normalt geitserum og polyetylen glykol er fortynnet i en BSA-boratbuffer med gentamycinsulfat og 0,1 % natriumazid. Bland i 5-10 minutter før og under bruk for å sikre at en homogen suspensjon oppnås.

**4.6 25-OH-D kontroll:** reagens klar til bruk.

Humant serum med 0,1 % natriumazid tilsettes den riktige mengden 25-OH-D<sub>3</sub> for å oppnå kontrollkonsentrasjoner innen de angitte områdene. Bland grundig og behandle dem på samme måte som ukjente prøver. Kontroll 1 representerer et lavt-normalt område og kontroll 2 representerer et høyt-normalt område. Konsentrasjonsintervallet for hver kontroll blir angitt på analysesertifikatet, og indikerer grensene som er fastsatt av DiaSorin for de kontrollverdiene som kan oppnås for pålitelige analyseoppsett. Disse reagensene må behandles med omhu (se Advarsler og forholdsregler).

**4.7 Acetonitril:** reagens klar til bruk.

Acetonitril. Kvalifisert for bruk med dette kitet. Disse reagensene må behandles med omhu (se Advarsler og forholdsregler). Dette produktet inneholder tørr naturgummi.

## 5. ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

FOR BRUK TIL IN VITRO-DIAGNOSTIKK.

Ikke avsett for innvortes eller utvortes bruk hos mennesker eller dyr.

**FORSIKTIG:** Dette produktet skal kun mottas, anskaffes, eies og brukes av leger, kliniske laboratorier, sykehus, veterinærer eller forskningsinstitusjoner. Testing skal kun utføres av laboratoriepersonale med tilstrekkelige kvalifikasjoner og opplæring.

## **REAGENSER SOM INNEHOLDER HUMANT KILDEMATERIALE**

### **Må behandles som potensielt infektøst.**

Hver serum/plasma-donorenhet som brukes ved preparering av dette produktet har blitt testet av en metode godkjent av amerikanske FDA og påvist ikke-reaktiv for tilstedeværelsen av HBsAg, antistoff mot HCV og antistoff mot HIV 1/2. Selv om disse metodene er svært nøyaktige, garanterer de ikke at alle infiserte enheter vil detekteres. Dette produktet kan også inneholde annet humant kildemateriale som det ikke foreligger godkjente tester for. Siden ingen kjent testmetode kan tilby fullstendig forsikring om at hepatitt B-virus (HBV), hepatitt C-virus (HCV), Humant immunsviktvirus (HIV) eller andre infektøse midler er fraværende, må alle produkter som inneholder humant kildemateriale håndteres i overensstemmelse med god laboratoriepraksis ved hjelp av egnede forholdsregler som beskrives i håndboken fra amerikanske Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4. utg., mai 1999 eller nåværende utgave.

## **REAGENSER SOM INNEHOLDER NATRIUMAZID**

**FORSIKTIG:** Noen reagenser i dette kitet inneholder natriumazid. Natriumazid kan reagere med bly- eller kopperrør og danne svært eksplosive metallazider. Ved avhending må det skylles ned med mye vann for å forhindre oppbygging av azid (EU-rådsdirektiv 1999/45/EC). Hvis du vil ha mer informasjon, kan du se "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," i håndboken Safety Management no. CDC-22 utgitt av Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA 1976.

### **EU-risikosestninger for farlige stoffer (rådsdirektiv 1999/45/EC)**

R 20/21/22 – Skadelig ved innånding, hudkontakt og svelging.

R 32 – Kontakt med syrer frigjør svært giftig gass.

S28 – Etter kontakt med hud, må du straks vaske med rikelig med vann.

## **REAGENSER SOM INNEHOLDER ACETONITRIL**

### **EU-risikosestninger for farlige stoffer (rådsdirektiv 88/379/EEC)**

R11 – Svært brannfarlig.

R23/24/25 – Giftig ved innånding, hudkontakt og svelging.

S16 – Hold på avstand fra tennkilder — Ingen røyking.

S36 – Bruk egnede verneklær.

S43 – Ved brannsløkking, bruk pulver eller karbondioksid.

S45 – Ved en ulykke eller hvis du føler deg uvel, oppsøk straks legehjelp.

S51 – Bruk kun i godt ventilerte områder.

## **REAGENSER SOM INNEHOLDER ETANOL**

**ADVARSEL – BRANNFARLIG** EU-risikosestninger for farlige stoffer (rådsdirektiv 88/379/EEC)

R11 – Svært brannfarlig.

S16 – Hold på avstand fra tennkilder — Ingen røyking.

S43 – Ved brannsløkking, bruk pulver eller karbondioksid.

## **REAGENSER SOM INNEHOLDER JOD-125**

Dette kitet inneholder radioaktivt materiale som ikke overstiger 4 µCi (148 kBq) jod-125. Passende forsiktighetstiltak og god laboratoriepraksis må overholdes ved oppbevaring, håndtering og avhending av dette materialet.

For praktikere eller institusjoner som mottar radioisotoper under en generell lisens.

Dette radioaktive materialet kan kun mottas, anskaffes, eies og anvendes av leger, veterinærer som praktiserer veterinærmedisin, kliniske laboratorier eller sykehus, og kun for in vitro kliniske eller laboratorietester som ikke omfatter innvortes eller utvortes administrasjon av materialet, eller stråling fra dette, til mennesker eller dyr. Mottak, anskaffelse, eierskap, bruk og overføring er underlagt forordningene og den generelle lisensen fra amerikanske Nuclear Regulatory Commission eller staten som kommisjonen har inngått en avtale med angående utøvelsen av lovgivende myndighet.

1. Oppbevaring av radioaktivt materiale skal begrenses til et spesifikt angitt område.
2. Tilgang til radioaktive materialer må utelukkende begrenses til autorisert personale.
3. Pipetter ikke radioaktivt materiale med munnen.
4. Spis eller drikk ikke innen angitte radioaktive arbeidsområder.
5. Områder der utslipp kan forekomme, skal tørkes og deretter vaskes med et alkalisk vaskemiddel eller en radiologisk dekontamineringsløsning. Alt brukt glasstøy må rengjøres grundig med vann før de vaskes med annet glasstøy i laboratoriet.

For praktikere eller institusjoner som mottar radioisotoper under en generell lisens: Mottak, bruk, overføring og avhending av radioaktive materialer er underlagt forordningene og betingelsene i din spesifikke lisens.

**ADVARSEL:** Dette produktet inneholder et kjemikalie som er kjent som kreftfremkallende i den amerikanske staten California.

**NB:** Radioaktivitet som er angitt på pakningsvedlegget kan variere noe fra radioaktiviteten som er trykt på etiketten på esken og etiketten på flasken med sporstoff. Etiketten på esken og flasken med sporstoff angir den faktiske mengden radioaktivitet ved kalibreringsdatoen, mens pakningsvedlegget angir kitets teoretiske radioaktivitet.

## 6. INDIKASJONER PÅ MULIG FORRINGELSE AV KIT-REAGENSER

- 6.1 Forekomsten av abnormt partikulært materiale i noen av reagensene. (NSB-buffer, antiserum og DAG-utfellingsreagenser kan være grumsete.)
- 6.2 En endring av kalibratorkurvens posisjon eller helling i forhold til det normale resultatet.
- 6.3 En reduksjon av maksimal binding.
- 6.4 En høy uspesifikk binding.

## 7. PRØVETAKNING OG -PREPARERING

Femti (50) mikroliter serum eller plasma (EDTA eller heparin) kreves for ekstraksjon av 25-OH-D. Et volum på 150 mikroliter vil gjøre det mulig å gjenta analysen og gi tilstrekkelig pipetteringsvolum.

Kitet kan brukes både med humant serum og human plasma. Antikoagulasene EDTA eller heparin kan brukes med denne analysen. En fasteprøve anbefales men er ikke et krav. Blod skal tas aseptisk ved hjelp av venepunksjon i et 5 eller 10 mL evakuert glassrør. La blodet levre seg ved romtemperatur (15-25°C). Sentrifuger i 15 minutter ved hjelp av ca. 760 x g\* for å oppnå sera uten hemolyse. Ingen tilsetningsmidler eller konserveringsmidler kreves for å opprettholde prøvens integritet. Alle plastartikler, glassvarer eller andre materialer som kommer i kontakt med prøven må være helt fri for kontaminerende stoffer. Serum- eller plasmaprøver må oppbevares ved -20 °C eller lavere. Prøver kan oppbevares i glass- eller plastflasker, forutsatt at de er tett forseglede slik at vann ikke fordunster.

I en studie utført av DiaSorin på et begrenset antall pasientprøver, viste prøvene seg å være stabile i opptil 9 uker når de ble oppbevart ved -20°C. Ingen signifikant endring av verdier ble observert etter at prøvene hadde gjennomgått 3 fryse-/tinesykluser. Gjentatte fryse-/tinesykluser bør unngås. Transporterte prøver bør generelt ankomme nedfrosne.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius i cm}) (\text{rpm})^2$$

## 8. UTSTYR OG MATERIALE SOM KREVES, MEN IKKE FØLGER MED

- Engangs borosilikatrør. 12 X 75 mm.  
**MERK:** Plastrør er ikke egnet for bruk med dette kitet.
- Temperaturregulert sentrifuge som passer for 12 X 75 mm rør.
- Gammateller som kan telle 125-jod.
- Rotasjonsblander.
- Pipetteringsinnretninger
  - a. Mikropipetter kalibrert til å levere 25 µL og 50 µL (presisjonsfeil mindre enn eller lik ± 1 %).
  - b. Repeterende dispensere med spisser som er kalibrert til å levere 50 µL, 500 µL og 1,0 mL (presisjonsfeil mindre enn eller lik ± 1 %).

**MERK:** Hvis du vil ha mer informasjon om ekstraksjons- og analyseprosedyrene nedenfor, kan du se "Utstyr og materiale som kreves, men ikke følger med" for pipettespesifikasjoner.

## 9. EKSTRAKSJONSPROSEDYRE

- 9.1 Gjør klar merkede 12 X 75 mm glassrør av engangstype for hver kalibrator, kontroll og pasientprøve.
- 9.2 Pipetter 500 µL acetonitril i hvert rør.
- 9.3 Plasser pipettespissen med 50 µL kalibrator, kontroll eller pasientprøve under overflaten på acetonitrilen og tilsett LANGSOMT til acetonitrilen.
- 9.4 Roter i 10 sekunder.
- 9.5 Sentrifuger med 1200 x g\* i 10 minutter ved 20-25°C.
- 9.6 Pipetter duplikate alikvater på 25 µL fra supernatanten til separate 12 x 75 mm rør med passende merking. **CAUTION:** Vær nøye med å ikke forstyrre pelleten.
- 9.7 Analyser supernatantene i henhold til analyseprosedyren.

## 10. ANALYSEPROSEDYRE

- 10.1 La alle reagenser og prøver nå likevekt ved romtemperatur. Pass på at reagensene ikke blir varmere enn 25°C.
- 10.2 Still opp merkede 12 x 75 mm engangsør av glass i duplikat i henhold til analyseskjemaet på den siste siden.
- 10.3 Tilsett reagens som følger:
  - a. **Rør for totaltelling**  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL NSB/tilsetningsbuffer
  - b. **Rør for uspesifikk binding (NSB)**  
25 µL 0-kalibrator (ekstrahert)  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL NSB/tilsetningsbuffer
  - c. **Kalibratører, kontroller og ukjente prøver**  
25 µL kalibrator, kontroll eller ukjent prøve (ekstrahert)  
50 µL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL 25-OH-D antiserum
- 10.4 Roter varsomt uten at det dannes skum og inkuber i 90 (+/- 10) minutter ved 20-25°C.
- 10.5 Tilsett 500 µL DAG-utfellingskompleks (DAG-utfellingskomplekset skal blandes grundig før og under bruk) til samtlige rør med unntak av totaltellingsrørene.
- 10.6 Bland innholdet godt og inkuber i 20-25 minutter ved 20-25°C.

$$* g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius i cm}) (\text{rpm})^2$$

- 10.7 Tilsett 500 µL NSB/tilsetningsbuffer til samtlige rør med unntak av totaltellingsrørene. Roter forsiktig slik at innholdet i rørene blandes godt. Vær forsiktig ved dette trinnet for å unngå at det høye væskeinnholdet i rørene fører til at væske spruter ut.
- 10.8 Sentrifuger samtlige rør med unntak av totaltellingsrørene i 20 minutter ved 20-25°C og 1800 x g\*.
- 10.9 Dekanter supernatantene, med unntak av totaltellingsrørene, med en rørstativholder av skum eller lignende ved å snu stativet opp ned over en passende avfallsbeholder. Still det vendte stativet på absorberende papir i 2-3 minutter. Trykk papiret forsiktig mot rørråpningen for å sørge for at all væsken fjernes.
- 10.10 Tell hvert rør i minst 1 minutt i en gammascintillasjonsteller. Hvert rør skal telles i lang nok tid til å oppnå statistisk sikkerhet. (Se avsnittet om resultater: Prosedyrens begrensninger.)

## 11. PROSEDYREKOMMENTARER

- 11.1 Tilsett hver reagenslikvot til den nederste tredjedelen av prøverøret slik at reagensene blandes fullstendig.
- 11.2 For å bekrefte at en RIA-analyse gir konsekvente resultater, kan en rekke øvrige faktorer kontrolleres. DiaSorin anbefaler regelmessig kontroll av følgende parametre for å forsikre konsekvent kit-funksjon.
  - a. **Totaltelling**
  - b. **Maksimal binding**  
Gjennomsnittlige tellinger per minutt (CPM) for røret med 0-kalibrator/CPM-gjennomsnitt for totaltellingrør.
  - c. **Uspesifikk binding**  
CPM-gjennomsnitt for NSB-rør/CPM-gjennomsnitt for totaltellingsrør.
  - d. **Kalibratorkurvens helling**  
Mål for eksempel kalibratorkurvens punkter for 80 og 50 %.

## 12. KVALITETSKONTROLL

Hvert laboratorium bør ta med minst to kontroller (en ved lavt-normalt nivå og en ved høyt-normalt nivå) i hver analyse for å måle analyseutførelsen. Kommersielt tilgjengelige kontroller eller de to referansekontrollene som følger med kitet kan benyttes. Kontrollene i kitet har blitt vurdert av DiaSorin ved hjelp av DiaSorin 25-hydroksyvitamin D <sup>125</sup>I RIA-kit. Konsentrasjonsintervallet for hver kontroll blir angitt på analysesertifikatet, og indikerer grensene som er fastsatt av DiaSorin for de kontrollverdiene som kan oppnås for pålitelige analyseoppsett.

Kontrollene skal behandles som ukjente prøver og analyseres i duplikat. Kvalitetskontrolldiagrammer skal føres for å følge kontrollenes utførelse. Akseptable utførelsesgrenser skal bestemmes av hvert enkelt laboratorium for hvert kontrollnivå ved hjelp av statistiske metoder for å påvise både systematiske og tilfældige feil. Kontrollresultater må overholde laboratoriets kriterier for godkjenning før resultatene fra pasientprøvene rapporteres.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. BEREGNING AV RESULTATER

Det finnes mange metoder for å beregne RIA-resultater. Alle tar utgangspunkt i å få fram en kalibreringskurve ved å plote bindingsgraden mot de angitte konsentrasjonene for kalibreringsløsningene. Dette diagrammet kan ha enten lineær eller logaritmisk skala. Hver av disse metodene gir stort sett de samme verdiene for kontroller og prøver, selv om visse analyser kan "passe" bedre til en bestemt metode enn en annen. Beregningsmetoden for DiaSorins laboratorium for kvalitetskontroll er % B/B<sub>0</sub> kontra logaritmen for konsentrasjon.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius i cm}) (\text{rpm})^2$$

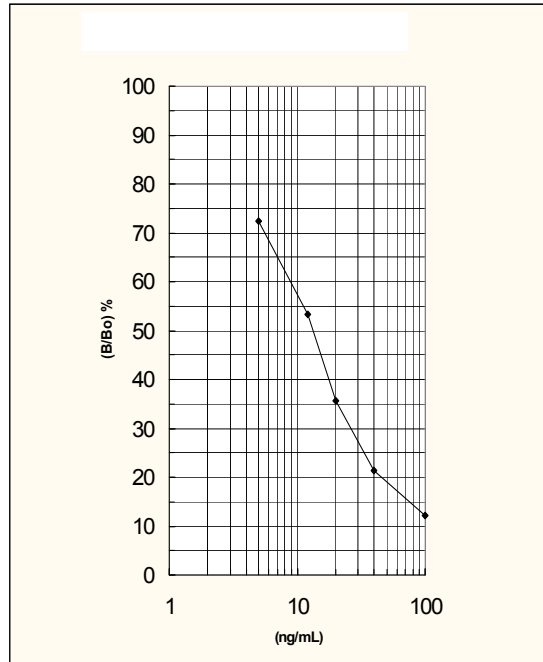
- 13.1** Beregn CPM-gjennomsnitt for hver kalibrator, kontroll og ukjente prøve.
- 13.2** Subtraher CPM-gjennomsnittet for NSB-rørene fra alle verdiene.
- 13.3** Del den korrigerede CPM-verdien for hver kalibrator, kontroll eller ukjente prøve med den korrigerede CPM-verdien for 0-kalibratoren.
- $$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM for kalibrator eller ukjent prøve} - \text{CPM for NSB}}{\text{CPM for 0-kalibrator} - \text{CPM for NSB}} \times 100$$
- 13.4** Bruk et semilogaritmisk kurvepapir over to sykluser eller dobbeltlogaritmisk kurvepapir, og plott B/B<sub>0</sub> i prosent for 25-OH-D-kalibratorene (vertikal akse) mot konsentrasjonen (horisontal akse).
- 13.5** Tegn den best tilpassede linjen mellom punktene.
- 13.6** Interpoler 25-OH-D-nivåene i de ukjente prøvene fra diagrammet.
- 13.7** Hvis en ukjent prøve har blitt fortynnet, må du korrigere for den egnede fortynningsfaktoren.
- 13.8** Beregn maksimal binding ved å dele CPM for 0-kalibratoren med de gjennomsnittlige totaltellingene fra totaltellingsrørene.
- 13.9** Automatisert programmer for datareduksjon kan også benyttes til å analysere data. DiaSorin anvender RIACalc (Pharmacia) med myk tilpasning til SPLINE funksjoner for %B/B<sub>0</sub> mot logaritmisk konsentrasjon. Andre datareduksjonsmetoder må valideres før tas i bruk regelmessig.

**TABELL I**  
Prøvedata for DiaSorin 25-OH-D Vitamin D RIA

| Rør            | CPM i duplikat                   | CPM-gj.sn. | Korrigert CPM | Prosent bundet (B/T) | Prosent (B/B <sub>0</sub> ) | Diagr. kons. (ng/mL) |
|----------------|----------------------------------|------------|---------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|
| Totaltelling   | 41878<br>39924                   | 40901      |               |                      |                             |                      |
| NSB            | 555<br>508                       | 531        |               | 1,3                  |                             |                      |
| 0-kalibrator   | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822      | 19291         | 48,5                 |                             |                      |
| Kalibratører   |                                  |            |               |                      |                             |                      |
| 1              | 14503<br>14442                   | 14472      | 13941         |                      | 72,3                        | 5                    |
| 2              | 11005<br>10670                   | 10838      | 10307         |                      | 53,4                        | 12                   |
| 3              | 7182<br>7642                     | 7411       | 6880          |                      | 35,7                        | 20                   |
| 4              | 4687<br>4622                     | 4654       | 4123          |                      | 21,4                        | 40                   |
| 5              | 2768<br>2985                     | 2877       | 2346          |                      | 12,2                        | 100                  |
| Ukjente prøver |                                  |            |               |                      |                             |                      |
| 1              | 10365<br>10447                   | 10406      |               |                      | 53,9                        | 12,8                 |
| 2              | 4219<br>4720                     | 4634       |               |                      | 24,0                        | 40,4                 |

Typiske prøvedata og en kalibreringskurve vises i TABELL I og FIGUR 1. Denne informasjonen er kun for referanse og skal ikke brukes til å beregne noen verdier.

