

1,25-Dihydroxyvitamin D

¹²⁵I RIA Kit

For the quantitative determination of
1,25-Dihydroxyvitamin D in serum or EDTA plasma

Instruction Manual

Manuel d'Instructions

Testanleitung

Manual de Instrucciones

Manuale di Istruzioni

Bruksanvisning

Návod k použití

Brukermanual

Εγχειρίδιο οδηγιών

REF: 65100E

DiaSorin

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

TABLE OF CONTENTS

English	Page 1
Français	17
Deutsch	35
Español	53
Italiano.....	71
Svenska	88
Cesky	105
Norsk.....	121
Ελληνικά.....	137

1,25-DIHYDROXYVITAMIN D ¹²⁵I RIA KIT

1. INTENDED USE

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

The 1,25-Dihydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA is a competitive equilibrium radioimmunoassay intended for the quantitative determination of 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂-D) in human serum or EDTA plasma to be used to assess 1,25-(OH)₂-D deficiency associated with renal disease. Assay results should be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in making individual patient management decisions in adult populations.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Vitamin D is derived from 2 sources: exogenous (dietary) and endogenous (biosynthesis, regulated by exposure to ultraviolet light). The exogenous or nutritional source includes foods containing naturally low levels of vitamin D₂ (e.g. milk, butter, cereals supplemented with vitamin D₂), nutritional supplements in the form of readily available over-the-counter vitamins, and therapeutic formulations of the D₂ vitamins.¹ Vitamin D is not inherently active as it enters the circulation, by either dietary or photochemical routes. Biological activity is gained following a complex series of metabolic steps.²

It is now known that the metabolic activation of vitamin D is an intricately controlled process, subject to extensive alteration by variables including dietary calcium and phosphorus, degree of vitamin D deficiency, genetic deficiencies, parathyroid hormone concentrations, exposure to ultraviolet light, and degree of renal function.³ The biosynthesis of the dihydroxylated forms of vitamin D₃ begins with the action of solar ultraviolet light on 7-dehydrocholesterol to form vitamin D₃ in the skin. Once vitamin D₃ enters the circulation it is rapidly taken up by the liver where it is metabolized to 25-hydroxyvitamin D₃ (25-OH-D₃). The liver will also hydroxylate dietary vitamin D₂ to 25-hydroxyvitamin D₂ (25-OH-D₂).^{2,4}

Following hepatic hydroxylation, 25-OH-D is transported in association with vitamin D binding protein to the kidney where further hydroxylation takes place. The addition of a hydroxyl at position 1 yields 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂-D). 1,25-dihydroxyvitamin D is the most potent naturally occurring vitamin D metabolite discovered so far, and its production is tightly regulated through concentrations of serum calcium, phosphorus, and parathyroid hormone. During times of calcium stress, 1,25-(OH)₂-D is the most important vitamin D metabolite produced by the kidney.^{5,6}

This is due to its essential role in the efficient active absorption of calcium and phosphorus, as well as their normal metabolism. Consequently, the measurement of 1,25-(OH)₂-D is rapidly becoming an efficient tool in the research of diseases and conditions that affect the normal metabolism of phosphorus and calcium.^{7,8,9}

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin 1,25-(OH)₂-D assay consists of a two-step procedure. The assay involves a preliminary extraction and subsequent purification of vitamin D metabolites from serum or EDTA plasma using C₁₈OH cartridges.¹⁰ Following extraction, the treated sample is then assayed using a competitive RIA procedure. The RIA method is based on a polyclonal antibody that is specific for both 1,25-(OH)₂ D₂ and 1,25-(OH)₂ D₃. The sample, antibody and tracer are incubated for 2 hours at 20-25°C. Phase separation is accomplished after a 20 minute incubation at 20-25°C with a second antibody precipitating complex. After centrifugation and decantation, the bound fraction remaining in the pellet is counted in a gamma counter. Values are calculated directly from a calibrator curve of known concentrations. The final concentration of the 1,25-(OH)₂D in serum and EDTA plasma samples is expressed as pg/mL.

4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

1,25-(OH) ₂ D NSB BUFFER	1 vial / 3 mL
1,25-(OH) ₂ D CALBRATOR O	1 vial / 20 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ CALIBRATOR 1-5	5 vials / 3 mL
1,25-(OH) ₂ D ANTISERUM	1 bottle / 35 mL
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 vial / 10 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ PRETREATMENT SOLUTION	1 bottle / 50 mL
1,25-(OH) ₂ D GAR PRECIPITATING COMPLEX	2 vials / 35 mL
1,25-(OH) ₂ D CONTROL SERUM	2 vials / 3 mL
95% ETHANOL	1 vial / 7 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.

When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming. Store all reconstituted reagents at -15°C or lower immediately following use. Reagents from different batches must not be mixed.

4.1 1,25-(OH)₂D NSB Buffer: Ready to use reagent

Potassium phosphate gelatin buffer containing ProClin® 300 (< 0.2%).