## 25-HYDROKSYVITAMIN D EKSEMPEL PÅ STANDARDKURVE



Figur 1

### 14. PROSEDYRENS BEGRENSNINGER

- 14.1 Tellingstidene må være tilstrekkelige til å unngå statistiske feil (for eksempel gir en mengde på 2000 CPM en feil på 5 %, mens 10 000 CPM gir en feil på 1 %).
- 14.2 Analyseresultater skal brukes i sammenheng med øvrige kliniske data og laboratoriedata for å hjelpe klinikerer med å ta beslutninger om individuell pasientstyring.
- 14.3 Effektene av hemolyse eller lipemi i pasientprøvene har ikke blitt evaluert for denne analysen. Ekstraksjonen av acetonitril forventes imidlertid å minimere interferens grunnet disse stoffene.
- 14.4 Den fremste kilden til presisjonsfeil i denne metoden er sannsynligvis ekstraksjonstrinnet. Øvrige feilkilder kan være upresise mikropipetter eller utdaterte reagenser.
- 14.5 Antistoffet i kitet vil utvise en viss kryssreaktivitet med alle former av dihydrokseyvitamin-D2- og D3-steroider. Hos mennesker forekommer imidlertid disse forbindelsene normalt kun i pikomolare konsentrasjoner

**MERK:** Utførelsesegenskapene for denne analysen har ikke blitt etablert i en pediatrik populasjon.

## 15. FORVENTEDE VERDIER

### Referanseområde

Det er viktig at hvert laboratorium etablerer sitt eget referanseområde som er representativt for dens typiske pasientpopulasjon. Faktorer som UV-eksponering<sup>9,10</sup> årstid,<sup>11,12</sup> rase<sup>7</sup> og inntak via føden<sup>8</sup> er alle kjente for å påvirke 25-OH-D-nivåene hos mennesker. En reduksjon av vitamin D-nivåer med alderen har blitt påvist i litteraturen. Forskningen i de fleste av disse studiene har imidlertid blitt utført i nordeuropeiske land, der det er mindre sollys og berikning av mat er mindre utbredt.<sup>8,15,16</sup> Dette, sammen med de store variasjonene innen helsekriterier og medisiner, gjør det vanskelig å generalisere effekten av en ren alderseffekt på D-vitaminstatus.<sup>12</sup> Studier i USA har gitt tvetydige resultater, der noen viser nedsatt D-vitaminstatus med alderen, og andre ikke. Antiepileptika har vist seg å gi en nedgang av 25-OH-D-nivåer, og det samme har langvarig bruk av solfaktor som inneholder p-aminobenzosyre.<sup>17</sup> DiaSorin har ikke etablert et pediatrik referanseområde ved hjelp av dette kitet.

DiaSorin evaluerte serum fra 20 mannlige og 24 kvinnelige, tilsynelatende friske og hovedsakelig hvite frivillige fra det midtvestlige USA ved hjelp av DiaSorin 25-hydroksyvitamin D<sup>125</sup>I RIA-kit. Alderen på de forsøkspersonene lå på mellom 23 og 67 år. Prøvene ble tatt i oktober. Det ble kun observert en liten forskjell i 25-OH-D-nivåer mellom menn (gjennomsnitt = 21,7 ng/mL) og kvinner (gjennomsnitt = 24,1 ng/mL) i denne referansegruppen. Gjennomsnittet for hele populasjonen (n = 44) var 23,0 ng/mL med et område innen 2 standardavvik på 9,0 – 37,6 ng/mL.

Det har blitt observert høy forekomst av subklinisk 25 OH vitamin D-mangel hos normale, tilsynelatende friske populasjoner i mange land, spesielt i løpet av vintermånedene.<sup>13,14</sup> I den seneste litteraturen har følgende områder blitt anbefalt for klassifisering av 25 OH vitamin D-status: Mangel: 0 til 5 ng/mL (0 – 12,5 nmol/l); Insuffisiens: 5 til 20 ng/mL (12,5 – 50 nmol/l); Hypovitaminose D: 20 til 40 ng/mL (50 - 100 nmol/l); Suffisiens: 40 til 100 ng/mL (100 – 250 nmol/l) og Toksisitet: over 100 ng/mL (> 250 nmol/l).<sup>24</sup>

## 16. SPESIFIKKE UTFØRELSESEGNSKAPER

### 16.1 Presisjon

DiaSorin evaluerte analysens presisjon ved å teste fire kontrollnivåer som strekte seg over kurven over 23 arbeidsdager i 40 analyser. Hver analyse inkluderte de fire kontrollene x 2 ekstraksjoner (4 replikater). Studiens utforming var konsekvent med veiledningene i dokumentet EP5-T2 fra CLSI.<sup>22</sup> Databeregninger ble utført med SAS PROC VARCOMP. Den statistiske modellen som ble brukt var en lineær modell for tilfeldige effekter.<sup>23</sup>

| Gj.sn.<br>(ng/mL) | Innen-serie<br>(% C.V.) | Total presisjonsfeil<br>(% C.V.) |
|-------------------|-------------------------|----------------------------------|
| 8,6               | 11,7                    | 9,4                              |
| 22,7              | 10,5                    | 8,2                              |
| 33,0              | 8,6                     | 9,1                              |
| 49,0              | 12,5                    | 11,0                             |



## 16.2 Sikkerhet

Analysens sikkerhet har blitt kontrollert ved hjelp av en fortynnings- og gjenvinningstest.

### LINEARITET (PARALLELLITET)

Seriell fortynningsstudie av 4 pasientprøver (verdier = ng/mL)

| Prøve | Ufortynnet | 1/2  | 1/4  |
|-------|------------|------|------|
| 1     | 74,6       | 79,4 | 74,8 |
| 2     | 87,8       | 96,4 | 95,2 |
| 3     | 85,6       | 88,2 | 82,4 |
| 4     | 55,2       | 57,8 | 60,4 |

## Gjenvinning

Kjente mengder 25-OH-D<sub>3</sub> ble tilsatt pasientserumprøver og gjenvinning i prosent ble bestemt.

| Prøve-<br>nummer | Oppr. kons.<br>(ng/mL) | Tilsatt<br>mengde<br>(ng/mL) | *Forventet<br>kons.<br>(ng/mL) | Oppmålt<br>kons. (ng/mL) | Gjenvin-<br>ning |
|------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------|------------------|
| 1                | 15,8                   | 5,0                          | 25,5                           | 24,8                     | 97 %             |
|                  |                        | 10,0                         | 35,1                           | 41,8                     | 119 %            |
|                  |                        | 25,0                         | 62,7                           | 61,9                     | 99 %             |
| 2                | 51,2                   | 5,0                          | 60,6                           | 62,0                     | 102 %            |
|                  |                        | 10,0                         | 69,8                           | 73,8                     | 106 %            |
|                  |                        | 25,0                         | 96,4                           | 99,4                     | 103 %            |
| 3                | 26,6                   | 5,0                          | 36,2                           | 33,5                     | 92 %             |
|                  |                        | 10,0                         | 45,7                           | 54,0                     | 118 %            |
|                  |                        | 25,0                         | 73,0                           | 82,8                     | 113 %            |
| 4                | 57,3                   | 5,0                          | 66,6                           | 63,8                     | 96 %             |
|                  |                        | 10,0                         | 75,8                           | 78,1                     | 103 %            |
|                  |                        | 25,0                         | 102**                          | 104**                    | 102 %            |
| 5                | 41,3                   | 5,0                          | 50,8                           | 48,5                     | 95 %             |
|                  |                        | 10,0                         | 60,1                           | 56,1                     | 93 %             |
|                  |                        | 25,0                         | 87,0                           | 93,2                     | 107 %            |

\* Forventet beregning av 25-OH-D-konsentrasjon inkluderer fortynningsfaktoren som ble introdusert med den tilsatte løsningen.

\*\* Dette er de ekstrapolerte verdiene: den oppmålte konsentrasjonen er > 100 ng/mL (høyeste kalibrator)

## 16.3 Analytisk sensitivitet (deteksjonsgrenser)

Analysens sensitivitet, når den defineres som den laveste mengden som kan skilles fra null ved 2 standardavvik under CPM-gjennomsnittet for 0-kalibratoren (n = 20), har vist seg å ligge på eller under 1,5 ng/mL. Dette sensitivitetsnivået gjelder både ved bruk av kalibratoren "1" og den "ekstra" kalibratoren.

#### 16.4 Analytisk spesifisitet

Data vedrørende kryssreaktivitet av antiserum som brukes i dette kitet uttrykkes som forholdet mellom 25-OH-D-konsentrasjon og den kryssreagerende substanskonsentrasjonen ved 50 % hemming av maksimal binding.

| Steroid        | % Kryssreaktivitet |
|----------------|--------------------|
| Vitamin D2     | 0,8                |
| Vitamin D3     | 0,8                |
| 25-OH-D2       | 100                |
| 25-OH-D3       | 100                |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0               |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0               |

**SE DEN SISTE SIDEN FOR REFERANSER**

#### ANALYSESKJEMA

1. Ekstraher prøvene: Pipetter 500 µL acetonitril i et glassrør og tilsett langsomt 50 µL kalibrator, kontroll eller pasientprøve under acetonitrirens overflate. Roter i 10 sekunder og sentrifuger i 10 minutter ved 1200 x g\* og 20-25°C.
2. Pipetter reagens i henhold til følgende skjema:

| Rør/reagenser              | Totaltelling | NSB    | Kal 0-6 | Kontroller og ukjente prøver |
|----------------------------|--------------|--------|---------|------------------------------|
| Ekstraherte 0 kalibratore  | -            | 25 µL  | -       | -                            |
| Ekstraherte kalibratore    | -            | -      | 25 µL   | -                            |
| Ekstraherte kontroll       | -            | -      | -       | 25 µL                        |
| Ekstraherte ukjente prøver | -            | -      | -       | 25 µL                        |
| Sporstoff                  | 50 µL        | 50 µL  | 50 µL   | 50 µL                        |
| NSB/tilsetningsbuffer      | 1,0 mL       | 1,0 mL | -       | -                            |
| 25-OH-D-antiserum          | -            | -      | 1,0 mL  | 1,0 mL                       |

3. Bland godt, inkuber i 90 minutter (+/- 10 minutter) ved 20-25°C.
4. Tilsett 500 µL DAG-utfellingskompleks i alle brønner, med unntak av totaltellingsrørene.
5. Bland godt og inkuber i 20-25 minutter ved 20-25°C.
6. Tilsett 500 µL NSB/tilsetningsbuffer i alle brønnene, med unntak av totaltellingsrørene.
7. Sentrifuger ved 1800 x g\* i 20 minutter.
8. Dekanter supernatantene.
9. Tell hvert rør i en gammateller i minst 60 sekunder.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{radius i cm}) (\text{rpm})^2$$

## KIT RIA 25-HIDROXIVITAMINA D <sup>125</sup>I

### 1. UTILIZARE RECOMANDATĂ

#### PENTRU UTILIZAREA ÎN DIAGNOSTIC *IN VITRO*

Acest kit este studiat pentru determinarea cantitativă a 25-hidroxivitaminei D și a altor metaboliți hidroxiilați ai vitaminei D din serul sau din plasma umane, pentru a fi folosiți în determinarea cantității suficiente de vitamina D. Rezultatele analizei trebuie utilizate în combinație cu alte date clinice sau de laborator, pentru a ajuta medicul clinician în luarea unor decizii individualizate privind tratamentul pacienților adulți.

### 2. REZUMAT ȘI EXPLICAȚIE

Când calciferolul (vitamina D) pătrunde în circulație, este metabolizată în câteva forme, cea mai importantă dintre acestea fiind 25 hidroxi-calciferolul (25-OH-D). Prima etapă în metabolizarea vitaminei D, 25-hidroxilarea, are loc în principal în ficat. <sup>1</sup> La om, doar o cantitate mică de 25-OH-D este metabolizată în rinichi, în alți metaboliți di-hidroxiilați ai vitaminei D. <sup>2,3</sup> De vreme ce 25-OH-D e forma predominantă în circulație a vitaminei D la populația obișnuită, se consideră că e cel mai bun indiciu privind cantitatea de vitamină D din organism.

Cele două forme principale ale 25-OH-D sunt colecalciferolul (vitamina D<sub>3</sub>) și ergocalciferolul (vitamina D<sub>2</sub>). <sup>3,5</sup> Vitamina D<sub>3</sub> provine în principal din acțiunea luminii ultraviolete asupra pielii, în timp ce D<sub>2</sub> provine numai din alimentație. Aceste doi compuși înrudiți contribuie în mod variabil la cantitatea totală de vitamina D din organismul unui individ, de aceea este important ca ambele forme să fie măsurate deopotrivă. <sup>6,7</sup> S-au făcut multe cercetări care au adus informații cu privire la nivelurile în circulație ale metabolismului 25-OH-D și a semnificației fiziologice a acestora.

Măsurarea 25-OH-D devine tot mai importantă în tratamentul pacienților cu diferite tulburări ale metabolismului calciului asociate cu rahitismul, hipocalcemia neonatală, graviditatea, osteodistrofia nutrițională și renală, hipoparatiroidismul și osteoporoza post-menopauză. <sup>6,8-10</sup> NOTĂ: Caracteristicile de performanță ale analizei 25-OH-D prin DiaSorin nu au fost stabilite și pentru copii.

### 3. PRINCIPIUL ANALIZEI

Analiza DiaSorin 25-OH-D constă dintr-o procedură în două etape. Prima procedură implică extragerea rapidă a 25-OH-D și a altor metaboliți hidroxiilați din ser sau plasmă, cu ajutorul acetonitrilului. După extracție, proba tratată este analizată folosind o procedură RIA de echilibrare. Metoda RIA se bazează pe un anticorp cu specificitate la 25-OH-D. Proba, anticorpul și traserul sunt incubate 90 de minute la 20-25°C. Separarea fazei se realizează după o incubație de 20 de minute la 20-25°C, cu un al doilea complex de precipitare a anticorpului. Se adaugă un tampon NSB/de adăugire după această incubație, înainte de centrifugare, pentru a ajuta la reducerea legării nespecifice.

### 4. REACTIVI FURNIZAȚI ÎN KIT

|                                    |                 |
|------------------------------------|-----------------|
| Probe-etalon 25-OH-D               | 6 fiole/1 mL    |
| Tampon NSB/ de adăugire 25-OH-D    | 1 flacon/70 mL  |
| Antiser 25-OH-D                    | 1 flacon/105 mL |
| Trasor 25-OH-D                     | 1 fiolă/6 mL    |
| Complex de precipitare 25-OH-D DAG | 2 fiole/30 mL   |
| Probe-martor 25-OH-D               | 2 fiole/1 mL    |
| Acetonitril 25-OH-D                | 2 fiole/15 mL   |
| Număr de teste                     | 100             |

DEPOZITAREA La primire, kitul trebuie depozitat la 2-8°C. După deschidere, depozitați fiecare reactiv la 2-8°C până la data de expirare de pe etichetă. Reactivii nu trebuie folosiți după data de expirare. Data de expirare a kitului este indicată pe eticheta externă și corespunde cu data de expirare a traserului.

Nu trebuie amestecați reactivi din loturi diferite.

**4.1 Tampon NSB/ de adăugire 25-OH-D:** reactiv gata de utilizare

Tampon fosfat-gelatină care conține azidă de sodiu 0,1%. Acest compus are o funcție dublă. Va servi atât ca tampon NSB, cât și ca Tampon de adăugire.

**4.2 Probe-etalon 25-OH-D<sub>3</sub>:** reactiv gata de utilizare

Șase probe-etalon (25-OH-D<sub>3</sub>) cu concentrații între 0-100 ng/mL sunt pre-diluate în ser uman tratat care conține azidă de sodiu 0,1%. Mânuiți acești reactivi cu grijă (vezi Avertismente și Măsuri de precauție). Etaloanele din kit au fost calibrate folosind determinarea cantitativă UV și au fost verificate prin analiză HPLC. Etaloanele din kit demonstrează comutabilitate cu probele de la pacient când sunt utilizate cu reactivii și cu procedura de utilizare din acest test de diagnosticare in vitro, așa cum se recomandă.

**NOTĂ:** Dacă e necesar, se poate crea un etalon „Opțional” (2,5 ng/mL) diluând etalonul din kit “1” 1:2 în etalonul zero din kit (adică 100 uL “1” + 100 uL “0”). Această diluție trebuie realizată înainte de extracție, apoi trebuie extrasă conform instrucțiunilor produsului.

**4.3 Antiser 25-OH-D:** reactiv gata de utilizare.

Serul de capră anti-25-OH-D este diluat într-un tampon fosfat-gelatină care conține azidă de sodiu 0,1%.

**4.4 Traser 25-OH-D<sub>3</sub>:** reactiv gata de utilizare.

Un analog iodat [<sup>125</sup>I] de 25-OH-D<sub>3</sub> este diluat într-un tampon de etanol-fosfat. Mânuiți acest reactiv cu grijă (vezi Avertismente și Măsuri de precauție).

**4.5 Complex de precipitare Donkey Anti-Goat (DAG) (măgar anti-capră):** reactiv gata de utilizare.

Se dizolvă ser de măgar anti-capră, ser normal de capră și polietilen glicol într-un tampon de borat BSA care conține sulfat de gentamicină și azidă de sodiu 0,1%. Se amestecă timp de 5-10 minute înainte de folosire și în timpul folosirii pentru a se obține o suspensie omogenă.

**4.6 Martori 25-OH-D:** reactiv gata de utilizare.

În ser uman care conține azidă de sodiu 0,1% se adaugă cantitățile necesare de 25-OH-D<sub>3</sub> pentru a obține concentrații ale probei-martor cuprinse în intervalele specificate. Se amestecă bine și se tratează ca probe necunoscute. Martorul 1 reprezintă un interval mic-normal, iar Martorul 2 reprezintă un interval mare-normal. Intervalul concentrațiilor pentru fiecare control este înscris pe certificatul de analiză și indică limitele stabilite de DiaSorin pentru valorile controlurilor care pot fi obținute în cadrul procedurilor de dozare veridice. Mânuiți acești reactivi cu grijă (vezi Avertismente și Măsuri de precauție).

**4.7 Acetonitril:** reactiv gata de utilizare.

Acetonitril. Adecvat pentru utilizarea cu acest kit. Mânuiți acest reactiv cu grijă (vezi Avertismente și Măsuri de precauție). Acest produs conține cauciuc natural uscat.

## 5. AVERTISMENTE ȘI MĂSURI DE PRECAUȚIE

PENTRU UTILIZAREA ÎN DIAGNOSTIC IN VITRO.

Este interzis uzul intern sau extern, la oameni sau la animale.

**ATENȚIE:** Acest dispozitiv trebuie primit, cumpărat, deținut și utilizat numai de medici, laboratoare clinice, spitale, veterinari sau centre de cercetare. Analizele trebuie efectuate numai de personal de laborator calificat și pregătit în mod corespunzător.

### REACTIVI CARE CONȚIN MATERIALE DE ORIGINE UMANĂ

**Se tratează ca fiind potențial periculoase.**

Fiecare unitate de ser/plasmă de la donator utilizată la prepararea acestui produs a fost testată printr-o metodă aprobată de F.D.A. din S.U.A. și a fost găsită non-reactivă la prezența HbsAg, a anticorpilor anti-HCV și a anticorpilor anti-HIV 1/2. Deși aceste metode au un grad mare de acuratețe, nu garantează detectarea tuturor unităților infectate.

Acest produs poate conține și alte materiale de origine umană pentru care nu există teste aprobate. Dat fiind că nici o metodă de testare cunoscută nu poate oferi garanția totală că virusul hepatitei B (HBV), virusul hepatitei C (HCV), Virusul Imunodeficienței Umane (HIV) sau alți agenți infecțioși sunt absenți, toate produsele conținând material de origine umană trebuie manevrate conform bunelor practici de laborator, cu măsurile de precauție adecvate din Manualul pentru Centrele pentru Controlul și Prevenirea Bolilor / Institutele Naționale de Sănătate, „Biosecuritatea în laboratoarele microbiologice și biomedicale”, ediția a 4-a, mai 1999, sau ediția curentă.

#### **REACTIVI CARE CONȚIN AZIDĂ DE SODIU**

**ATENȚIE:** Unii reactivi din acest kit conțin azidă de sodiu. Azida de sodiu poate reacționa cu țevile din plumb sau cupru, formând azide de metal foarte explozive. La aruncare, lăsați să curgă un volum mare de apă, pentru a preveni acumularea de azidă (Directiva Consiliului 1999/45/CE). Pentru informații suplimentare, consultați „Decontaminarea țevilor de scurgere ale chiuvetelor de laborator, pentru eliminarea sărurilor de azidă”, din manualul-ghid Managementul siguranței nr. CDC-22, publicat de Centrul pentru Controlul și Prevenirea Bolilor, Atlanta, GA. SUA 1976.

#### **Fraze privind natura riscului substanțelor periculoase, conform Comunității europene (Directiva Consiliului 1999/45/CE)**

R 20/21/22 - Nociv la inhalare, în contact cu pielea și la ingerare.

R 32 - În contact cu acizii eliberează gaze foarte toxice.

S28 - După contactul cu pielea, spălați imediat cu multă apă.

#### **REACTIVI CARE CONȚIN ACETONITRIL**

#### **Fraze privind natura riscului substanțelor periculoase, conform Comunității europene (Directiva Consiliului 88/379/CEE)**

R11 - Foarte inflamabil.

R R23/24/25 - Toxic la inhalare, în contact cu pielea și la ingerare.

S16 - A se păstra departe de surse de foc - Fumatul interzis.

S36 - Purtați îmbrăcăminte de protecție adecvată.

S43 - În caz de incendiu, folosiți substanțe chimice uscate sau dioxid de carbon.

S45 - În caz de accident sau dacă nu vă simțiți bine, consultați imediat medicul.

S51 - Utilizați numai în zone bine aerisite.

#### **REACTIVI CARE CONȚIN ETANOL**

#### **ATENȚIE - INFLAMABIL**

#### **Fraze privind natura riscului substanțelor periculoase, conform Comunității europene (Directiva Consiliului 88/379/CEE)**

R11 - Foarte inflamabil.

S16 - A se păstra departe de surse de foc - Fumatul interzis.

S43 - În caz de incendiu, folosiți substanțe chimice uscate sau dioxid de carbon.

#### **REACTIVI CARE CONȚIN IOD-125**

Acest kit conține material radioactiv care nu depășește 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) de iod-125. Adoptați măsuri de precauție adecvate și respectați bunele practici de laborator pentru conservarea, mânăuirea și aruncarea acestui material.

Pentru practicienii sau instituțiile care primesc radioizotopi în cadrul unei licențe generale:

Acest material radioactiv poate fi primit, achiziționat, deținut și utilizat numai de medici, veterinari care practică medicina veterinară, laboratoare clinice sau spitale, și numai pentru analize clinice in vitro sau analize de laborator care nu presupun administrarea internă sau externă a materialului, sau a radiațiilor sale, la oameni sau la animale. Primirea, achiziționarea, deținerea, folosirea și transferul sunt supuse reglementărilor și licenței generale a Comisiei de reglementare nucleară a SUA sau a statului cu care Comisia a stabilit un acord pentru exercitarea autorității normative.

1. Depozitarea materialului radioactiv trebuie limitată la o zonă desemnată în mod specific.
2. Accesul la produsele radioactive trebuie limitat numai la personalul autorizat.
3. Nu pipetați materialul radioactiv cu gura.

4. Nu consumați alimente sau băuturi în zonele de lucru desemnate pentru materialele radioactive.
5. Zonele unde se pot produce revărsări de lichide trebuie să fie curățate, apoi spălate cu un detergent alcalin sau cu soluție de decontaminare radiologică. Recipientele de sticlă utilizate trebuie să fie bine clătite cu apă înainte de a fi spălate alături de alte recipiente de laborator din sticlă.

Pentru practicienii sau instituțiile care primesc radioizotopi în cadrul unei licențe specifice:

Primirea, folosirea, transferul și aruncarea materialelor radioactive sunt supuse reglementărilor și condițiilor licenței dv. specifice.

**ATENȚIE:** Acest produs conține o substanță chimică ce este recunoscută în statul California ca fiind cancerigenă.

**ATENȚIE:** Radioactivitatea indicată pe instrucțiunile din pachet poate fi puțin diferită față de radioactivitatea tipărită pe eticheta cutiei și pe eticheta fiolei cu trasor. Pe eticheta cutiei și pe eticheta fiolei cu trasor este indicată cantitatea efectivă de radioactivitate la data calibrării, pe când instrucțiunile din pachet indică radioactivitatea teoretică a kitului.

#### 6. INDICIILE ALE UNEI POSIBILE DETERIORĂRI A REACTIVILOR DIN KIT

- 6.1 Prezența de particule anormale în oricare dintre reactivi. (Tamponul NSB, antiserul și reactivii de precipitare DAG pot fi tulburi.)
- 6.2 O modificare a pantei sau a poziției curbei de calibrare față de cea obținută în mod normal.
- 6.3 O diminuare a legării maxime.
- 6.4 O legare nespecifică ridicată.

#### 7. COLECTAREA ȘI PREPARAREA PROBELOR

Sunt necesari cincizeci (50) microlitri de ser sau plasmă (EDTA sau heparină) pentru extracția 25-OH-D; un volum de 150 microlitri va permite repetarea analizelor și va furniza un volum adecvat de pipetare.

Cu acest kit se pot utiliza ser sau plasmă umane. La această analiză se pot utiliza anticoagulanții EDTA sau heparină. Se recomandă o probă recoltată pe nemâncate, dar nu este obligatoriu. Sângele trebuie recoltat aseptice prin puncție venoasă, într-o eprubetă sub vid, de sticlă, de 5 sau 10 mL. Lăsați sângele să se coaguleze la temperatura camerei (15-25°C). Centrifugați timp de 15 minute la aproximativ 760 x g\* pentru a obține ser fără hemoliză. Nu sunt necesari aditivi sau conservanți pentru a păstra integritatea probei. Toate obiectele din plastic, sticlă sau alte materiale care vin în contact cu proba nu trebuie să fie contaminate. Depozitați mostrele de ser sau plasmă la -20°C sau mai puțin. Probele pot fi depozitate în fiole de sticlă sau de plastic, închise ermetic pentru a preveni uscarea probei.

Un studiu efectuat de DiaSorin pe un număr limitat de probe de la pacienți a arătat că probele sunt stabile până la 9 săptămâni, când sunt depozitate la -20°C. Nu s-au observat modificări semnificative ale valorilor după 3 cicluri de congelare-decongelare a probelor. Trebuie evitate ciclurile repetate de congelare-decongelare. Probele transportate trebuie să ajungă la destinație congelate.

#### 8. ECHIPAMENT ȘI MATERIALE NECESARE, DAR CARE NU SUNT FURNIZATE

- Eprubete de sticlă borosilicat de unică folosință, 12 x 75 mm.  
**NOTĂ:** Eprubetele de plastic nu sunt adecvate pentru utilizarea cu acest kit.
- Centrifugă cu controlul temperaturii, pentru 12 x 75 mm eprubete.
- Contor de raze gamma adecvat pentru iod-125.
- Agitator Vortex.
- Dispozitive de pipetare

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raza în cm}) (\text{rpm})^2$$

- a. Micropipete calibrate pentru a furniza 25 µL și 50 µL (eroare mai mică sau egală cu ± 1%).
- b. Dozatoare cu repetiție cu vârful calibrate pentru a furniza 50 µL, 500 µL și 1,0 mL (eroare mai mică sau egală cu ± 1%).

**NOTĂ:** Pentru procedurile de extracție și de analiză, consultați „Echipament și materiale necesare, dar care nu sunt furnizate” pentru specificațiile pipetelor.

## 9. PROCEDURA DE EXTRAȚIE

- 9.1 Pregătiți 12 eprubete de 75 mm, din sticlă, de unică folosință, pentru fiecare probă-etalon, probă-martor și probă de la pacient.
- 9.2 Adăugați 500 µL de acetonitril în fiecare eprubetă.
- 9.3 Puneți vârful pipetei care conține 50 µL de etalon, martor sau probă de la pacient, sub suprafața acetonitrilului și adăugați ÎNCET în acetonitril.
- 9.4 Agitați în vortex timp de 10 secunde.
- 9.5 Centrifugați la 1200 x g\* timp de 10 minute la 20-25°C.
- 9.6 Pipetați alicote duble de 25 µL din supernatant în 12 eprubete separate de 75 mm, etichetate în mod adecvat. **ATENȚIE:** Aveți grijă să nu agitați precipitatul.
- 9.7 Analizați supernatanții conform cu procedura de analiză.

## 10. PROCEDURA DE ANALIZĂ

- 10.1 Lăsați toți reactivii și probele să ajungă la temperatura camerei. Nu lăsați reactivii să ajungă la temperaturi mai mari de 25°C.
- 10.2 Pregătiți două serii de 12 eprubete de 75 mm, etichetate, din sticlă, de unică folosință, conform Schemei de Analiză de pe ultima pagină.
- 10.3 Adăugați reactivii după cum urmează:
  - a. **Eprubete pentru număratoarea totală**  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL de Tampon de adăugire/NSB
  - b. **Eprubete pentru legarea nespecifică (NSB)**  
25 µL de probă-etalon 0 (extras)  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL de Tampon NSB/de adăugire
  - c. **Probe-etalon, probe-martor și probe necunoscute**  
25 µL de etalon, martor sau probă necunoscută (extras)  
50 µL de <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 mL de antiser 25-OH-D
- 10.4 Agitați lent în vortex, fără a face spumă, și incubați timp de 90 (+/- 10) minute la 20-25°C.
- 10.5 Adăugați 500 µL de complex de precipitare DAG (complexul de precipitare DAG trebuie amestecat bine înainte de și în timpul utilizării), în toate eprubetele, cu excepția celor pentru număratoarea totală.
- 10.6 Amestecați bine conținutul eprubetelor și incubați timp de 20-25 minute la 20-25°C.
- 10.7 Adăugați 500 µL de Tampon NSB/de adăugire în toate eprubetele, cu excepția celor pentru număratoarea totală. Agitați lent în vortex pentru a amesteca bine conținutul eprubetelor. Aveți grijă când efectuați această etapă, pentru a evita împrăscarea din cauza volumului mare de lichid din eprubetă.
- 10.8 Centrifugați toate eprubetele timp de 20 minute la 20-25°C și 1800 x g\*, cu excepția celor pentru număratoarea totală.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raza în cm}) (\text{rpm})^2$$

- 10.9** Decantați supernatanții, cu excepția eprubetelor pentru numărătoarea totală, folosind un suport pentru eprubete din burete sau dintr-un material similar, răsturnând suportul într-un recipient adecvat pentru deșeuri. Puneți suportul cu fundul în sus pe hârtie absorbantă, timp de 2-3 minute. Ștergeți eprubetele cu delicatețe, pentru a înlătura orice urmă de lichid.
- 10.10** Într-un contor de raze gamma se efectuează numărătoarea pentru fiecare eprubetă, timp de minim 1 minut. Numărătoarea pentru fiecare tub trebuie efectuată pe un interval de timp suficient de lung pentru a garanta precizia statistică. (Vezi secțiunea cu rezultatele: Limitele procedurii.)

## 11. COMENTARIILE PRIVIND PROCEDURA

- 11.1** Adăugați fiecare alicotă de reactiv în treimea inferioară a eprubetei de analiză pentru a garanta o amestecare completă a reactivilor.
- 11.2** Pentru a monitoriza complet precizia constantă a unei analize RIA pot fi controlați și alți factori suplimentari. DiaSorin sugerează o verificare regulată a următorilor parametri pentru a asigura o precizie constantă a kitului.
- Numărători totale**
  - Legarea maximă**  
Numărătoarea medie pe minut („counts per minute”, CPM) pentru eprubeta etalonului 0 / CPM mediu pentru eprubetele de numărătoare totală.
  - Legarea nespecifică**  
CPM mediu al eprubetei NSB / CPM mediu pentru eprubetele de numărătoare totală.
  - Panta curbei de calibrare**  
De exemplu, monitorizați punctele de la 80 și 50% de pe curba de calibrare.

## 12. CONTROLUL DE CALITATE

Fiecare laborator ar trebui să includă cel puțin două probe-martor (una la nivelul jos-normal și una la nivelul înalt-normal) în fiecare analiză, pentru a monitoriza precizia analizei. Se pot utiliza martori disponibili în comerț sau cei doi martori de referință furnizați în kit. Martorii din kit au fost evaluați de DiaSorin utilizându-se kitul RIA DiaSorin 25-hidroxivitamina D <sup>125</sup>I. Intervalul concentrațiilor pentru fiecare control este înscris pe certificatul de analiză și indică limitele stabilite de DiaSorin pentru valorile controlurilor care pot fi obținute în cadrul procedurilor de dozare veridice.

Probele-martor trebuie tratate ca probe necunoscute și analizați în duplicat. Tabelele de control al calității trebuie păstrate, pentru a urmări precizia martorilor. Limitele acceptabile ale preciziei trebuie determinate de fiecare laborator individual, la fiecare nivel de control, folosind metode statistice concepute pentru a detecta atât erorile sistematice, cât și pe cele aleatorii. Rezultatele controlului trebuie să corespundă criteriilor laboratorului privind acceptabilitatea înainte de a comunica pacienților rezultatele analizei.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. CALCULAREA REZULTATELOR

Există numeroase metode pentru a calcula rezultatele RIA. Fiecare se bazează pe obținerea unei curbe de calibrare prin trasarea extensiei legării față de concentrațiile indicate pentru probele-etalon de calibrare. Acest grafic poate fi o scală liniară sau logaritmică. Fiecare dintre aceste metode dă, practic, aceleași valori pentru probe-etalon și probe-martor, deși unele analize se pot „potrivi” mai bine într-o anumită metodă, în comparație cu alta. Metoda de calcul pentru Controlul de calitate de laborator DiaSorin este % B/B<sub>0</sub> în raport cu concentrația pe scală logaritmică.

- 13.1** Calculați CPM mediu pentru fiecare probă-etalon, probă-martor și probă necunoscută.
- 13.2** Scădeți CPM mediu al eprubetelor NSB din toate numărătorile.



- 13.3** Împărțiți CPM-ul corectat al fiecărui etalon, martor sau probă necunoscută cu CPM-ul corectat al probei-etalon 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM al probei-etalon sau al probei necunoscute} - \text{CPM al NSB}}{\text{CPM al probei-etalon 0} - \text{CPM al NSB}} \times 100$$

- 13.4** Utilizați o hârtie milimetrică cu 2 cicluri, semi-log sau log-logit, și trasați procentul B/B<sub>0</sub> pentru etaloanele 25-OH-D (axa verticală) în raport cu concentrația (axa orizontală).
- 13.5** Trasați o linie de regresie prin puncte.
- 13.6** Interpolați nivelurile de 25-OH-D din probele necunoscute din linia trasată.
- 13.7** Dacă o probă necunoscută a fost diluată, corecți cu factorul de diluție adecvat.
- 13.8** Calculați legarea maximă împărțind CPM al etalonului 0 prin media numărărilor totale obținute în eprubetele pentru numărători totale.
- 13.9** Se pot utiliza și programe de reducere automată a datelor pentru a analiza datele. DiaSorin utilizează RIACalc (Pharmacia) cu un program de ajustare SPLINE uniform pentru %B/B<sub>0</sub> în raport cu concentrația logaritmică. Alte metode de reducere a datelor trebuie să fie validate înainte de a fi incluse în utilizarea regulată.

**TABELUL I**  
Date eșantion RIA DiaSorin 25-OH-D Vitamin D

| Eprubetă           | CPM duplicat                     | CPM mediu | CPM corectat | Procent Legare (B/T) | Procent (B/B <sub>0</sub> ) | Grafic Conc. (ng/mL) |
|--------------------|----------------------------------|-----------|--------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|
| Numărătoare totală | 41878<br>39924                   | 40901     |              |                      |                             |                      |
| NSB                | 555<br>508                       | 531       |              | 1,3                  |                             |                      |
| Proba-etalon 0     | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822     | 19291        | 48,5                 |                             |                      |
| Probe-etalon       |                                  |           |              |                      |                             |                      |
| 1                  | 14503<br>14442                   | 14472     | 13941        |                      | 72,3                        | 5                    |
| 2                  | 11005<br>10670                   | 10838     | 10307        |                      | 53,4                        | 12                   |
| 3                  | 7182<br>7642                     | 7411      | 6880         |                      | 35,7                        | 20                   |
| 4                  | 4687<br>4622                     | 4654      | 4123         |                      | 21,4                        | 40                   |
| 5                  | 2768<br>2985                     | 2877      | 2346         |                      | 12,2                        | 100                  |
| Probe necunoscute  |                                  |           |              |                      |                             |                      |
| 1                  | 10365<br>10447                   | 10406     |              |                      | 53,9                        | 12,8                 |
| 2                  | 4219<br>4720                     | 4634      |              |                      | 24,0                        | 40,4                 |

În TABELUL I și în FIGURA 1 sunt arătate date pentru probe tipice și o curbă de calibrare; aceste informații servesc doar ca referință și nu trebuie utilizate pentru calcularea valorilor.

#### CURBĂ STANDARD PENTRU PROBĂ DE 25-HIDROXIVITAMINA D

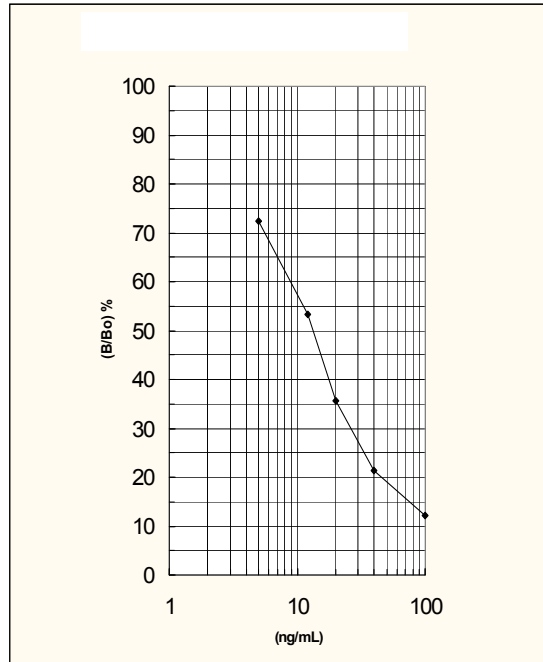


Figura 1

#### 14. LIMITELE PROCEDURII

- 14.1 Duratele de numărare trebuie să fie suficiente pentru a preveni erorile statistice (de exemplu, acumularea de 2.000 CPM va da o eroare de 5%; 10.000 CPM vor da o eroare de 1%).
- 14.2 Rezultatele analizei trebuie utilizate în combinație cu alte date clinice și de laborator, pentru a ajuta medicul clinician în luarea unor decizii individualizate privind tratamentul pacienților adulți.
- 14.3 Efectele datorate hemolizei sau lipemiei, prezente în probe de la pacienți, nu au fost evaluate pentru această analiză; cu toate acestea, extracția acetonitrilului poate reduce interferențele datorate acestor substanțe.
- 14.4 Cea mai mare sursă de imprecizie în această metodă este probabil etapa de extracție. Alte surse de imprecizie procedurală pot fi micropipetele imprecise sau reactivii expirați.
- 14.5 Anticorpul din kit va demonstra o oarecare reactivitate încrucișată cu toate formele de steroizi ai di-hidroxitaminei D2 și D3; la om, acești produși sunt prezenți în mod natural numai în concentrații picomolare.

**NOTĂ:** Caracteristicile de precizie ale acestei analize nu au fost stabilite și pentru copii.

## 15. VALORI PREVĂZUTE

### Interval de referință

Este important ca fiecare laborator să își stabilească intervalul propriu de referință, reprezentativ pentru populația sa tipică. Factori precum expunerea la UV<sup>9,10</sup>, anotimpul,<sup>11,12</sup> rasa<sup>7</sup> și regimul alimentar<sup>8</sup> afectează nivelurile de 25-OH-D la om. O descreștere a nivelurilor de vitamina D o dată cu vârsta a fost demonstrată în literatură; cu toate acestea, cercetările efectuate în majoritatea acestor studii au fost efectuate în țări din Europa de Nord, unde e mai puțină lumină solară și unde alimentația nu este îmbogățită.<sup>8,15,16</sup> Acești factori, asociați cu diferențe foarte variabile în criteriile de sănătate și în situația administrării medicamentelor, îngreunează o generalizare a efectului vârstei, separat, asupra nivelurilor de vitamina D.<sup>12</sup> Studiile efectuate în S.U.A. au dat rezultate echivoce, în unele se demonstrează prezența, iar în altele absența unui declin al nivelurilor de vitamina D o dată cu vârsta. Se știe că anticonvulsivul produce o scădere a nivelurilor de 25-OH-D, la fel ca și utilizarea pe termen lung a cremelor de protecție solară care conțin acid p-aminobenzoic.<sup>17</sup> Nu s-a stabilit un interval de referință pediatric, de către DiaSorin, utilizând acest kit.

DiaSorin a evaluat serul recoltat de la 20 de bărbați și 24 de femei, aparent sănătoși, în majoritate voluntari de rasă albă din zona centro-occidentală a S.U.A., cu ajutorul kitului RIA DiaSorin 25-hidroxivitamina D<sup>125I</sup>. Vârsta voluntarilor era cuprinsă între 23 și 67 ani. Probele au fost recoltate în luna octombrie. S-a observat doar o mică diferență în nivelurile de 25-OH-D între bărbați (medie = 21,7 ng/mL) și femei (medie = 24,1 ng/mL) în acest grup de referință. Media pentru întreaga populație (n = 44) a fost de 23,0 ng/mL cu un interval la 2 deviații standard de 9,0 – 37,6 ng/mL.

S-a observat o prevalență ridicată a carenței subclinice de 25 OH vitamina D la populații aparent sănătoase, în multe țări, în special în lunile de iarnă.<sup>13,14</sup> Literatura recentă sugerează următoarele intervale pentru clasificarea nivelului de 25 OH vitamina D: Carență: 0 până la 5 ng/mL (0 – 12,5 nmol/L); Insuficiență: 5 până la 20 ng/mL (12,5 - 50 nmol/L); Hipovitaminoză D: 20 - 40 ng/mL (50 - 100 nmol/L); Suficiență: 40 - 100 ng/mL (100 - 250 nmol/L); și Toxicitate: mai mult de 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. CARACTERISTICI SPECIFICE DE PERFORMANȚĂ

### 16.1 Precizie

Precizia analizei a fost evaluată de DiaSorin testându-se patru niveluri de control care acoperă curba pe o perioadă de 23 de zile operative, în cadrul a 40 de analize. Fiecare analiză includea cele patru controale x 2 extracții (4 repetiții). Concepția studiului se înscria în cadrul liniilor directe ale Documentului EP5-T2 al CLSI.<sup>22</sup> Calculul datelor a fost făcut utilizându-se SAS PROC VARCOMP. Modelul statistic ajustat este un model liniar cu efecte aleatorii.<sup>23</sup>

| Medie (ng/mL) | Intra-analiză (% C.V.) | Imprecizie totală (% C.V.) |
|---------------|------------------------|----------------------------|
| 8,6           | 11,7                   | 9,4                        |
| 22,7          | 10,5                   | 8,2                        |
| 33,0          | 8,6                    | 9,1                        |
| 49,0          | 12,5                   | 11,0                       |

### 16.2 Puritate

Puritatea analizei a fost verificată prin testul de diluție și de recuperare.