4.2 1,25-(OH)₂D O Calibrator: Ready to use reagent

Phosphate buffer containing bovine serum proteins and ProClin 300 (< 0.2%).

4.3 1,25-(OH)₂D₃ Calibrators (1-5): Lyophilized reagent

Five lyophilized (1,25-(OH)₂D₃) calibrators at concentrations ranging from 5 - 200 pg/mL containing human serum and ProClin 300 (<0.2%). Reconstitute each calibrator with 3.0 mL of calibrator zero. Exact concentrations are stated on the vial labels. The kit calibrators are calibrated using UV quantitation. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as recommended.

4.4 1,25-(OH)₂D Antiserum: Ready to use reagent

Rabbit anti-1,25-(OH)₂D serum diluted in phosphate-gelatin buffer containing ProClin 300 (<0.2%).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃ Ready to use reagent

Radio-iodinated 1,25-(OH)₂D₃ analogue diluted in an ethylene glycol phosphate buffer.

4.6 1,25-(OH)₂D₃ Pretreatment Solution: Ready to use reagent

Potassium phosphate buffer.

4.7 1,25-(OH)₂D Controls: Level 1 (Normal), Level 2 (Elevated): Ready to use reagent

Processed human serum pool, containing ProClin 300 (<0.2%), spiked with the appropriate amounts of 1,25-(OH)₂D to obtain control concentrations within the specified ranges. Control 1 is within the normal range and Control 2 is within an elevated 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.

4.8 Goat Anti-Rabbit (GAR) Precipitating Complex: Lyophilized reagent

Normal rabbit serum, pre-precipitated with goat anti-rabbit serum and polyethylene glycol (PEG), is diluted in BSA-borate buffer with 0.1% sodium azide and other preservatives added (lyophilized). Reconstitute the vial with 35 mL of distilled or deionized water; mix thoroughly until the suspension appears homogeneous and then allow it to stand for a minimum of 30 minutes at room temperature with occasional mixing.

4.9 95% Ethanol: Ready to use reagent
95% ethanol and 5% water.

NOTE: C₁₈OH cartridges are also required for this procedure. These cartridges must be ordered separately under DiaSorin Cat. No. 65101E.

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 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 an 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, 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 ed., 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. 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)

R20/21/22 - Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

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

REAGENTS CONTAINING ETHANOL

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

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 5.5 μCi (204 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.
- 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. COLLECTION AND PREPARATION OF SERUM AND PLASMA

The 1,25-Dihydroxyvitamin D kit requires 500 μL of either serum or EDTA plasma to perform the assay extraction; a volume of 1.5 mL will permit repeat analysis and provide adequate pipetting volume as well.

Either human serum or plasma may be used in this kit. The anticoagulant EDTA 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.

For serum, allow the blood to clot at room temperature (15-25°C). Centrifuge for 15 minutes using approximately $760 \times g^*$ 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.

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

Store serum or plasma samples at -15°C or lower. Samples should not be repeatedly frozen and thawed. However, a study performed by DiaSorin showed no significant change in values following 3 freeze-thaw cycles of the samples. Samples have been stored at DiaSorin up to 6 months at -15°C or lower with no significant change in results.

8. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- 8.1 C₁₈OH Cartridges (24 cartridges) ordered separately under DiaSorin Cat. No. 65101E.
- 8.2 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm and 13 x 100 mm.
- 8.3 Test tube rack.
- 8.4 Parafilm or equivalent for covering test tubes.
- 8.5 Foam rack for decanting or equivalent.
- 8.6 Centrifuge capable of accommodating 12 x 75 mm tubes and attaining 1800 x g*.
- 8.7 Gamma counter capable of counting ¹²⁵I.
- 8.8 Vortex mixer.
- 8.9 Pipetting devices:
 - a. Micropipettors calibrated to deliver 75 µL, 300 µL and 500 µL.
 - b. Repeating dispensers capable of delivering 50 µL, 300 µL, and 500 µL.
 - c. Volumetric pipettes for reconstituting calibrators, 3.0 mL.
- 8.10 Deionized or distilled water.
- 8.11 Organic solvents:

The following solvents will be needed for the preparation and extraction of samples.

Use only HPLC-grade solvents.

Do not expose any of the organic solvents to acid washed glassware or any other acidic conditions.

 - a. Acetonitrile.
 - b. Methanol.
 - c. Hexane. (IMPORTANT: n-hexane percentage must be greater than 95%)
 - d. Methylene chloride (must **not** contain alcohol as a preservative).
 - e. Isopropanol (2-propanol).
- 8.12 Recommended device for the C₁₈OH cartridges:
 - a. Vac Elut sample processing station. Processes 24 columns per run. Available from Analytichem International or DiaSorin. To order from DiaSorin, use DiaSorin Cat. No. 11610.
- 8.13 Materials needed for drying samples:
 - a. Nitrogen gas.
 - b. Drying manifold with 37°C (±2°C) heating block or water bath: N-EVAP or MULTI-VAP available through Organomation Associates (Berlin, MA) or Reacti-Vap II and Reacti-Therm III available through Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

* g = (1118 x 10⁻⁸) (radius in cm) (rpm)²

9. PREPARATION OF ORGANIC SOLVENTS FOR THE COLUMN EXTRACTION

NOTE: The Organic solvent mixtures should be prepared before starting the Preliminary Extraction Procedure.