#### LINEARITATE (PARALELISM)

Studiu de diluție în serie a 4 probe de la pacienți (valori = ng/mL)

| Probă | Nediluată | 1/2  | 1/4  |
|-------|-----------|------|------|
| 1     | 74,6      | 79,4 | 74,8 |
| 2     | 87,8      | 96,4 | 95,2 |
| 3     | 85,6      | 88,2 | 82,4 |
| 4     | 55,2      | 57,8 | 60,4 |

### Recuperare

S-au adăugat cantități cunoscute de 25-OH-D<sub>3</sub> în probele de ser de la pacienți și s-a determinat procentul de recuperare.

| Probă Număr | Conc. inițială (ng/mL) | Cantitate adăugată (ng/mL) | *Prevăzut Conc. (ng/mL) | Conc. măsurată (ng/mL) | Recuperare |
|-------------|------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|------------|
| 1           | 15,8                   | 5,0                        | 25,5                    | 24,8                   | 97%        |
|             |                        | 10,0                       | 35,1                    | 41,8                   | 119%       |
|             |                        | 25,0                       | 62,7                    | 61,9                   | 99%        |
| 2           | 51,2                   | 5,0                        | 60,6                    | 62,0                   | 102%       |
|             |                        | 10,0                       | 69,8                    | 73,8                   | 106%       |
|             |                        | 25,0                       | 96,4                    | 99,4                   | 103%       |
| 3           | 26,6                   | 5,0                        | 36,2                    | 33,5                   | 92%        |
|             |                        | 10,0                       | 45,7                    | 54,0                   | 118%       |
|             |                        | 25,0                       | 73,0                    | 82,8                   | 113%       |
| 4           | 57,3                   | 5,0                        | 66,6                    | 63,8                   | 96%        |
|             |                        | 10,0                       | 75,8                    | 78,1                   | 103%       |
|             |                        | 25,0                       | 102**                   | 104**                  | 102%       |
| 5           | 41,3                   | 5,0                        | 50,8                    | 48,5                   | 95%        |
|             |                        | 10,0                       | 60,1                    | 56,1                   | 93%        |
|             |                        | 25,0                       | 87,0                    | 93,2                   | 107%       |

\* Calculul concentrației prevăzute de 25-OH-D include factorul de diluție introdus cu soluția adăugată.

\*\* Acestea sunt valorile extrapolate, concentrația măsurată este > 100 ng/mL (probă-etalon principal)

### 16.3 Sensibilitatea analizei (Limite de detectare)

Sensibilitatea acestei analize, când e definită ca fiind cantitatea cea mai mică diferită de zero la 2 deviații standard sub CPM mediu al probei-etalon zero (n = 20), s-a demonstrat ca fiind mai mică sau egală cu 1,5 ng/mL. Acest nivel de sensibilitate e valabil atât pentru utilizarea etalonului "1", cât și pentru a celui "Opțional".

### 16.4 Specificitatea analitică

Datele privind reactivitatea încrucișată a antiserului folosit în acest kit sunt exprimate ca fiind raportul dintre concentrația 25-OH-D și concentrația substanței reactive încrucișate la o inhibiție de 50% a legării maxime.

| Steroid        | % Reactivitate încrucișată |
|----------------|----------------------------|
| Vitamina D2    | 0,8                        |
| Vitamina D3    | 0,8                        |
| 25-OH-D2       | 100                        |
| 25-OH-D3       | 100                        |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                        |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                        |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                        |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                        |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0                       |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0                       |

**CONSULTAȚI ULTIMA PAGINĂ PENTRU REFERINȚE**

## SCHEMA ANALIZEI

1. Extrageți probele: Turnați 500 uL de acetonitril într-o eprubetă de sticlă și adăugați încet 50 uL de probă-etalon, probă-martor sau probă de la pacient, sub suprafața acetonitrilului. Agitați în Vortex timp de 10 secunde și centrifugați la 1200 x g\* timp de 10 minute la 20-25°C.
2. Turnați reactivii conform următoarei scheme:

| Eprubete/Reactivi         | Numărători totale | NSB    | Etalon 0-6 | Etaloane și probe necunoscute |
|---------------------------|-------------------|--------|------------|-------------------------------|
| Etaloane 0 extrase        | -                 | 25 uL  | -          | -                             |
| Etaloane extrase          | -                 | -      | 25 uL      | -                             |
| Etaloane extrase          | -                 | -      | -          | 25 uL                         |
| Probe necunoscute extrase | -                 | -      | -          | 25 uL                         |
| Trasor                    | 50 uL             | 50 uL  | 50 uL      | 50 uL                         |
| Tampon NSB/ de adăugire   | 1,0 mL            | 1,0 mL | -          | -                             |
| Antiser 25-OH-D           | -                 | -      | 1,0 mL     | 1,0 mL                        |

3. Amestecați bine, incubați timp de 90 minute (+/- 10 minute) la 20-25°C.
4. Adăugați 500 uL de complex de precipitare DAG în toate recipientele, cu excepția eprubetelor pentru număratoarea totală.
5. Amestecați bine, incubați timp de 20-25 minute la 20-25°C.
6. Adăugați 500 uL de Tampon NSB/de adăugire în toate recipientele, cu excepția eprubetelor pentru număratoarea totală.
7. Centrifugați la 1800 x g\* timp de 20 minute.
8. Decantați supernatanții.
9. Efectuați număratoarea pentru fiecare eprubetă într-un contor de raze gamma, timp de minim 60 secunde.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{raza în cm}) (\text{rpm})^2$$

## КИТ ЗА РАДИОИМУНОЛОГИЧЕН АНАЛИЗ (РИА, RIA) С <sup>125</sup>I НА 25-ХИДРОКСИВИТАМИН D

### 1. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ

ЗА *ИН ВИТРО* ДИАГНОСТИКА.

Настоящият кит е предназначен за количествено определяне на 25 хидроксивитамин D (25-OH-D) и на други хидроксилирани метаболити на витамин D в човешки серум или плазма и се използва за оценката на количеството на витамин D в организма. Резултатите от теста трябва да се използват съвместно с други клинични и лабораторни данни в помощ на клинициста при вземане на решения по отношение на лечението на отделни пациенти в популацията от възрастни пациенти.

### 2. КРАТКО ИЗЛОЖЕНИЕ И ОБЯСНЕНИЕ

След навлизане на калциферола (витамин D) в циркулацията той се метаболизира до няколко съединения, като главното от тях е 25-хидроксикалциферол (25-OH-D). Първата стъпка в метаболизма на витамин D - 25 хидроксилирането - протича главно в черния дроб.<sup>1</sup> При човека само малка част от 25-OH-D се метаболизира в бъбреците до други метаболити на дихидроксивитамин D.<sup>2,3</sup> Тъй като 25-OH-D е преобладаващата циркулираща форма на витамин D в здравата популация, смята се, че тя е най-надеждният показател за статуса по отношение на витамин D.<sup>4</sup>

Двете главни форми на 25-OH-D са холекалциферол (витамин D<sub>3</sub>) и ергокалциферол (витамин D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> Витамин D<sub>3</sub> се образува главно под въздействието на ултравиолетовите лъчи в кожата, докато D<sub>2</sub> се получава главно от източници в храната. Тъй като тези две родителски съединения имат различен принос за формиране на общия статус по отношение на витамин D на отделния индивид, важно е и двете форми да се измерват по един и същ начин.<sup>6,7</sup> Проведени са голям брой научни изследвания, които предоставят информация за нивата на 25-OH-D в циркулацията и неговия метаболизъм, както и за физиологичното им значение.

Измерването на 25-OH-D придобива все по-голямо значение за лечението на пациенти с различни разстройства на калциевия метаболизъм, свързани с рахита, неонаталната хипокалциемия, бременността, хранителната и бъбречната остеодистрофия, хипопаратиреоидизма и постменопаузалната остеопороза.<sup>6,8-10</sup>

**ЗАБЕЛЕЖКА:** Не са установени специфичните характеристики на теста DiaSorin 25-OH-D в детски популации.

### 3. ПРИНЦИП НА ТЕСТА

Тестът DiaSorin 25-OH-D включва процедура от две стъпки. Първата стъпка се състои от бърза екстракция с ацетонитрил на 25-OH-D и други хидроксилирани метаболити от серум или плазма. След екстракцията третираната проба се анализира с помощта на равновесна процедура на РИА. Методът на РИА се базира на антитяло със специфичност към 25-OH-D. Пробата, антитялото и изотопният индикатор се инкубират за 90 минути при 20-25°C. След 20-минутна инкубация при 20-25°C се осъществява сепарация на фазите с втори преципитиращ антитялото комплекс. След инкубацията и преди центрофугирането се добавя буфер "NSB/добавяне", за да подпомогне намаляването на неспецифичното свързване.

#### 4. ВКЛЮЧЕНИ В КИТА РЕАГЕНТИ

|                                   |                  |
|-----------------------------------|------------------|
| 25-OH-D калибратори               | 6 флакона/1 ml   |
| 25-OH-D буфер "NSB/добавяне"      | 1 бутилка/70 ml  |
| 25-OH-D антисерум                 | 1 бутилка/105 ml |
| 25-OH-D изотопен индикатор        | 1 флакон/6 ml    |
| 25-OH-D DAG преципитиращ комплекс | 2 флакона/30 ml  |
| 25-OH-D контроли                  | 2 флакона/1 ml   |
| 25-OH-D ацетонитрил               | 2 флакона/15 ml  |
| Брой тестове                      | 100              |

**СЪХРАНЕНИЕ:** След получаване китът трябва да се съхранява при 2-8°C. След разпечатване всеки реагент трябва да се съхранява при 2-8°C до датата на изтичане на срока на годност, посочена върху етикета. Реагентите не трябва да се използват след датата на изтичане на срока на годност. Датата на изтичане на срока на годност на кита е посочена върху външния етикет и отговаря на датата на изтичане на срока на годност на изотопния индикатор.

Не трябва да се смесват реагенти от различни партии.

**4.1 25-OH-D буфер "NSB/добавяне":** готов за употреба реагент  
Фосфатно-желатинов буфер, съдържащ 0,1% натриев азид. Този компонент има двойна функция. Той изпълнява функцията както на NSB буфер, така и на буфер за добавяне.

**4.2 25-OH-D калибратори:** готов за употреба реагент  
Шест (25-OH-D<sub>3</sub>) калибратори в концентрации в диапазона 0-100 ng/ml са предварително разредени в обработен човешки серум, съдържащ 0,1% натриев азид. Работете внимателно с тези реагенти (вж. "Предупреждения и предпазни мерки"). Калибраторите на кита са калибрани с помощта на УВ квантификация и потвърдени с ВЕТХ анализ. Калибраторите на кита са взаимозаменяеми между пробите на пациентите, ако се използват, както се препоръчва, с реагентите и оперативните процедури на настоящия ин витро диагностичен тест.

**ЗАБЕЛЕЖКА:** По желание може да бъде създаден калибратор "По избор" (2,5 ng/ml) чрез разреждане 1:2 на калибратор "1" на кита в нулевия калибратор на кита (т.е. 100  $\mu$ l "1" + 100  $\mu$ l "0"). Това разреждане трябва да бъде извършено преди екстракцията, след което екстракцията да бъде извършена според листовката на продукта.

**4.3 25-OH-D антисерум:** готов за употреба реагент.  
Кози анти-25-OH-D серум е разреден във фосфатно-желатинов буфер, съдържащ 0,1% натриев азид.

**4.4 25-OH-D<sub>3</sub> изотопен индикатор:** готов за употреба реагент.  
Йодиран [<sup>125</sup>I] аналог на 25-OH-D<sub>3</sub> е разреден в етанол-фосфатен буфер. Работете внимателно с този реагент (вж. "Предупреждения и предпазни мерки").

**4.5 Магарешки анти-кози (DAG) преципитиращ комплекс:** готов за употреба реагент.

Магарешки анти-кози серум, стандартен кози серум и полиетилен гликол са разредени в BSA-боратен буфер, съдържащ гентамицин сулфат и 0,1% натриев азид. Разбъркайте за 5-10 минути преди и по време на употреба, за да осигурите получаване на хомогенна суспензия.

**4.6 25-OH-D контроли:** готов за употреба реагент.  
Човешки серум, съдържащ 0,1% натриев азид, е маркиран със съответни количества 25-OH-D<sub>3</sub>, за да се получат концентрации на контролите, попадащи в определени обхвати. Разбъркайте щателно и третирайте като неизвестни проби. Контрола 1 е представителна за нисък-нормален обхват, а контрола 2 е представителна за висок-нормален обхват. Диапазонът от концентрации за всяка контрола е указан на сертификата за анализ и показва границите за контролните стойности, определени от DiaSorin, които могат да бъдат получени при достоверни анализи с теста. Работете внимателно с тези реагенти (вж. "Предупреждения и предпазни мерки").

#### **4.7 Ацетонитрил:** готов за употреба реагент.

Ацетонитрил. Отговаря на изискванията за използване с настоящия кит. Работете внимателно с този реагент (вж. "Предупреждения и предпазни мерки"). Този продукт съдържа сух естествен каучук.

### **5. ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ**

#### **ЗА ИН ВИТРО ДИАГНОСТИКА.**

Не е предназначен за вътрешно или външно приложение при хора или животни.

**ВНИМАНИЕ:** Настоящото изделие може да бъде получавано, придобивано, притежавано и използвано само от лекари, клинични лаборатории, болници, ветеринарни лекари или научни институции. Тестовите трябва да се провеждат само от подходящо квалифициран и обучен лабораторен персонал.

#### **РЕАГЕНТИ, СЪДЪРЖАЩИ МАТЕРИАЛ ОТ ЧОВЕШКИ ПРОИЗХОД**

##### **Третирайте като потенциално инфекциозни.**

Всички серумни/плазмени единици, използвани за приготвянето на този продукт, са тествани с одобрен от Администрацията за контрол на качеството на хранителните продукти и лекарствените средства на САЩ (U.S. FDA) метод за наличие на HBsAg, антитела към HCV и към HIV 1/2 и са нереактивни. Въпреки че тези методи са с висока точност, те не гарантират, че ще бъдат открити всички инфектирани единици. Този продукт може да съдържа и други материали от човешки произход, за които няма одобрени тестове. Тъй като нито един познат метод за изследване не може да гарантира с пълна сигурност липсата на вируса на хепатит В (HBV), вируса на хепатит С (HCV), вируса на придобитата имунна недостатъчност при човека (HIV) или на други инфекциозни агенти, с всички продукти, съдържащи материал от човешки произход, трябва да се работи в съответствие с добрите лабораторни практики с прилагане на съответните предпазни мерки, както е описано в ръководството на Центровете за профилактика и контрол на болестите/Националния здравен институт "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", издание от 04.05.1999 г. или текущото издание.

#### **РЕАГЕНТИ, СЪДЪРЖАЩИ НАТРИЕВ АЗИД**

**ВНИМАНИЕ:** Някои реагенти от този кит съдържат натриев азид. Натриевият азид може да реагира с оловни или медни водопроводни инсталации и да образува силно експлозивни метални азиди. При изхвърляне промийте с обилно количество вода, за да предотвратите натрупването на азид (Директива на Съвета 1999/45/ЕС). За допълнителна информация вж. "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," в Manual Guide-Safety Management No. CDC-22, издадено от Центровете за контрол и профилактика на болестите, Атланта, Джорджия. САЩ 1976 г.

#### **Предупредителни фрази относно риска в Европейските Общности (Директива на Съвета 1999/45/ЕС)**

R 20/21/22 – Вреден при вдишване, контакт с кожата и поглъщане.

R 32 - При контакт с киселини се отделя силно токсичен газ.

S28 - След контакт с кожата, тя веднага да се измие обилно с вода.

#### **РЕАГЕНТИ, СЪДЪРЖАЩИ АЦЕТОНИТРИЛ**

#### **Предупредителни фрази относно риска в Европейските Общности (Директива на Съвета 88/379/ЕС)**

R11 – Лесно запалим.

R23/24/25 – Токсичен при вдишване, контакт с кожата и поглъщане.

S16 - Да се съхранява далече от източници на запалване - да не се пуши.

S36 - Да се носи подходящо защитно облекло.

S43 - При пожар да се използва сух химикал или въглероден диоксид.

S45 - При злополука или неразположение да се потърси незабавно медицинска помощ.

S51 - Да се използва само на проветриви места.



## **РЕАГЕНТИ, СЪДЪРЖАЩИ ЕТАНОЛ**

### **ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ - ЗАПАЛИМ**

**Предупредителни фрази относно риска в Европейските Общности (Директива на Съвета 88/379/ЕС)**

R11 – Лесно запалим.

S16 - Да се съхранява далече от източници на запалване - да не се пуши.

S43 - При пожар да се използва сух химикал или въглероден диоксид.

### **РЕАГЕНТИ, СЪДЪРЖАЩИ ЙОД-125**

Настоящият кит съдържа радиоактивен материал, който не превишава 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) на йод-125. При съхранение, работа с и изхвърляне на този материал предприемайте подходящи предпазни мерки и спазвайте добрите лабораторни практики.

За практикуващи лица или институции, получаващи радиоизотопи по силата на общо разрешително:

Настоящият радиоактивен материал може да бъде получаван, придобиван, притежаван и използван само от лекари, ветеринарни лекари, когато практикуват ветеринарна медицина, клинични лаборатории или болници и само за ин витро клинични или лабораторни тестове, които не включват вътрешно или външно приложение на материала, или на радиация от него, на човешки същества или животни. Неговото получаване, придобиване, притежание, използване и трансфер се извършват съгласно нормативните документи и общото разрешително на Комисията за ядрено регулиране на САЩ или на щата, с който Комисията е сключила споразумение за упражняване на регулаторни правомощия.

1. Радиоактивни материали трябва да се съхраняват само в специално определена зона.
2. Достъпът до радиоактивни материали трябва да се ограничи само до упълномощен персонал.
3. Не пипетирайте радиоактивни материали с уста.
4. Не се хранете или пийте течности в рамките на зоните, определени за работа с радиоактивни материали.
5. Зоните, където могат да настъпят разливи, трябва да се подсушат и след това трябва да се измият с алкален детергент или разтвор за радиологична деконтаминация. Всички използвани стъклени съдове трябва да се изплакнат цялостно с вода преди измиване заедно с друга лабораторна стъклария.

За практикуващи лица или институции, получаващи радиоизотопи по силата на ограничено разрешително:

Получаването, използването, трансферът и изхвърлянето на радиоактивни материали се извършват съгласно нормативните документи и условията на вашето ограничено разрешително.

**ПРЕДУПРЕЖДЕНИЕ:** Този продукт съдържа химикал, за който в щата Калифорния е известно, че причинява рак.

**ВАЖНО:** Посочената в листовката радиоактивност може да бъде малко по-различна от радиоактивността, отбелязана върху етикета на кутията и върху етикета на флакона с изотопен индикатор. Върху етикета на кутията и етикета на флакона на изотопния индикатор е посочено реалното количество радиоактивност на датата на калибрацията, докато в листовката е посочена теоретичната радиоактивност на кита.

## **6. ПРИЗНАЦИ ЗА ВЪЗМОЖНО ВЛОШАВАНЕ НА КАЧЕСТВОТО НА**

### **РЕАГЕНТИТЕ НА КИТА**

- 6.1 Наличие на абнормни частици материал в който и да е от реагентите. (NSB буферът, антисерумът и DAG преципитиращите реагенти могат да показват помътняване.)
- 6.2 Изместване на наклона или позицията на калибрационната крива от нормалното положение.
- 6.3 Намаляване на максималното свързване.
- 6.4 Високо неспецифично свързване.

## 7. ВЗЕМАНЕ И ПОДГОТОВКА НА ПРОБИ

За екстракция на 25-ОН-D са необходими петдесет (50) микролитра серум или плазма (с ЕДТА или хепарин); количество от 150 микролитра разрешава повторен анализ и също така осигурява адекватни количества за пипетиране.

С този кит може да се използва или човешки серум, или плазма. В настоящият тест могат да се използват антикоагулантите ЕДТА или хепарин. Препоръчва се вземане на проби на гладно, но това не е задължително. Кръв трябва да се взема с асептична техника чрез венепункция в 5 или 10 ml вакуумирани стъклени епруветки. Оставете кръвта да се съсери при стайна температура (15-25°C). Центрофугирайте за 15 минути на приблизително 760 x g\*, за да се получат серуми без хемолиза. Не са нужни добавки или консерванти за поддържане на целостта на пробата. Всички пластмасови, стъклени или други материали, влизащи в контакт с пробата, трябва да бъдат без каквато и да е контаминация. Съхранявайте серумните или плазмените проби при -20°C или по-ниска температура. Пробите могат да се съхраняват в стъклени или пластмасови флакони, ако те са плътно запечатани за предотвратяване изсъхването на пробата.

Проучване, проведено от DiaSorin с ограничен брой проби от пациенти, показва, че пробите са стабилни до 9 седмици, ако се съхраняват при -20°C. Не се наблюдават значими промени в стойностите след 3 цикъла на замразяване-размразяване на пробите. Повтарящи се цикли на замразяване-размразяване трябва да се избягват. Транспортирани проби по принцип трябва да пристигат замразени.

## 8. НЕОБХОДИМИ МАТЕРИАЛИ И ОБОРУДВАНЕ, КОИТО НЕ СЕ ДОСТАВЯТ

- Епруветки от боросиликатно стъкло за еднократна употреба, 12 x 75 mm.  
**ЗАБЕЛЕЖКА:** Пластмасови епруветки не са подходящи за използване с този кит.
- Центрофуга с контролирана температура, побираща епруветки 12 x 75 mm.
- Гама брояч, способен да брой йод-125.
- Вортекс миксер.
- Пипетиращи устройства
  - а. Микропипетори, калибрирани за накапване на 25 µl и 50 µl (неточност по малка или равна на ± 1%).
  - б. Многократни дозатори, използващи връхчета, които са калибрирани за накапване на 50 µl, 500 µl и 1,0 ml (неточност по малка или равна на ± 1%).

**ЗАБЕЛЕЖКА:** При процедурите за екстракция и анализ по-долу направете справка в "Необходими материали и оборудване, които не се доставят" за спецификациите на пипетите.

## 9. ПРОЦЕДУРА ЗА ЕКСТРАКЦИЯ

- 9.1 За всеки калибратор, контрола и проба на пациент подгответе 12 x 75 mm стъклени епруветки за еднократна употреба с етикет.
- 9.2 Добавете 500 µl ацетонитрил към всяка епруветка.
- 9.3 Въведете връхче на пипета, съдържащо 50 µl от калибратора, контролата или пробата на пациента под повърхността на ацетонитрила и БАВНО добавете към ацетонитрила.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{радиус в cm}) (rpm)^2$$

- 9.4 Обработете с вортекс миксер за 10 секунди.
- 9.5 Центрофугирайте при 1 200 x g\* за 10 минути при 20-25°C.
- 9.6 Пипетирайте две 25 µl аликвоти от супернатанта в отделни 12 x 75 mm епруветки със съответни етикети. **ВНИМАНИЕ:** Внимавайте да не нарушите целостта на утайката.
- 9.7 Анализирайте супернатантите в съответствие с процедурата на теста.

#### 10. ПРОЦЕДУРА НА ТЕСТА

- 10.1 Оставете всички реагенти и проби да се темперират при стайна температура. Не позволявайте реагентите да достигнат температури над 25°C.
- 10.2 Подгответе две копия 12 x 75 mm стъклени епруветки за еднократна употреба с етикети според схемата на теста на последната страница.
- 10.3 Добавете реагентите, както следва:
  - a. **Епруветки за общ брой импулси**  
50 µl от <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 ml от буфера "NSB/добавяне"
  - b. **Епруветки за неспецифично свързване (nonspecific binding, NSB)**  
25 µl от калибратор "0" (екстрахиран)  
50 µl от <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 ml от буфера "NSB/добавяне"
  - v. **Калибратори, контроли и неизвестни проби**  
25 µl от калибратора, контролата или неизвестната проба (екстрахирана)  
50 µl от <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1,0 ml от 25-OH-D антисерума
- 10.4 Обработете внимателно с вортекс миксер без образуване на пяна и инкубирайте за 90 (+/- 10) минути при 20-25°C.
- 10.5 Добавете 500 µl от DAG преципитация комплекс (DAG преципитацият комплекс трябва да се разбърква добре преди и по време на употребата) към всички епруветки, освен към тези за общ брой импулси.
- 10.6 Разбъркайте епруветките добре и инкубирайте за 20-25 минути при 20-25°C.
- 10.7 Добавете 500 µl от буфера "NSB/добавяне" към всички епруветки, освен към тези за общ брой импулси. Обработете внимателно с вортекс миксер за добро разбъркване на епруветките. Изпълнявайте тази стъпка с повишено внимание, за да избегнете разплискване поради голямото количество течност в епруветката.
- 10.8 Центрофугирайте всички епруветки за 20 минути при 20-25°C на 1 800 x g\*, освен тези за общ брой импулси.
- 10.9 Отдекантирайте супернатантите, освен от епруветките за общ брой импулси, използвайки поставка за епруветки от пяна или еквивалентна като обърнете поставката над подходящ контейнер за отпадъци. Поставете обърнатата поставка върху попивателна хартия за 2-3 минути. Попийте епруветките внимателно, за да осигурите отстраняване на цялата течност.
- 10.10 Извършете броене за всяка епруветка за най-малко 1 минута в гама сцинтилационен брояч. Броенето за всяка епруветка трябва да се извърши за достатъчен период от време за постигане на статистическа точност. (Вж. раздела за резултатите: Ограничения на процедурата.)

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{радиус в cm}) (\text{rpm})^2$$

## 11. БЕЛЕЖКИ ПО ПРОЦЕДУРАТА

- 11.1 Добавяйте всяка алиquotна част от реагента към долната третина на епруветката за тестване, за да осигурите пълно смесване на реагентите.
- 11.2 За цялостно проследяване на постоянството на характеристиките на РИА съществуват допълнителни фактори, които могат да бъдат проверявани. DiaSorin предлага редовна проверка на следните параметри за осигуряване постоянство на характеристиките на кита.
- a. **Общ брой импулси**
  - b. **Максимално свързване**  
Среден брой импулси за минута (ИЗМ) (counts per minute, CPM) на епруетка с калибратор "0"/Среден ИЗМ на епруетки за общ брой импулси.
  - в. **Неспецифично свързване**  
Среден брой ИЗМ на епруетка за NSB/среден брой ИЗМ на епруетки за общ брой импулси.
  - г. **Наклон на калибрационната крива**  
Например проследявайте точките за 80 и 50% на калибрационната права.

## 12. КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО

За мониторинг на характеристиките на анализа всяка лаборатория трябва да включва поне две контроли (една при ниско-нормално ниво и една при високо-нормално ниво) във всеки анализ. Могат да се използват предлагани на пазара контроли или двете референтни контроли, включени в кита. Контролите на кита са оценени от DiaSorin с помощта на кита DiaSorin 25-хидроксивитамин D 125I РИА. Диапазонът от концентрации за всяка контрола е указан на сертификата за анализ и показва границите за контролните стойности, определени от DiaSorin, които могат да бъдат получени при достоверни анализи с теста.

Контролите трябва да бъдат третирани като неизвестни проби и да бъдат анализирани в две копия. Трябва да бъдат поддържани диаграми за контрол на качеството за проследяване на характеристиките на контролите. Всяка отделна лаборатория трябва да определи приемливи граници на характеристиките на всяко ниво на контролиране, използвайки основаващи се на статистиката методи, структурирани да откриват както системни, така и случайни грешки. Преди докладване на резултатите от теста на пациентите, резултатите за контролите трябва да са в съответствие с критериите за приемливост на лабораторията.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Съществуват много методи за изчисляване на резултатите от РИА. Всеки от тях се базира на построяването на калибрационна крива чрез графично представяне на степента на свързване спрямо дадени концентрации на калибраторите за калибриране. Тази графика може да бъде или линейна, или логаритмична скала. Всеки от тези методи по принцип дава едни и същи стойности за контролите и пробите, макар някои анализи да "пасват" по-добре на даден конкретен метод в сравнение с друг. Методът за изчисляване в лабораторията за контрол на качеството на DiaSorin е % В/В<sub>0</sub> спрямо log от концентрацията.

- 13.1 Изчислете средния брой на ИЗМ за всеки калибратор, контрола и неизвестна проба.
- 13.2 Извадете средния брой на ИЗМ за NSB епруетките от общия брой на импулсите.

- 13.3** Разделете коригирания брой на ИЗМ за всеки калибратор, контрола или неизвестна проба на коригирания брой ИЗМ за калибратора "0".

$$V/B_0 (\%) = \frac{\text{ИЗМ на калибратора или неизвестната проба} - \text{ИЗМ на NSB}}{\text{ИЗМ на калибратора "0"} - \text{ИЗМ на NSB}} \times 100$$

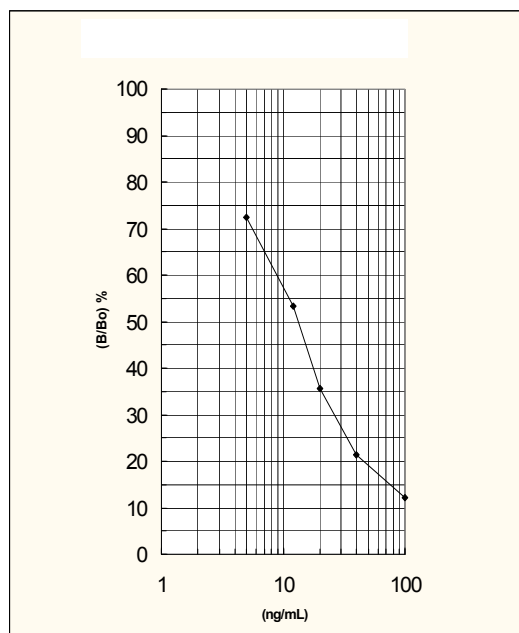
- 13.4** Използвайте 2-циклова полу-log или log-logit графична хартия, нанесете графично процента V/B<sub>0</sub> за 25-OH-D калибраторите (вертикална ос) спрямо концентрацията (хоризонтална ос)
- 13.5** Начертайте най-пряката линия между точките.
- 13.6** Интерполирайте от графиката нивата на 25-OH-D в неизвестните проби.
- 13.7** Ако дадена неизвестна проба е била разреждана, коригирайте с подходящия коефициент на разреждане.
- 13.8** Изчислете максималното свързване чрез разделяне на ИЗМ на калибратора "0" на средния общ брой на импулсите, получени от епруветките за общ брой импулси.
- 13.9** За анализ на данните могат също да се използват автоматизирани програми за редукция на данни. DiaSorin използва RIACalc (Pharmacia) с%V/B<sub>0</sub> спрямо log от концентрацията, програма smooth-SPLINE fit. Преди внедряване за редовна употреба, другите методи за редукция на данни трябва да бъдат валидирани.

**ТАБЛИЦА I**  
Данни за проби от теста DiaSorin 25-OH-D витамин D РИА

| Епруветка        | Второ копие ИЗМ                  | Среден брой ИЗМ | Коригиран брой ИЗМ | Процент свързване (В/Т) | Процент (В/В <sub>0</sub> ) | Конц. на графиката (ng/ml) |
|------------------|----------------------------------|-----------------|--------------------|-------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Общ брой импулси | 41878                            | 40901           |                    |                         |                             |                            |
| NSB              | 39924<br>555<br>508              | 531             |                    | 1,3                     |                             |                            |
| Калибратор "0"   | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822           | 19291              | 48,5                    |                             |                            |
| Калибратори      |                                  |                 |                    |                         |                             |                            |
| 1                | 14503<br>14442                   | 14472           | 13941              |                         | 72,3                        | 5                          |
| 2                | 11005<br>10670                   | 10838           | 10307              |                         | 53,4                        | 12                         |
| 3                | 7182<br>7642                     | 7411            | 6880               |                         | 35,7                        | 20                         |
| 4                | 4687<br>4622                     | 4654            | 4123               |                         | 21,4                        | 40                         |
| 5                | 2768<br>2985                     | 2877            | 2346               |                         | 12,2                        | 100                        |
| Неизвестни проби |                                  |                 |                    |                         |                             |                            |
| 1                | 10365<br>10447                   | 10406           |                    |                         | 53,9                        | 12,8                       |
| 2                | 4219<br>4720                     | 4634            |                    |                         | 24,0                        | 40,4                       |

Типични данни за проби и калибрационна крива са показани в ТАБЛИЦА I и ФИГУРА 1. Тази информация е само за справка и не трябва да се използва за изчисляване на стойности.

#### СТАНДАРТНА КРИВА ЗА ПРОБИ 25-ХИДРОКСИВИТАМИН D



Фигура 1

#### 14. ОГРАНИЧЕНИЯ НА ПРОЦЕДУРАТА

- 14.1 Времената за броене трябва да бъдат достатъчни за предотвратяване на статистическа грешка (например акумулиране на 2 000 ИЗМ ще даде 5% грешка; 10 000 ИЗМ ще даде 1% грешка).
- 14.2 Резултатите от теста трябва да се използват съвместно с други клинични и лабораторни данни в помощ на клинициста при вземане на решения по отношение на лечението на отделни пациенти.
- 14.3 Ефектите, дължащи се на хемолиза или липемия в пробите на пациентите, не са подлагани на оценка за този тест. Очаква се, обаче, екстракцията с ацетонитрил да минимизира всякакви влияния, дължащи се на тези вещества.
- 14.4 Най-големият източник на неточност при този метод е вероятно да бъде етапът на екстракцията. Други източници на непрецизност в процедурата могат да бъдат неточни пипетори или остарели реагенти.
- 14.5 Антитялото на кита показва известна кръстосана реактивност с всички форми на дихидрокси витамин D2 и D3 стероидите. При хората, обаче, тези съставки присъстват естествено в пикомоларни концентрации.

**ЗАБЕЛЕЖКА:** Не са установени характеристиките на функционирането на настоящия тест в детски популации.

## 15. ОЧАКВАНИ СТОЙНОСТИ

### Референтен обхват

Важно е за всяка лаборатория да определи своя собствен референтен обхват, представителен за типичната популация, с която работи. За фактори, като излагането на УВ лъчи<sup>9,10</sup>, сезона<sup>11,12</sup>, расата<sup>7</sup> и приема с храната<sup>8</sup>, е известно, че оказват влияние върху концентрациите на 25-ОН-D при хората. В литературата се съобщава за намаляване на нивата на витамин D с възрастта. Научните изследвания, проведени в рамките на повечето от тези проучвания, обаче, са извършени в северноевропейските страни, където има по-слабо слънцегреене и по-слабо разпространена фортификация на храните.<sup>8,15,16</sup> Това, заедно с вариращите в широки граници различия в здравните критерии и приемането на медикаменти, прави трудно обобщаването на ефекта само от възрастта върху статуса по отношение на витамин D.<sup>12</sup> Резултатите от проведени в САЩ проучвания дават двусмислени резултати, някои показващи появяване на влошаване на статуса по отношение на витамин D с възрастта, а други липса на влошаване. Показано е, че противогърчовите средства причиняват спад на нивата на 25-ОН-D, както и продължителната употреба на средства за предпазване от слънчевите лъчи, контаминирани с р-аминобензоена киселина.<sup>17</sup> DiaSorin не е установила референтен обхват за използване на настоящия кит в педиатрията.

DiaSorin е оценила серум, взет от 20 мъже и 24 жени, видимо здрави, главно доброволци от бялата раса от средния запад на САЩ, използвайки кита DiaSorin 25-хидроксивитамин D <sup>125</sup>I РИА. Възрастта на доброволците е в обхвата 23 - 67 години. Пробите са вземани през месец октомври. В тази референтна група се наблюдава единствено лека разлика в нивата на 25-ОН-D между мъжете (средна стойност = 21,7 ng/ml) и жените (средна стойност = 24,1 ng/ml). Средната стойност за цялата популация (n = 44) е 23,0 ng/ml с 2 S.D. обхват от 9,0 – 37,6 ng/ml.

В много страни се наблюдава висока честота на субклиничния дефицит на 25 ОН витамин D сред нормални видимо здрави популации, особено през зимните месеци.<sup>13,14</sup> В последните литературни материали се предлагат следните обхвати за класификация на статуса по отношение на 25 ОН витамин D: Дефицит: 0 до 5 ng/ml (0 – 12,5 pmol/l); Недостатъчност: 5 до 20 ng/ml (12,5 – 50 pmol/l); хиповитаминоза D: 20 до 40 ng/ml (50 – 100 pmol/l); Достатъчно количество: 40 до 100 ng/ml (100 – 250 pmol/l); и токсичност: повече от 100 ng/ml (> 250 pmol/l).<sup>24</sup>

## 16. КОНКРЕТНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА ФУНКЦИОНИРАНЕТО

### 16.1 Прецизност

Прецизността на теста е оценена от DiaSorin чрез изследване на четири контролни нива, с крива, покриваща 23 работни дни с 40 теста. Всеки тест включва четирите контроли x 2 екстракции (4 репликата). Дизайнът на проучването съответства на ръководните правила на CLSI Document EP5-T2.<sup>22</sup> Данните са изчислени с помощта на SAS PROC VARCOMP. Използваният статистически модел представлява линеен модел на случайните ефекти.<sup>23</sup>

| Средна стойност (ng/ml) | В рамките на работен цикъл (% C.V.) | Обща непрецизност (% C.V.) |
|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| 8,6                     | 11,7                                | 9,4                        |
| 22,7                    | 10,5                                | 8,2                        |
| 33,0                    | 8,6                                 | 9,1                        |
| 49,0                    | 12,5                                | 11,0                       |

### 16.2 Действителност (правилност)

Действителността на теста е проверена чрез тестове с разреждане и възстановяване.

#### ЛИНЕЙНОСТ (ПАРАЛЕЛИЗЪМ)

Проучване с последователни разреждания на 4 проби на пациенти (стойности = ng/ml)

| Проба | Неразредена | 1/2  | ¼    |
|-------|-------------|------|------|
| 1     | 74,6        | 79,4 | 74,8 |
| 2     | 87,8        | 96,4 | 95,2 |
| 3     | 85,6        | 88,2 | 82,4 |
| 4     | 55,2        | 57,8 | 60,4 |

### Възстановяване

Към серумни проби на пациенти са добавени известни количества 25-ОН-D3 и е определен процентът на възстановяване.

| Проба<br>Номер | Начална<br>конц.<br>(ng/ml) | Маркирано<br>количество<br>(ng/ml) | *Очаквана<br>конц.<br>(ng/ml) | Измерена<br>конц.<br>(ng/ml) | Възстановяване |
|----------------|-----------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|
| 1              | 15,8                        | 5,0                                | 25,5                          | 24,8                         | 97%            |
|                |                             | 10,0                               | 35,1                          | 41,8                         | 119%           |
|                |                             | 25,0                               | 62,7                          | 61,9                         | 99%            |
| 2              | 51,2                        | 5,0                                | 60,6                          | 62,0                         | 102%           |
|                |                             | 10,0                               | 69,8                          | 73,8                         | 106%           |
|                |                             | 25,0                               | 96,4                          | 99,4                         | 103%           |
| 3              | 26,6                        | 5,0                                | 36,2                          | 33,5                         | 92%            |
|                |                             | 10,0                               | 45,7                          | 54,0                         | 118%           |
|                |                             | 25,0                               | 73,0                          | 82,8                         | 113%           |
| 4              | 57,3                        | 5,0                                | 66,6                          | 63,8                         | 96%            |
|                |                             | 10,0                               | 75,8                          | 78,1                         | 103%           |
|                |                             | 25,0                               | 102**                         | 104**                        | 102%           |
| 5              | 41,3                        | 5,0                                | 50,8                          | 48,5                         | 95%            |
|                |                             | 10,0                               | 60,1                          | 56,1                         | 93%            |
|                |                             | 25,0                               | 87,0                          | 93,2                         | 107%           |

\* Изчислението на очакваната 25-ОН-D концентрация включва коефициент на разреждане, въведен от разтвора за маркиране.

\*\* Това са екстраполирани стойности, измерената концентрация е > 100 ng/ml (горен калибратор)

### 16.3 Аналитична чувствителност (праг на откриваемия минимум)

Чувствителността на настоящият тест, ако се дефинира като най-малкото количество, различно от нула, при 2 стандартни отклонения под средния брой импулси за минута на нулевия калибратор (n = 20), е установена като равна или по-малка от 1,5 ng/ml. Това ниво на чувствителност се отнася както за използването на калибратор "1", така и на калибратора "По избор".



#### 16.4 Аналитична специфичност

Данните за кръстосаната реактивност на антисерума, използван в този кит, са изразени като съотношението на концентрацията на 25-OH-D към концентрацията на кръстосано реагиращото вещество при 50% инхибиция на максималното свързване.

| Стероид        | % Кръстосана реактивност |
|----------------|--------------------------|
| Витамин D2     | 0,8                      |
| Витамин D3     | 0,8                      |
| 25-OH-D2       | 100                      |
| 25-OH-D3       | 100                      |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                      |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                      |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                      |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                      |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0                     |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0                     |

#### ЗА ЛИТЕРАТУРАТА ВЖ. ПОСЛЕДНАТА СТРАНИЦА

#### СХЕМА НА ТЕСТА

1. Екстракция на проби: Накапете 500  $\mu$ l ацетонитрил в стъклена епруветка и бавно добавете 50  $\mu$ l от калибратора, контролата или пробата на пациента под повърхността на ацетонитрила. Обработете с вортекс миксер за 10 секунди и центрофугирайте на 1 200 x g\* за 10 минути при 20-25°C.
2. Накапвайте реагентите според следната схема:

| Епруветки/реагенти            | Общ брой импулси | NSB        | Cal 0-6    | Контроли и неизвестни проби |
|-------------------------------|------------------|------------|------------|-----------------------------|
| Екстрахирани "0" калибратори  | -                | 25 $\mu$ l | -          | -                           |
| Екстрахирани калибратори      | -                | -          | 25 $\mu$ l | -                           |
| Екстрахирани контроли         | -                | -          | -          | 25 $\mu$ l                  |
| Екстрахирани неизвестни проби | -                | -          | -          | 25 $\mu$ l                  |
| Изотопен индикатор            | 50 $\mu$ l       | 50 $\mu$ l | 50 $\mu$ l | 50 $\mu$ l                  |
| Буфер "NSB/добавяне"          | 1,0 ml           | 1,0 ml     | -          | -                           |
| 25-OH-D антисерум             | -                | -          | 1,0 ml     | 1,0 ml                      |

3. Смесете добре; инкубирайте за 90 минути (+/- 10 минути) при 20-25°C.
4. Накапете 500  $\mu$ l от DAG преципитацияния комплекс във всички ямки с изключение на епруветките за общ брой импулси.
5. Смесете добре; инкубирайте за 20-25 минути при 20-25°C.
6. Накапете 500  $\mu$ l от буфера "NSB/добавяне" във всички ямки с изключение на епруветките за общ брой импулси.
7. Центрофугирайте на 1 800 x g\* за 20 минути.
8. Отдекантирайте супернатантите.
9. Пребройте импулсите на всяка епруветка в гама брояч за 60 секунди или повече.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{радиус в cm}) (\text{rpm})^2$$

## KIT RIA<sup>125</sup>I 25-ΥΔΡΟΞΥΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D

### 1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ *IN VITRO*.

Το παρόν kit προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 25-υδροξυβιταμίνης D (25-OH-D) και άλλων υδροξυλιωμένων μεταβολιτών βιταμίνης D στον ανθρώπινο ορό και πλάσμα για να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της επάρκειας σε βιταμίνη D. Τα αποτελέσματα του προσδιορισμού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται από κοινού με άλλα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα για να βοηθήσουν τον κλινικό ιατρό στη λήψη αποφάσεων στη διαχείριση μεμονωμένων ασθενών σε έναν πληθυσμό ενηλίκων.

### 2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Καθώς η καλσιφερόλη (βιταμίνη D) εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, μεταβολίζεται σε αρκετές μορφές, από τις οποίες η κυριότερη είναι η 25-υδροξυκαλσιφερόλη (25-OH-D). Το πρώτο βήμα στο μεταβολισμό της βιταμίνης D, η υδροξυλίωση 25, λαμβάνει χώρα κυρίως στο ήπαρ.<sup>1</sup> Στον άνθρωπο, μόνο μια μικρή ποσότητα 25-OH-D μεταβολίζεται στα νεφρά προς άλλους μεταβολίτες διϋδροξυβιταμίνης D.<sup>2,3</sup> Εφόσον η 25-OH-D είναι η κύρια μορφή της βιταμίνης D στην κυκλοφορία αίματος στο φυσιολογικό πληθυσμό, θεωρείται ως ο πιο αξιόπιστος δείκτης της κατάστασης της βιταμίνης D.<sup>4</sup>

Οι δύο κύριες μορφές της 25-OH-D είναι η χοληκαλσιφερόλη (βιταμίνη D<sub>3</sub>) και η εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D<sub>2</sub>).<sup>3,5</sup> Η βιταμίνη D<sub>3</sub> προέρχεται κυρίως από τις δράσεις της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα, ενώ η D<sub>2</sub> προέρχεται αποκλειστικά από διατροφικές πηγές. Εφόσον αυτές οι δύο μητρικές ενώσεις συνεισφέρουν με διάφορους τρόπους στην ολική κατάσταση της βιταμίνης D του ατόμου, είναι σημαντικό να μετριοούνται εξίσου και οι δύο μορφές.<sup>6,7</sup> Αρκετή έρευνα παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα επίπεδα μεταβολισμού 25-OH-D στο κυκλοφοριακό σύστημα και τη σημαντικότητά τους από άποψη φυσιολογίας.

Η μέτρηση της 25-OH-D γίνεται ολόένα και σημαντικότερη στη διαχείριση των ασθενών με διάφορες διαταραχές του μεταβολισμού του ασβεστίου σχετιζόμενου με ραχίτιδα, νεογνική υπασβεστιαμία, οστεοδυστροφία προκαλούμενη από κύηση, διατροφή ή νεφρική νόσο, υποπαραθυρεοειδισμό και μετεμμηνοπαυσιακή οστεοπόρωση.<sup>8-10</sup> ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα χαρακτηριστικά απόδοσης του προσδιορισμού 25-OH-D της DiaSorin δεν έχουν καθιερωθεί σε παιδιατρικό πληθυσμό.

### 3. ΑΡΧΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ο προσδιορισμός 25-OH-D της DiaSorin αποτελείται από μια διαδικασία δύο βημάτων. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει ταχεία εκχύλιση της 25-OH-D και των άλλων υδροξυλιωμένων μεταβολιτών από τον ορό ή το πλάσμα με ακετονιτρίλιο. Μετά την εκχύλιση, το επεξεργασμένο δείγμα προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας μια διαδικασία ραδιοανοσοπροσδιορισμού (RIA) ισορροπίας. Η μέθοδος RIA βασίζεται σε ένα αντίσωμα με ειδικότητα στην 25-OH-D. Το δείγμα, το αντίσωμα και ο ιχνηθέτης υπόκεινται σε επώαση για 90 λεπτά στους 20 έως 25°C. Ο διαχωρισμός φάσεων επιτυγχάνεται μετά από επώαση 20 λεπτών στους 20 έως 25°C με ένα δεύτερο σύμπλοκο καθίζησης αντισώματος. Μετά την επώαση αυτή και πριν από τη φυγοκέντρηση, προστίθεται ένα ρυθμιστικό διάλυμα NSB/πρόσθετο για να βοηθήσει στη μείωση της μη ειδικής δέσμευσης.

#### 4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ

|   |                  |
|---|------------------|
| Βαθμονομητές 25-OH-D                    | 6 φιαλίδια/1 mL  |
| Ρυθμιστικό διάλυμα NSB/πρόσθετο 25-OH-D | 1 φιάλη/70 mL    |
| Αντιορός 25-OH-D                        | 1 φιάλη/105 mL   |
| Ιχνηθέτης 25-OH-D                       | 1 φιαλίδιο/6 mL  |
| Σύμπλοκο καθίζησης DAG 25-OH-D          | 2 φιαλίδια/30 mL |
| Μάρτυρες 25-OH-D                        | 2 φιαλίδια/1 mL  |
| Ακετονιτρίλιο 25-OH-D                   | 2 φιαλίδια/15 mL |
| Αριθμός δοκιμών                         | 100              |

ΦΥΛΑΞΗ: Μετά την παραλαβή του, το κιτ θα πρέπει να φυλάσσεται στους 2 έως 8°C. Μετά το άνοιγμα, φυλάξτε κάθε αντιδραστήριο στους 2 έως 8°C έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα. Τα αντιδραστήρια δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αφού παρέλθει η ημερομηνία λήξης. Η ημερομηνία λήξης του κιτ αναγράφεται στην εξωτερική ετικέτα και αντιστοιχεί στην ημερομηνία λήξης του ιχνηθέτη. Η ανάμιξη αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες δεν ενδείκνυται.

**4.1 Ρυθμιστικό διάλυμα NSB/πρόσθετο 25-OH-D:** Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-ζελατίνης που περιέχει 0.1% αζίδιο του νατρίου. Το στοιχείο αυτό έχει διπλή λειτουργία. Λειτουργεί τόσο ως ρυθμιστικό διάλυμα NSB όσο ως ρυθμιστικό διάλυμα προσθήκης.

**4.2 Βαθμονομητές 25-OH-D<sub>3</sub>:** Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Έξι βαθμονομητές (25-OH-D<sub>3</sub>) με συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 0 έως 100 ng/mL προαραιώνονται σε επεξεργασμένο ανθρώπινο ορό που περιέχει 0.1% αζίδιο του νατρίου. Ο χειρισμός των αντιδραστηρίων αυτών θα πρέπει να γίνεται με προσοχή (βλ. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις). Οι βαθμονομητές του κιτ έχουν βαθμονομηθεί με τη χρήση ποσοτικού προσδιορισμού υπέρυθρων και έχουν επιβεβαιωθεί με ανάλυση HPLC. Ο χειρισμός των βαθμονομητών μπορεί να είναι ίδιος με αυτόν των δειγμάτων ασθενών όταν χρησιμοποιούνται με τα αντιδραστήρια και τη λειτουργική διαδικασία της παρούσας διαγνωστικής δοκιμής *in vitro*, όπως συνιστάται.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Αν επιθυμείτε, μπορείτε να παρασκευάσετε έναν «προαιρετικό» βαθμονομητή (2.5 ng/mL) αραιώνοντας 1:2 το βαθμονομητή κιτ «1» με το μηδενικό βαθμονομητή του κιτ (δηλ. 100  $\mu$ L «1» + 100  $\mu$ L «0»). Η αραιώση αυτή θα πρέπει να εκτελείται πριν την εκχύλιση και κατόπιν να γίνεται εκχύλιση σύμφωνα με τις οδηγίες του ένθετου προϊόντος.

**4.3 Αντιορός 25-OH-D** Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Ο ορός αντι-25-OH-D αίγης έχει αραιωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-ζελατίνης που περιέχει 0.1% αζίδιο του νατρίου.

**4.4 Ιχνηθέτης 25-OH-D<sub>3</sub>:** Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Ένα ιωδιωμένο [<sup>125</sup>I] ανάλογο του 25-OH-D<sub>3</sub> έχει αραιωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα αιθανόλης-φωσφορικών. Ο χειρισμός του αντιδραστηρίου αυτού θα πρέπει να γίνεται με προσοχή (βλ. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις).

**4.5 Σύμπλοκο ιζηματοποίησης αντι-αίγης όνου (DAG):** Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση. Ο ορός αντι-αίγης όνου, ο κανονικός ορός αίγης και η πολυαιθυλενογλυκόλη έχουν αραιωθεί σε ρυθμιστικό διάλυμα BSA-βορικών, το οποίο περιέχει θειική γενταμικίνη και 0.1% αζίδιο του νατρίου. Αναμίξτε για 5 έως 10 λεπτά πριν και κατά τη διάρκεια της χρήσης για να εξασφαλίσετε ότι επιτυγχάνεται ομοιογενές εναιώρημα.

**4.6 Μάρτυρες 25-OH-D:** Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Σε ανθρώπινο ορό, ο οποίος περιέχει 0.1% αζίδιο του νατρίου, προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες 25-OH-D<sub>3</sub> για την επίτευξη συγκεντρώσεων μάρτυρα εντός καθορισμένων περιοχών. Αναμίξτε ενδελεχώς και χειριστείτε τα ως άγνωστα δείγματα. Ο μάρτυρας 1 αντιπροσωπεύει περιοχή χαμηλών έως κανονικών τιμών και ο μάρτυρας 2 αντιπροσωπεύει περιοχή υψηλών έως κανονικών τιμών. Το εύρος συγκεντρώσεων κάθε υλικού ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και υποδεικνύει τα όρια που έχουν τεθεί από την DiaSorin για τιμές υλικών ελέγχων που μπορεί να ληφθούν σε αξιόπιστους κύκλους προσδιορισμών. Ο χειρισμός των αντιδραστηρίων αυτών θα πρέπει να γίνεται με προσοχή (βλ. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις).

#### **4.7 Ακετονιτρίλιο:** Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση.

Ακετονιτρίλιο. Εγκεκριμένο για χρήση με το κιτ αυτό. Ο χειρισμός του αντιδραστηρίου αυτού θα πρέπει να γίνεται με προσοχή (βλ. Προειδοποιήσεις και προφυλάξεις). Το παρόν προϊόν περιέχει ξηρό φυσικό καουτσούκ.

### **5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ**

ΜΟΝΟ ΓΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO.

Δεν προορίζεται για εσωτερική και εξωτερική χρήση σε ανθρώπους ή ζώα.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η παρούσα συσκευή θα πρέπει να παραλαμβάνεται, να αποκτάται, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κλινικά εργαστήρια, νοσοκομεία, κτηνιαρεία και ερευνητικές εγκαταστάσεις. Η δοκιμή πρέπει να εκτελείται μόνο από κατάλληλο διπλωματούχο και ειδικευμένο εργαστηριακό προσωπικό.

#### **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΥΛΙΚΟ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

**Χειριστείτε ως εάν ήταν δυνητικώς μολυσματικά.**

Κάθε μονάδα δότη ορού/πλάσματος που έχει χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία του παρόντος προϊόντος έχει δοκιμαστεί με μέθοδο εγκεκριμένη από την Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) των Η.Π.Α. και βρέθηκε μη αντιδραστική ως προς την παρουσία HBsAg, αντισώματος στον ιό HCV και αντισώματος στον ιό HIV 1/2. Αν και οι μέθοδοι αυτές είναι εξαιρετικά ακριβείς, δεν εγγυώνται την ανίχνευση όλων των μολυσματικών μονάδων. Το παρόν προϊόν ενδεχομένως να περιέχει και άλλο υλικό ανθρώπινης προέλευσης για το οποίο δεν υπάρχει εγκεκριμένη δοκιμή. Επειδή καμία γνωστή μέθοδο δοκιμής δεν μπορεί να προσφέρει πλήρης διαβεβαίωση ότι απουσιάζουν ο ιός της ηπατίτιδας Β (HBV), ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV), ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) ή άλλοι μολυσματικοί παράγοντες, ο χειρισμός όλων των προϊόντων που περιέχουν υλικά ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με καλές εργαστηριακές πρακτικές χρησιμοποιώντας τις κατάλληλες προφυλάξεις, όπως περιγράφονται στο εγχειρίδιο «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories». 4η έκδοση, Μάιος 1999 ή την τρέχουσα έκδοση, των U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health (Κέντρα για τον Έλεγχο και Πρόληψη Νόσων/Εθνικά Ιδρύματα Υγείας των Η.Π.Α.).

#### **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ**

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Μερικά αντιδραστήρια στο κιτ αυτό περιέχουν αζίδιο του νατρίου. Το αζίδιο του νατρίου μπορεί να αντιδράσει με τις σωληνώσεις μολύβδου ή χαλκού και να σχηματίσει εξαιρετικά εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη, εκπλύντε με άφθονες ποσότητες νερού για να εμποδίσετε τη συσσώρευση αζιδίου (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ). Για πρόσθετες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα «Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts», στο εγχειρίδιο οδηγό - διαχείριση ασφάλειας με κωδικό CDC-22 που εκδίδεται από τα Κέντρα για τον Έλεγχο και την Πρόληψη Νόσων στην Ατλάντα της Τζόρτζια, U.S. 1976.

**Φράσεις κινδύνου επικίνδυνων ουσιών των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)**

R 20/21/22 - Βλαβερό όταν εισπνέεται, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.

R 32 - Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.

S28 - Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλύντε αμέσως με άφθονο νερό.

#### **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΚΕΤΟΝΙΤΡΙΛΙΟ**

**Φράσεις κινδύνου επικίνδυνων ουσιών των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 88/379/ΕΟΚ)**

R11 - Λίαν εύφλεκτο.

R23/24/25 - Τοξικό όταν εισπνέεται, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.

S16 - Μακριά από πηγές ανάφλεξης — Απαγορεύεται το κάπνισμα.

S36 - Φορέστε κατάλληλη προστατευτική ενδυμασία.

S43 - Σε περίπτωση πυρκαγιάς, χρησιμοποιήστε πυροσβεστήρες ξηρών χημικών ουσιών ή διοξείδιο του άνθρακα.

S45 - Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισθάνεστε αδιαθεσία, ζητήστε αμέσως ιατρική συμβουλή.

S51 - Χρησιμοποιείται μόνο σε χώρους με πολύ καλό αερισμό.

## **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΙΘΑΝΟΛΗ**

### **ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ - ΕΥΦΛΕΚΤΟ**

**Φράσεις κινδύνου επικίνδυνων ουσιών των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 88/379/ΕΟΚ)**

R11 - Λίαν εύφλεκτο.

S16 - Μακριά από πηγές ανάφλεξης — Απαγορεύεται το κάπνισμα.

S43 - Σε περίπτωση πυρκαγιάς, χρησιμοποιήστε πυροσβεστήρες ξηρών χημικών ουσιών ή διοξειδίου του άνθρακα.

## **ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΙΩΔΙΟ 125**

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 4  $\mu\text{Ci}$  (148 kBq) σε  $^{125}\text{I}$ . Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρος που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές *in vitro* που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ:** Το προϊόν αυτό περιέχει μια χημική ουσία η οποία είναι γνωστό από την πολιτεία της Καλιφόρνιας ότι προκαλεί καρκίνο.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του κιτ.

## **6. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΦΘΟΡΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ ΚΙΤ**

- 6.1 Παρουσία ασυνήθιστων στερεών σωματιδίων σε οποιοδήποτε αντιδραστήριο. (Το ρυθμιστικό διάλυμα NSB, ο αντιορός και τα αντιδραστήρια καθίζησης DAG μπορεί να είναι θολά).
- 6.2 Μετατόπιση της κλίσης ή της θέσης της καμπύλης βαθμονόμησης σε σχέση με αυτήν που λαμβάνεται κανονικά.
- 6.3 Μείωση της μέγιστης δέσμευσης.
- 6.4 Υψηλή μη ειδική δέσμευση.

## 7. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Απαιτούνται πενήντα (50) μικρολίτρα ορού ή πλάσματος (EDTA ή ηπαρίνη) για την εκχύλιση της 25-OH-D. Εκατόν πενήντα μικρολίτρα θα επιτρέψουν την επανάληψη της ανάλυσης και επίσης θα παρέχουν επαρκή όγκο για τη χρήση πιπέτας.

Με το κιτ αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανθρώπινος ορός ή πλάσμα. Με τον προσδιορισμό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιπηκτικά EDTA ή ηπαρίνη. Συνιστάται δείγμα από άτομα που δεν έχουν φάει, αλλά δεν απαιτείται. Η δειγματοληψία θα πρέπει να γίνεται ασηπτικά με φλεβοπαρακέντηση σε άδειο υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα 5 ή 10 mL. Αφήστε το αίμα να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου (15 έως 25°C). Φυγοκεντρήστε για 15 λεπτά χρησιμοποιώντας 760 x g\* περίπου για να λάβετε ορό χωρίς αιμόλυση. Δεν απαιτούνται πρόσθετα ή συντηρητικά για τη διατήρηση της ακεραιότητας του δείγματος. Όλα τα πλαστικά και υάλινα σκεύη ή άλλα υλικά που έρχονται σε επαφή με το δείγμα δεν θα πρέπει να είναι μολυσμένα. Φυλάξτε τα δείγματα ορού ή πλάσματος στους -20°C ή χαμηλότερα. Τα δείγματα μπορεί να φυλαχτούν σε υάλινα ή πλαστικά φιαλίδια αρκεί αυτά να είναι ερμητικά σφραγισμένα προκειμένου να αποφευχθεί η αποξήρανση του δείγματος.

Μια μελέτη που διεξήχθη από την DiaSorin σε έναν περιορισμένο αριθμό δειγμάτων ασθενών απέδειξε ότι τα δείγματα ήταν σταθερά για έως 9 εβδομάδες όταν φυλάχθηκαν στους -20°C. Δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική αλλαγή στις τιμές μετά από 3 κύκλους κατάψυξης-απόψυξης των δειγμάτων. Θα πρέπει να αποφεύγονται οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης. Γενικά, τα μεταφερόμενα δείγματα θα πρέπει να καταψύχονται καταψυγμένα.

## 8. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ. ΟΜΩΣ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- Αναλώσιμοι δοκιμαστικοί σωλήνες από βοριοπιριτικό ύαλο, 12 x 75 χλστ.  
**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Οι πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες δεν είναι κατάλληλοι για χρήση με το κιτ αυτό.
  - Φυγοκέντρηση με ελεγχόμενη θερμοκρασία στην οποία μπορούν να προσαρμοστούν δοκιμαστικοί σωλήνες 12 x 75 χλστ.
  - Μετρητής γάμα με δυνατότητα μέτρησης 125-ιώδιο.
  - Όργανο περιδίνησης (vortex).
  - Συσκευές πιπέτας
    - α. Μικροπιπέτες βαθμονομημένες να χορηγούν 25 µL και 50 µL (ανακρίβεια μικρότερη από ή ίση με ± 1%).
    - β. Διανομείς επαναλαμβανόμενης χορήγησης που χρησιμοποιούν μύτες βαθμονομημένες να χορηγούν 50 µL, 500 µL και 1.0 mL (ανακρίβεια μικρότερη από ή ίση με ± 1%).
- ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Για τις παρακάτω διαδικασίες εκχύλισης και προσδιορισμού, ανατρέξτε στην παράγραφο «Εξοπλισμός και υλικά που απαιτούνται, όμως δεν παρέχονται» για τις προδιαγραφές πιπέτων.

## 9. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

- 9.1 Τακτοποιήστε τους αναλώσιμους υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 χλστ με επικέτες για κάθε βαθμονομητή, μάρτυρα και δείγμα ασθενή.
- 9.2 Προσθέστε 500 µL ακετονιτρίλιο σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
- 9.3 Τοποθετήστε τη μύτη πιπέτας, η οποία περιέχει 50 µL βαθμονομητή, μάρτυρα ή δείγμα ασθενή κάτω από την επιφάνεια του ακετονιτρίλιου και προσθέστε ΑΡΓΑ μέσα στο ακετονιτρίλιο.
- 9.4 Στροβιλίστε στο όργανο περιδίνησης (vortex) για 10 δευτερόλεπτα.
- 9.5 Φυγοκεντρήστε χρησιμοποιώντας 1200 x g\* για 10 λεπτά στους 20 έως 25°C.
- 9.6 Χορηγήστε με πιπέτα πανομοιότυπα μέρη 25 µL υπερκείμενο κλάσμα σε ξεχωριστούς δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 χλστ στους οποίους έχουν προσκολληθεί κατάλληλες επικέτες. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Φροντίστε να μην αναταράξετε το σβόλο.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) \text{ (ακτίνα σε εκατοστά) (rpm)}^2$$

9.7 Προσδιορίστε το υπερκείμενο κλάσμα σύμφωνα με τη διαδικασία προσδιορισμού.

#### 10. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

- 10.1 Η θερμοκρασία όλων των αντιδραστηρίων και δειγμάτων θα πρέπει να ισορροπήσει με τη θερμοκρασία δωματίου. Η θερμοκρασία των αντιδραστηρίων δεν θα πρέπει να υπερβεί τους 25°C.
- 10.2 Τακτοποιήστε δύο πανομοιότυπους αναλώσιμους υάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 χλστ σύμφωνα με το σχήμα του προσδιορισμού της τελευταίας σελίδας.
- 10.3 Προσθέστε τα αντιδραστήρια ως ακολούθως:
- α. Δοκιμαστικοί σωλήνες συνολικών κρούσεων**  
50 μL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL ρυθμιστικό διάλυμα NSB/πρόσθετο
  - β. Δοκιμαστικοί σωλήνες μη ειδικής δέσμευσης (NSB)**  
25 μL βαθμονομητή 0 (εκχύλισμα)  
50 μL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL ρυθμιστικό διάλυμα NSB/πρόσθετο
  - γ. Βαθμονομητές, μάρτυρες και άγνωστα δείγματα**  
25 μL βαθμονομητή, μάρτυρα ή άγνωστο δείγμα (εκχυλίσματα)  
50 μL <sup>125</sup>I 25-OH-D  
1.0 mL αντιορό 25-OH-D
- 10.4 Στροβιλίστε απαλά σε όργανο περιδίνησης (vortex) χωρίς το σχηματισμό αφρού και επώαστε για 90 (+/- 10) λεπτά στους 20 έως 25°C.
- 10.5 Προσθέστε 500 μL σύμπλοκο καθίζησης DAG (το σύμπλοκο καθίζησης DAG θα πρέπει να αναμιγνύεται εκτενώς πριν και κατά τη διάρκεια της χρήσης) σε όλους του δοκιμαστικούς σωλήνες εκτός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών κρούσεων.
- 10.6 Αναμίξτε τους δοκιμαστικούς σωλήνες καλά και επώαστε για 20 έως 25 λεπτά στους 20 έως 25°C.
- 10.7 Προσθέστε 500 μL ρυθμιστικό διάλυμα NSB/προσθήκης σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες εκτός από τους σωλήνες συνολικών κρούσεων. Στροβιλίστε με όργανο περιδίνησης (vortex) απαλά για να αναμίξετε τους δοκιμαστικούς σωλήνες καλά. Δείξτε προσοχή όταν εκτελείτε το βήμα αυτό προκειμένου να αποφευχθεί το πιπίλισμα λόγω του υψηλού όγκου υγρού στο δοκιμαστικό σωλήνα.
- 10.8 Φυγοκεντρήστε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες για 20 λεπτά στους 20 έως 25°C στα 1800 x g\*. εκτός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών κρούσεων.
- 10.9 Αποχύστε τα υπερκείμενα κλάσματα, εκτός από αυτά των δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών κρούσεων, χρησιμοποιώντας μια αφρώδη βάση δοκιμαστικών σωλήνων, ή ισοδύναμη, αναστρέφοντας τη βάση σε ένα κατάλληλο δοχείο αποβλήτων. Τοποθετήστε την ανεστραμμένη βάση σε απορροφητικό χαρτί για 2 έως 3 λεπτά. Σκουπίστε τους δοκιμαστικούς σωλήνες απαλά για να εξασφαλίσετε ότι έχει απομακρυνθεί όλο το υγρό.
- 10.10 Σε έναν μετρητή σπινθηρισμών γάμα, μετρήστε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα για 1 τουλάχιστον λεπτό. Κάθε σωλήνας θα πρέπει να μετρηθεί για επαρκή χρόνο προκειμένου να επιτευχθεί στατιστική ακρίβεια. (βλ. ενότητα αποτελεσμάτων: Περιορισμοί διαδικασίας).

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{ακτίνα σε εκατοστά}) (\text{rpm})^2$$

## 11. ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

- 11.1 Προσθέστε κάθε κλάσμα αντιδραστηρίου στο χαμηλότερο τρίτο του δοκιμαστικού σωλήνα προκειμένου να εξασφαλιστεί η πλήρης ανάμιξη των αντιδραστηρίων.
- 11.2 Για να παρακολουθείτε πλήρως τη συνεπή απόδοση ενός προσδιορισμού RIA, υπάρχουν πρόσθετοι παράγοντες που πρέπει να ελέγχονται. Η DiaSorin προτείνει κανονικό έλεγχο των παρακάτω παραμέτρων για να εξασφαλιστεί η συνεπής απόδοση του κιτ.
- α. **Συνολικές κρούσεις**
  - β. **Μέγιστη δέσμευση**  
Μέση τιμή κρούσεων ανά λεπτό (CPM) του δοκιμαστικού σωλήνα βαθμονομητή 0 /Μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών κρούσεων.
  - γ. **Μη ειδική δέσμευση**  
Μέση τιμή CPM του δοκιμαστικού σωλήνα NSB/Μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών κρούσεων.
  - δ. **Κλίση καμπύλης βαθμονόμησης**  
Για παράδειγμα, παρατηρήστε τα σημεία 80 και 50% της καμπύλης βαθμονόμησης.

## 12. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να περιλαμβάνει δύο τουλάχιστον μάρτυρες (έναν με χαμηλό έως κανονικό επίπεδο και έναν με υψηλό έως κανονικό επίπεδο) σε κάθε προσδιορισμό για την παρακολούθηση της απόδοσης προσδιορισμού. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπορικά διαθέσιμοι μάρτυρες ή δύο μάρτυρες αναφοράς που παρέχονται με το κιτ. Οι μάρτυρες του κιτ έχουν αξιολογηθεί από την DiaSorin χρησιμοποιώντας το κιτ RIA <sup>125</sup>I 25-υδροξυβιταμίνης D της DiaSorin. Το εύρος συγκεντρώσεων κάθε υλικού ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και υποδεικνύει τα όρια που έχουν τεθεί από την DiaSorin για τιμές υλικών ελέγχων που μπορεί να ληφθούν σε αξιόπιστους κύκλους προσδιορισμών.

Ο χειρισμός των μαρτύρων θα πρέπει να γίνεται ως εάν ήταν άγνωστα δείγματα και ο προσδιορισμός τους θα πρέπει να γίνεται δύο φορές. Θα πρέπει να τηρούνται οι πίνακες ποιοτικού ελέγχου για να παρακολουθείται η απόδοση μαρτύρων. Κάθε ξεχωριστό εργαστήριο θα πρέπει να καθορίζει αποδεκτά όρια απόδοσης για κάθε επίπεδο μαρτύρων χρησιμοποιώντας μεθόδους βασισμένες στη στατιστική και σχεδιασμένες για να ανιχνεύουν τόσο συστηματικά όσο και τυχαία σφάλματα. Τα αποτελέσματα μαρτύρων θα πρέπει να ικανοποιούν τα κριτήρια του εργαστηρίου για αποδεκτικότητα πριν από την αναφορά των αποτελεσμάτων της δοκιμής των ασθενών.<sup>18, 19, 20</sup>

## 13. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον υπολογισμό αποτελεσμάτων RIA. Κάθε μία βασίζεται στη λήψη μιας καμπύλης βαθμονόμησης με το σχεδιασμό του βαθμού δέσμευσης συναρτήσεως των δηλωμένων συγκεντρώσεων των βαθμονομητών. Το γράφημα αυτό μπορεί να σχεδιαστεί σε γραμμική ή λογαριθμική κλίμακα. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους δίδει ουσιαστικά τις ίδιες τιμές για μάρτυρες και δείγματα, αν και ορισμένοι προσδιορισμοί ενδέχεται να «προσαρμόζονται» καλύτερα σε μια συγκεκριμένη μέθοδο από μία άλλη. Η μέθοδος υπολογισμού για το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου DiaSorin είναι % B/B<sub>0</sub> συναρτήσεως της λογαριθμημένης συγκέντρωσης.

- 13.1 Υπολογίστε τη μέση τιμή CPM για κάθε βαθμονομητή, μάρτυρα και άγνωστο δείγμα.
- 13.2 Αφαιρέστε τη μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων NSB από όλες τις κρούσεις.



- 13.3** Διαιρέστε το διορθωμένο CPM για κάθε βαθμονομητή, μάρτυρα ή άγνωστο δείγμα με το διορθωμένο CPM του βαθμονομητή 0.

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{CPM βαθμονομητή ή άγνωστου δείγματος} - \text{CPM NSB}}{\text{CPM βαθμονομητή 0} - \text{CPM NSB}} \times 100$$

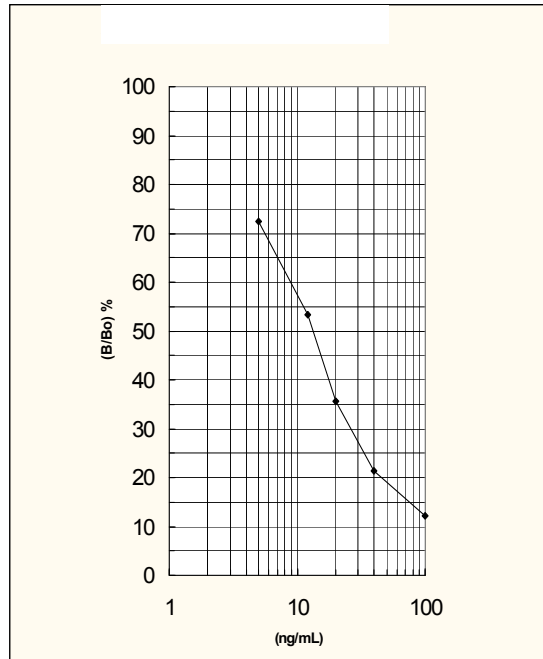
- 13.4** Χρησιμοποιώντας 2 κυκλικά γραφικά χαρτιά semi-log ή log-logit, σχεδιάστε το ποσοστό B/B<sub>0</sub> για τους βαθμονομητές 25-OH-D (κάθετος άξονας) συναρτήσει της συγκέντρωσης (οριζόντιος άξονας).
- 13.5** Σχεδιάστε την καμπύλη που προσαρμόζεται καλύτερα στα σημεία.
- 13.6** Υπολογίστε τις συγκεντρώσεις 25-OH-D των άγνωστων δειγμάτων με παρεμβολή από τη γραφική αναπαράσταση.
- 13.7** Αν ένα άγνωστο δείγμα έχει αραιωθεί, διορθώστε το με τον κατάλληλο παράγοντα αραιώσης.
- 13.8** Υπολογίστε τη μέγιστη δέσμευση διαιρώντας το CPM του βαθμονομητή 0 με τη μέση τιμή συνολικών κρούσεων που λήφθηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών κρούσεων.
- 13.9** Για την ανάλυση των δεδομένων, μπορείτε επίσης να χρησιμοποιήσετε προγράμματα αυτοματοποιημένης αναγωγής δεδομένων. Η DiaSorin χρησιμοποιεί RIACalc (Pharmacia) με ένα πρόγραμμα προσαρμογής smooth-SPLINE του %B/B<sub>0</sub> συναρτήσει της λογαριθμημένης συγκέντρωσης. Άλλες μέθοδοι αναγωγής δεδομένων πρέπει να εγκριθούν πριν ενσωματωθούν για κανονική χρήση.

**ΠΙΝΑΚΑΣ I**  
Δεδομένα δείγματος RIA βιταμίνης D 25-OH-D της DiaSorin

| Δοκιμαστικός σωλήνας | Πανομοίωτο CPM                   | Μέσο CPM | Διορθωμένο CPM | Δεσμευμένο ποσοστό (B/T) | Ποσοστό (B/B <sub>0</sub> ) | Συγκέντ. από γράφημα (ng/mL) |
|----------------------|----------------------------------|----------|----------------|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Συνολικών κρούσεων   | 41878                            | 40901    |                |                          |                             |                              |
| NSB                  | 39924<br>555<br>508              | 531      |                | 1,3                      |                             |                              |
| Βαθμονομητής 0       | 19585<br>19673<br>20314<br>19718 | 19822    | 19291          | 48,5                     |                             |                              |
| Βαθμονομητές 1       | 14503<br>14442                   | 14472    | 13941          |                          | 72,3                        | 5                            |
| 2                    | 11005<br>10670                   | 10838    | 10307          |                          | 53,4                        | 12                           |
| 3                    | 7182<br>7642                     | 7411     | 6880           |                          | 35,7                        | 20                           |
| 4                    | 4687<br>4622                     | 4654     | 4123           |                          | 21,4                        | 40                           |
| 5                    | 2768<br>2985                     | 2877     | 2346           |                          | 12,2                        | 100                          |
| Άγνωστα δείγματα 1   | 10365<br>10447                   | 10406    |                |                          | 53,9                        | 12,8                         |
| 2                    | 4219<br>4720                     | 4634     |                |                          | 24,0                        | 40,4                         |

Στον ΠΙΝΑΚΑ I και στο ΣΧΗΜΑ 1 παρουσιάζονται τυπικά δεδομένα δείγματος και μια καμπύλη βαθμονόμησης. Οι πληροφορίες αυτές δίδονται μόνο για αναφορά και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό καμίας τιμής.

25- ΥΔΡΟΞΥΒΙΤΑΜΙΝΗ D  
ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΤΥΠΙΚΗΣ ΚΑΜΠΥΛΗΣ



Σχήμα 1

14. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

- 14.1 Οι χρόνοι μέτρησης θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλοι για να εμποδίζεται το στατιστικό σφάλμα (για παράδειγμα, η συσσώρευση 2.000 CPM θα αποδώσει σφάλμα 5%, ενώ 10.000 CPM θα αποδώσουν σφάλμα 1%).
- 14.2 Τα αποτελέσματα προσδιορισμού θα πρέπει να χρησιμοποιούνται από κοινού με άλλα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα για να βοηθήσουν τον κλινικό ιατρό στη λήψη αποφάσεων στη διαχείριση μεμονωμένων ασθενών.
- 14.3 Για τον προσδιορισμό αυτό δεν έχουν αξιολογηθεί οι επιδράσεις λόγω αιμόλυσης ή λιπαιμίας στα δείγματα ασθενών. Ωστόσο, αναμένεται ότι η εκχύλιση ακετονιτριλίου θα ελαχιστοποιήσει τυχόν παρεμβολές λόγω των ουσιών αυτών.
- 14.4 Η κυριότερη πηγή ανακρίβειας στη μέθοδο αυτή είναι πιθανώς το βήμα της εκχύλισης. Άλλες πηγές διαδικαστικών ανακρίβειών ενδεχομένως να είναι ανακριβείς μικροπιπέτες ή αντιδραστήρια των οποίων έχει παρέλθει η ημερομηνία λήξης.
- 14.5 Το αντίσωμα του kit θα επιδείξει μερική διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με όλες τις μορφές στεροειδών διϋδροξυβιταμίνης D2 και D3. Ωστόσο, σε ανθρώπους, οι ενώσεις αυτές υπάρχουν στη φύση μόνο σε συγκεντρώσεις της τάξεως picomole.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Τα χαρακτηριστικά απόδοσης του προσδιορισμού αυτού δεν έχουν καθιερωθεί σε παιδιατρικό πληθυσμό.

## 15. ANAMENOMENES TIMES

### ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΙΜΩΝ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Είναι σημαντικό για κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τη δική του περιοχή τιμών αναφοράς η οποία είναι αντιπροσωπευτική του συνήθους πληθυσμού του.

Είναι γνωστό ότι παράγοντες όπως η υπεριώδης έκθεση<sup>9,10</sup> η εποχή,<sup>11,12</sup> το φύλο,<sup>7</sup> και η διαίτα<sup>8</sup> επηρεάζουν τα επίπεδα 25-OH-D σε ανθρώπους. Στη βιβλιογραφία έχει αποδειχτεί μείωση των επιπέδων βιταμίνης D με την ηλικία. Ωστόσο, η έρευνα για τις περισσότερες από αυτές τις μελέτες έχει διεξαχθεί σε χώρες της Βόρειας Ευρώπης, όπου υπάρχει λιγότερο ηλιακό φως και λιγότερο διεισδυτική ενίσχυση από την τροφή.<sup>8,15,16</sup> Αυτό, μαζί με υψηλά μεταβλητές διαφορές σε κριτήρια υγείας και κατάστασης φαρμάκων, είναι δύσκολο να γενικευτεί η επίδραση της ηλικίας μονάχα στην κατάσταση της βιταμίνης D.<sup>12</sup> Μελέτες που διεξήχθησαν στις Η.Π.Α. έχουν αποδώσει διαφορεόμενα αποτελέσματα, όπου παρουσιάζονται συμβάντα μείωσης σε βιταμίνη D με την ηλικία, αλλά και η απουσία αυτής της μείωσης. Έχει αποδειχθεί ότι τα αντισπασμωδικά, όπως επίσης και η μακροχρόνια χρήση του μολυσματικού των ανηλιακών p-αμινοβενζοϊκού οξέως, προκαλούν μείωση στα επίπεδα της 25-OH-D.<sup>17</sup> Δεν έχει καθιερωθεί παιδιατρική περιοχή τιμών αναφοράς από την DiaSorin για τη χρήση του παρόντος kit.

η DiaSorin έχει αξιολογήσει ορό που συλλέχθηκε από 20 άντρες και 24 γυναίκες, φαινομενικά υγιείς, κυρίως καυκάσιους εθελοντές από τις μεσοδυτικές Η.Π.Α. χρησιμοποιώντας το kit RIA<sup>125I</sup> 25-υδροξυβιταμίνης D της DiaSorin. Η ηλικία των εθελοντών κυμαίνεται από 23 έως 67 ετών. Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια του Οκτωβρίου. Σε αυτήν την ομάδα αναφοράς, παρατηρήθηκε μόνο μια μικρή διαφορά σε επίπεδα 25-OH-D μεταξύ των ανδρών (μέση τιμή = 21.7 ng/mL) και των γυναικών (μέση τιμή = 24.1 ng/mL). Η μέση τιμή για ολόκληρο το πληθυσμό (n = 44) ήταν 23.0 ng/mL με διπλό εύρος τυπικής απόκλισης που κυμαίνεται από 9.0 έως 37.6 ng/mL.

Έχει παρατηρηθεί υψηλός επιπολασμός υποκλινικού ελλείμματος 25-υδροξυβιταμίνης D σε φυσιολογικούς, φαινομενικά υγιείς πληθυσμούς σε πολλές χώρες, ιδιαίτερα κατά τους χειμερινούς μήνες.<sup>13,14</sup> Σε πρόσφατη βιβλιογραφία, έχουν προταθεί οι ακόλουθες περιοχές τιμών για την ταξινόμηση της κατάστασης 25-OH-D: Έλλειμμα: 0 έως 5 ng/mL (0 έως 12.5 nmol/L), Ανεπάρκεια: 5 έως 20 ng/mL (12.5 έως 50 nmol/L), Υποβιταμίνωση D: 20 έως 40 ng/mL (50 έως 100 nmol/L), Επάρκεια: 40 έως 100 ng/mL (100 έως 250 nmol/L), και Τοξικότητα: περισσότερα από 100 ng/mL (> 250 nmol/L).<sup>24</sup>

## 16. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

### 16.1 Ακρίβεια

Η ακρίβεια προσδιορισμού αξιολογήθηκε στην DiaSorin με τη δοκιμή τεσσάρων επιπέδων μαρτύρων, τα οποία κάλυπταν την καμπύλη, κατά τη διάρκεια 23 ημερών εργασίας σε 40 προσδιορισμούς. Κάθε προσδιορισμός περιλάμβανε τέσσερις μάρτυρες επί 2 εκχυλίσεις (4 επαναλήψεις). Ο σχεδιασμός της μελέτης βρίσκεται σε αντιστοιχία με τις κατευθυντήριες γραμμές EP5-T2 του εγγράφου της CLSI.<sup>22</sup> Οι υπολογισμοί δεδομένων έγιναν χρησιμοποιώντας SAS PROC VARCOMP. Το στατιστικό μοντέλο που προσαρμόστηκε είναι ένα γραμμικό μοντέλο τυχαίων επιδράσεων.<sup>23</sup>

| Μέσος όρος (ng/mL) | Εντός εκτέλεσης (% T.A.) | Συνολική ανακρίβεια (% T.A.) |
|--------------------|--------------------------|------------------------------|
| 8,6                | 11,7                     | 9,4                          |
| 22,7               | 10,5                     | 8,2                          |
| 33,0               | 8,6                      | 9,1                          |
| 49,0               | 12,5                     | 1,0                          |

### 16.2 Αληθινότητα

Η αληθινότητα προσδιορισμού ελέγχθηκε με τη δοκιμή αραιώσης και ανάκτησης.

#### ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ (ΠΑΡΑΛΛΗΛΙΣΜΟΣ)

Μελέτη διαδοχικών αραιώσεων 4 δειγμάτων ασθενών (τιμές = ng/mL)

| Δείγμα | Μη αραιωμένο | 1/2  | 1/4  |
|--------|--------------|------|------|
| 1      | 74,6         | 79,4 | 74,8 |
| 2      | 87,8         | 96,4 | 95,2 |
| 3      | 85,6         | 88,2 | 82,4 |
| 4      | 55,2         | 57,8 | 60,4 |

#### ΑΝΑΚΤΗΣΗ

Προστέθηκαν γνωστές ποσότητες 25-OH-D<sub>3</sub> σε δείγματα ορού ασθενή και καθορίστηκε η ποσοστιαία ανάκτηση.

| Δείγμα Αριθμός | Αρχική συγκέντρωση (ng/mL) | Ποσότητα που προστέθηκε (ng/mL) | *Αναμενόμενη συγκέντρωση (ng/mL) | Μετρούμενη συγκέντρωση (ng/mL) | Ανάκτηση |
|----------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|----------|
| 1              | 15,8                       | 5,0                             | 25,5                             | 24,8                           | 97%      |
|                |                            | 10,0                            | 35,1                             | 41,8                           | 119%     |
|                |                            | 25,0                            | 62,7                             | 61,9                           | 99%      |
| 2              | 51,2                       | 5,0                             | 60,6                             | 62,0                           | 102%     |
|                |                            | 10,0                            | 69,8                             | 73,8                           | 106%     |
|                |                            | 25,0                            | 96,4                             | 99,4                           | 103%     |
| 3              | 26,6                       | 5,0                             | 36,2                             | 33,5                           | 92%      |
|                |                            | 10,0                            | 45,7                             | 54,0                           | 118%     |
|                |                            | 25,0                            | 73,0                             | 82,8                           | 113%     |
| 4              | 57,3                       | 5,0                             | 66,6                             | 63,8                           | 96%      |
|                |                            | 10,0                            | 75,8                             | 78,1                           | 103%     |
|                |                            | 25,0                            | 102**                            | 104**                          | 102%     |
| 5              | 41,3                       | 5,0                             | 50,8                             | 48,5                           | 95%      |
|                |                            | 10,0                            | 60,1                             | 56,1                           | 93%      |
|                |                            | 25,0                            | 87,0                             | 93,2                           | 107%     |

\* Ο υπολογισμός αναμενόμενης συγκέντρωσης 25-OH-D περιλαμβάνει τον παράγοντα αραιώσης που εισήχθηκε στο διάλυμα πρόσθετου.

\*\* Αυτές είναι παρεμβαλλόμενες τιμές. η μετρούμενη συγκέντρωση είναι > 100 ng/mL (άνω βαθμονομητής)

### 16.3 Αναλυτική ευαισθησία (όρια ανίχνευσης)

Έχει αποδειχτεί ότι η ευαισθησία του προσδιορισμού αυτού, όταν ορίζεται ως η χαμηλότερη ποσότητα που διαφοροποιείται από το μηδέν σε 2 τυπικές αποκλίσεις κάτω από τη μέση τιμή crm του μηδενικού βαθμονομητή (n = 20), είναι 1,5 ng/mL ή μικρότερη. Αυτό το επίπεδο ευαισθησίας ισχύει τόσο με τη χρήση του βαθμονομητή «1» όσο και με τον «προαιρετικό» βαθμονομητή.

#### 16.4 Αναλυτική ειδικότητα

Τα δεδομένα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας του αντιορού που χρησιμοποιείται στο kit αυτό εκφράζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης 25-OH-D προς τη συγκέντρωση της ουσίας με διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε 50% αναστολή της μέγιστης δέσμευσης.

| Στεροειδή      | % διασταυρούμενη αντιδραστικότητα |
|----------------|-----------------------------------|
| Βιταμίνη D2    | 0,8                               |
| Βιταμίνη D3    | 0,8                               |
| 25-OH-D2       | 100                               |
| 25-OH-D3       | 100                               |
| 24,25-(OH)2-D2 | 100                               |
| 24,25-(OH)2-D3 | 100                               |
| 25,26-(OH)2-D2 | 100                               |
| 25,26-(OH)2-D3 | 100                               |
| 1,25-(OH)2-D2  | 11,0                              |
| 1,25-(OH)2-D3  | 11,0                              |

#### ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ. ΑΝΑΤΡΕΞΕΤΕ ΣΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΣΕΛΙΔΑ

#### ΣΧΗΜΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

1. Εκχυλίστε τα δείγματα: Διανέμετε 500  $\mu$ L ακετονιτρίλιο σε έναν υάλινο σωλήνα και προσθέστε αργά 50  $\mu$ L βαθμονομητή, μάρτυρα ή δείγμα ασθενή κάτω από την επιφάνεια του ακετονιτρίλιου. Στροβιλίστε για 10 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρήστε χρησιμοποιώντας 1200 x g\* για 10 λεπτά στους 20 έως 25°C.
2. Απονέμετε τα αντιδραστήρια σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:

| Δοκιμαστικοί σωλήνες/Αντιδραστήρια | Συνολικές κρούσεις | NSB        | Βαθμονομητής 0-6 | Μάρτυρες και άγνωστα δείγματα |
|------------------------------------|--------------------|------------|------------------|-------------------------------|
| Εκχυλισμένοι 0 βαθμονομητές        | -                  | 25 $\mu$ L | -                | -                             |
| Εκχυλισμένοι βαθμονομητές          | -                  | -          | 25 $\mu$ L       | -                             |
| Εκχυλισμένοι μάρτυρες              | -                  | -          | -                | 25 $\mu$ L                    |
| Εκχυλισμένα άγνωστα δείγματα       | -                  | -          | -                | 25 $\mu$ L                    |
| Ιχνηθέτης                          | 50 $\mu$ L         | 50 $\mu$ L | 50 $\mu$ L       | 50 $\mu$ L                    |
| Ρυθμιστικό διάλυμα NSB/προσθήκης   | 1,0 mL             | 1,0 mL     | -                | -                             |
| Αντιορός 25-OH-D                   | -                  | -          | 1,0 mL           | 1,0 mL                        |

3. Αναμίξτε καλά. Επνώστε για 90 λεπτά (+/- 10 λεπτά) στους 20 έως 25°C.
4. Διανέμετε 500  $\mu$ L σύμπλοκο καθίζησης DAG σε όλες τις υποδοχές, εκτός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών κρούσεων.
5. Αναμίξτε καλά. Επνώστε για 20 έως 25 λεπτά στους 20 έως 25°C.
6. Διανέμετε 500  $\mu$ L ρυθμιστικό διάλυμα NSB/προσθήκης σε όλες τις υποδοχές, εκτός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών κρούσεων.
7. Φυγοκεντρήστε χρησιμοποιώντας 1800 x g\* για 20 λεπτά.
8. Αποχύστε τα υπερκείμενα κλάσματα.
9. Μετρήστε κάθε σωλήνα σε έναν μετρητή γάμα για 60 δευτερόλεπτα ή περισσότερο.



















$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{ακτίνα σε εκατοστά}) (\text{rpm})^2$$

REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAFIA/  
REFERÊNCIAS/REFERENSER/IRODALOM/SEZNAM LITERATURY/REFERANSER/  
REFERINȚE/ЛИТЕРАТУРА/ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Chesney. R.W.. "Current Clinical Applications of Vitamin D Metabolite Research." **Clinical Orthopaedics and Related Research**. 161:285. (1981).
2. DeLuca. H.F. and H.K. Schnoes. "Metabolism and Mechanism of Action of Vitamin D." **Annual Reviews Biochemistry**. 45:631. (1976).
3. Clemens. T.L.. "Vitamin D: Recent Advances in Basic Research and Clinical Assay Methodology." **Journal of Clinical Immunoassay**. 9(4):183. (1986).
4. Preece. M.A.. S. Tomlinson. C.A. Ribot. J. Pietrek. H.T. Korn. D.M. Davies. J.A. Ford. M.G. Dunnigan and J.L.H. O'Riordan. "Studies of Vitamin D Deficiency in Man." **Q.J. Med.**. 44:575. (1975).
5. Kruger. D.W.. J. Lee. A. Raines and E.D. Lyne. "Vitamin D Metabolism and Skeletal Disease in Pediatric Populations." **Journal of Clinical Immunoassay**. 9(4):200. (1986).
6. Hollis. B.W. and W.B. Pittard III. "Relative Concentrations of 25-Hydroxyvitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> and 1.25-Dihydroxyvitamin D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> in Maternal Plasma at Delivery." **Nutrition Research**. 4:27. (1984).
7. Hollis. B.W. and W.B. Pittard. "Evaluation of the Total Fetomaternal Vitamin D Relationships at Term: Evidence for Racial Differences." **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 59(4):652. (1984).
8. Parfitt. A.M.. M.B. BChir. J.C. Gallagher. R.P. Heaney. C.C. Johnston. R. Neer and G.D. Whedon. "Vitamin D and Bone Health in the Elderly." **American Journal of Clinical Nutrition**. 36:1014. (1982).
9. Haddad. J.G. and K.J. Chyu. "Competitive Protein-Binding Radioassay for 25-Hydroxycholecalciferol." **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 33: 992. (1971).
10. Adams. J.S.. T.L. Clemens. J.A. Parrish and M.F. Holick. "Vitamin D Synthesis and Metabolism After Ultraviolet Irradiation of Normal and Vitamin-D-Deficient Subjects." **New England Journal of Medicine**. 306(12):722. (1982).
11. Beadle. P.C.. J.L. Burton and J.F. Leach. "Correlation of Seasonal Variation of 25-Hydroxycalciferol with UV Radiation Dose." **British Journal of Dermatology**. 102: 289. (1980).
12. Sherman. S.S.. B.W. Hollis and J.D. Tobin. "Vitamin D Status and Related Parameters in a Healthy Population: The Effects of Age. Sex. and Season." **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 71(2):405. (1990).
13. McLaughlin. M. A. Fairney. E. Lester. P.R. Raggatt. O.J. Brown and M.R. Willis. "Seasonal Variations in Serum 25-Hydroxycholecalciferol in Man." **Lancet**. 1:536. (1974).
14. Gloth. F.M.. J.D. Tobin. S.S. Sherman and B.W. Hollis. "Is the Recommended Daily Allowance for Vitamin D Too Low for the Homebound Elderly?" **Journal of the American Geriatric Society**. 39(2):137. (1991).
15. Sowers. M.R.. R.B. Wallace. B.W. Hollis and J.H. Lemke. "Parameters Related for 25-OH-D Levels in a Population-based Study of Women." **The American Journal of Nutrition**. 43:621. (1986).
16. Belsey. R.E.. H.F. DeLuca and J.T. Potts. "A Rapid Assay for 25-OH-Vitamin D<sub>3</sub> Without Preparation Without Preparative Chromatography." **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 38:1046. (1974).
17. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. 1991 Supplement to the third edition. **AACC Press**. Washington. D.C.

18. Tonks, D.B.. "Study of the Accuracy and Precision of Clinical Chemistry Determinations in 170 Canadian Laboratories." **Clinical Chemistry**, 9:217. (1963).
19. Rodbard, D.. et. al.. "Statistical Quality Control of Radioimmunoassay." **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 28:1412. (1968).
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions. Approved Guideline. NCCLS document C24-A (ISBN 1-56238-112-1). **NCCLS**, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA 19085. (1991).
21. U.S. Department of Health, Education, and Welfare. National Center for Health Statistics. "HANES I Hematology and Clinical Chemistry Procedure Developed or Utilized by the Center for Disease Control Bureau of Laboratories, 1971-1975." Part 16. (1976).
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards. "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices." NCCLS document EP5-T2, 12(4). Tentative Guideline (1992).
23. Montgomery, D.C.. "Design and Analysis of Experiments." Wiley, NewYork (1991).
24. Zitterman, A. 2003. Vitamin D in preventative medicine: Are we ignoring the evidence? **British Journal of Nutrition** 89:552-572.









**SYMBOLS USED WITH DEVICES**

|   | English  | Français  | Deutsch                                     | Español  | Italiano   |
|---|--|---|---|--|--|
|    | European Conformity                            | Conformité aux normes européennes                 | CE – Konformitätskennzeichnung              | Conformidad europea                                | Conformità europea                                     |
|    | Expiration Date                                | Date limite d'utilisation                         | Mindesthaltbarkeitsdatum                    | Fecha de caducidad                                 | Data di scadenza                                       |
|    | Manufacturer                                   | Fabricant   | Hersteller                                  | Fabricante   | Fabbricante  |
|    | Consult Instructions for Use                   | Consulter les instructions d'utilisation          | Gebrauchsanweisung beachten                 | Consulte las instrucciones de uso                  | Consultare le istruzioni per l'uso                     |
|    | In vitro diagnostic.                           | Diagnostic in vitro.                              | In-vitro-Diagnostikum.                      | Diagnóstico in vitro.                              | Diagnostica in vitro.                                  |
|    | Lot No.  | No. de lot  | Chargen-Nr.                                 | Número de lote                                     | Lotto n°   |
|    | Temperature limitation.                        | Limitation de température.                        | Temperaturbereich                           | Limitación de temperatura                          | Limite della temperatura                               |
|    | Antiserum                                      | Antisérum   | Antiserum                                   | Antisero   | Antisiero  |
|    | Precipitating reagent                          | Réactif précipitant                               | Fällungsreagenz                             | Reactivo precipitante                              | Reagente precipitante                                  |
|    | Tracer: antigen labelled with <sup>125</sup> I | Traceur : antigène marqué à l'iode <sup>125</sup> | Tracer: <sup>125</sup> I-markiertes Antigen | Trazador: antígeno etiquetado con <sup>125</sup> I | Tracciatore: antigene etichettato con <sup>125</sup> I |
|  | Buffer   | Tampon  | Puffer                                      | Tampón   | Tampone  |
|  | Calibrator                                     | Étalon  | Kalibrator                                  | Calibrador   | Calibratore  |
|  | Control serum                                  | Sérum de contrôle                                 | Kontrollserum                               | Suero de control                                   | Siero di controllo                                     |
|  | Reagent  | Réactif   | Reagenz                                     | Reactivo   | Reagente   |
|  | Dry Natural Rubber                             | Caoutchouc naturel sec                            | Trockener Naturkautschuk                    | Goma natural seca                                  | Gomma naturale secca                                   |
|  | Radioactive                                    | Radioactif  | Radioaktiv                                  | Radioactivo  | Radioattivo  |
|  | Highly flammable                               | Facilement inflammable                            | Leichtentzündlich                           | Fácilment inflamable                               | Facilment infiammabile                                 |
|  | Harmful  | Nocif   | Gesundheitsschädlich                        | Nocivo   | Nocivo   |

**SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.**





















CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

|   | Português                                       | Svenska   | Magyar                                      | Česky   | Norsk                                      |
|---|---|---|---|---|--|
|    | Conformidade com as normas europeias            | Europeisk överensstämmelse                          | European Conformity                         | Značka evropské shody                                 | EU-konformitet                             |
|    | Prazo de validade                               | Utgångsdatum  | Lejáratí idő                                | Datum ukončení použitelnosti                          | Utløpsdato                                 |
|    | Fabricante                                      | Tilverkare  | Gyártó                                      | Výrobce   | Tilvirker                                  |
|    | Consulte as instruções de utilização            | Se bruksanvisningen                                 | Felhasználói útmutató                       | Prostudujte návod k použití                           | Se Bruksanvisninger                        |
| <b>IVD</b>  | Diagnóstico in vitro.                           | Diagnostik in vitro.                                | In vitro diagnosztika                       | Diagnostický prostředek in vitro.                     | In vitro-diagnostikk.                      |
| <b>LOT</b>  | N.º do lote                                     | Batch-nummer  | Lot-szám                                    | Číslo šarže.  | Partnr.                                    |
|    | Limite de temperatura.                          | Temperaturbegränsning.                              | Hőmérséklet tartomány.                      | Teplotní limit.                                       | Temperaturbegrænsninger.                   |
| <b>Ab</b>   | Anti-soro                                       | Antiserum   | Antiszérum                                  | Antisérum   | Antiserum                                  |
| <b>Ab</b> <b>PEG</b>  | Precipitado no reagente                         | Utfällningsreagens                                  | Precipitáló reagens                         | Precipitační reagens                                  | Utfellingsreagens                          |
| <b>Ab</b> <sup>125</sup> I  | Traçador: antígeno marcado com <sup>125</sup> I | Spårelement: antigen betecknad med <sup>125</sup> I | Tracer: <sup>125</sup> I-tel jelölt antigén | Izotopový indikátor: antigen značený <sup>125</sup> I | Sporstoff: antigen merket <sup>125</sup> I |
| <b>BUF</b>  | Tampão  | Buffert   | Puffer                                      | Pufr  | Buffer                                     |
| <b>CAL</b>  | Calibrador                                      | Kalibrator  | Kalibrátor                                  | Kalibrátor  | Kalibrator                                 |
| <b>CONTROL</b>  | Soro de controlo                                | Kontrollserum                                       | Kontroll szérum                             | Kontrolní sérum                                       | Kontrollserum                              |
| <b>REAG</b>   | Reagente  | Reagens   | Reagens                                     | Reagens   | Reagens                                    |
| <b>DNR</b>  | Borracha natural seca                           | Torrnaturgummi                                      | Természetes száraz gyanta                   | Suchá přírodní guma                                   | Tørrnaturgummi                             |
|  | Radioactivo                                     | Radioaktiv  | Radioaktív                                  | Radioaktivní  | Radioaktiv                                 |
|  | Facilmente inflamável                           | Mycket brandfarligt                                 | Rendkívül gyúlékony                         | Vysoce hořlavý  | Svært brannfarlig                          |
|  | Nocivo  | Skadligt  | Káros                                       | Zdraví škodlivý                                       | Skadelig                                   |

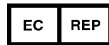
SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

|   | Română  | АНГЛИЙСКИ  | Ελληνικά  |
|---|---|--|---|
|    | Conformitate europeană                        | Европейска Общност                                       | Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση                              |
|    | Data de expirare                              | Годен до   | Ημερομηνία Λήξης                                  |
|    | Producător                                    | Производител   | Κατασκευαστής                                     |
|    | Consultați Instrucțiunile de folosire         | Вж. указанията за употреба                               | Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσης                 |
|    | Diagnostic in vitro.                          | In vitro диагностика.                                    | In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν.     |
|    | Lot Nr.                                       | Партиден No.   | Αρ. παρτίδας                                      |
|    | Limită de temperatură.                        | Температурни ограничения.                                | Περιορισμοί θερμοκρασίας                          |
|    | Antiserum                                     | Антисерум  | Αντιορός  |
|    | Reactiv de precipitare                        | Преципитиращ реагент                                     | Αντιδραστήριο καθίζησης                           |
|    | Trasor: antigen etichetat cu <sup>125</sup> I | Изотопен индикатор: антиген, маркиран с <sup>125</sup> I | Ιχνηθέτης: Αντιγόνο σημασμένο με <sup>125</sup> I |
|  | Tampon  | Буфер  | Ρυθμιστικό διάλυμα                                |
|  | Probă-etalon                                  | Калибратор   | Βαθμονομητής                                      |
|  | Ser de control                                | Контролен серум  | Ορός μάρτυρα                                      |
|  | Reactiv                                       | Реагент  | Αντιδραστήριο                                     |
|  | Cauciuc natural uscat                         | Сух естествен каучук                                     | Ξηρό φυσικό καουτσούκ                             |
|  | Radioactiv                                    | Радиоактивно   | Раδιενεργό  |
|  | Foarte inflamabil                             | Силно запалимо   | Πολύ εύφλεκτο                                     |
|  | Nociv   | Вредно   | Επιβλαβής   |



DiaSorin Inc.  
1951 Northwestern Avenue  
P.O. Box 285  
Stillwater, MN 55082-0285



DiaSorin S.p.A.  
13040 Saluggia (VC) Italy

Phone: 651-439-9710  
FAX: 651-351-5669

|  |               |
|--|---------------|
| For Customer Service in the<br>U.S. and Canada Call Toll Free:<br>800-328-1482 |               |
| In the United Kingdom Call:<br>+44(0) 1344 401 430<br>FAX: +44(0) 7884 050812  |               |
| 12654E   | 34659<br>7/10 |

PRINTED IN U.S.A.