PRECAUTIONS:

Prepare solvent mixtures as described in TABLE I; a 500 mL volume preparation is recommended by DiaSorin. Larger or smaller volumes can be prepared as long as the proportions remain consistent. However, volumes should be large enough to minimize measurement error. Measure each solvent independently for best results.

PRECAUTIONS:

Use distilled or deionized water where applicable.

TABLE I
Solvent Preparation

Solvent Mixture	Materials	1 L	500 mL
70:30	methanol water	700 mL 300 mL	350 mL 150 mL
90:10	hexane methylene chloride	900 mL 100 mL	450 mL 50 mL
99:1	hexane IPA	990 mL 10 mL	495 mL 5 mL
92:8	hexane IPA	920 mL 80 mL	460 mL 40 mL

10. PRELIMINARY EXTRACTION PROCEDURE

- 10.1** Reconstitute each lyophilized calibrator with 3.0 mL of calibrator zero. Mix the calibrators well and let stand for 15-20 minutes to ensure complete reconstitution. Thaw any frozen reagents completely. Allow all reagents to reach room temperature. Do not allow reagents to reach temperatures above 25°C. Mix all reagents well before use.
- 10.2** Pipette 500 µL of each calibrator (0-5), control and patient sample into labeled 12 x 75 mm borosilicate glass tubes.
- 10.3** Add 500 µL of acetonitrile to each sample; vortex intermittently, at least 3 times, during a time period of 10 minutes.
- 10.4** Centrifuge tubes at 760 x g* for 10 minutes at 20-25°C.
- 10.5** Decant the sample supernatants into labeled 12 x 75 mm or 13 x 100 mm (if preferred) test tubes; discard pellets.
- 10.6** Add 500 µL of Pretreatment Solution to each tube and vortex.
NOTE: This kit is designed to accommodate up to 48 extractions including the calibrators and controls plus 40 unknowns. This means that 24 samples can be extracted on the VacElut immediately and then the remaining set of 24 samples can be extracted afterwards. The column extractions should be done as soon as possible after the pretreatment addition. However, once column extracted, samples may be stored for 96 hours at -15°C or below.
- 10.7** The samples are now ready to be applied to the C₁₈OH cartridges.

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

11. COLUMN PROCEDURE

- 11.1 For an explanation of the VAC ELUT, refer to the VAC ELUT User's Guide. Assemble the station as instructed.
- 11.2 Label a 13 x 100 mm borosilicate glass tube for each calibrator (0-5), control, and unknown sample. Place these tubes in the VAC ELUT. Make sure the VAC ELUT lid is in the "WASTE" position and the tubes are positioned to collect the desired eluates. Place the C₁₈OH cartridges on to the VAC ELUT cover.
- 11.3 Add the solvent mixtures to the specified cartridge as described in TABLE II.

IMPORTANT:

Vacuum Usage:

Turn on the vacuum after each solvent addition and allow the solvent mixture to flow **completely** through the cartridge before proceeding to the next solvent. Turn the vacuum on and off at the recommended steps in TABLE II (if preferred, the vacuum may be turned off between each solvent addition). The vacuum should be set at 10 inches (254 mm of Hg) or lower. Elute each solvent mixture through the "WASTE" outlet and into appropriate waste containers until the final collection step.

Sample Application:

The samples can either be decanted directly onto the cartridge or applied with a pipette.

Do not let the cartridges air dry for more than 5 minutes between applications.

C₁₈OH Cartridge Pretreatment:

The C₁₈OH cartridges should be washed with 5 mL of 90:10 (hexane: methylene chloride), 5 mL of IPA and 5 mL of methanol prior to first time usage. The 90:10 (hexane: methylene chloride) solvent mixture can be prepared by measuring 900 mL of hexane and 100 mL of methylene chloride. Place the new, unused cartridges on the VAC ELUT apparatus, set in the "WASTE" position, and add 5 mL of 90:10 (hexane: methylene chloride) followed by 5 mL of IPA to each column and then 5 mL of methanol. Allow each solvent mixture to pass entirely through the cartridges before proceeding to the next mixture. After this initial preparation, it will not be necessary to repeat this step since the cartridges will be regenerated during the extraction procedure.

NOTE: If additional samples are to be extracted (more than 24), regenerate the cartridges using the same method outlined in TABLE II. The cartridges can be re-used up to 30 times.

NOTE: The C₁₈OH Cartridge material is held in place using a porous fiber frit. Discard cartridges with dislodged or missing frits as the C₁₈OH material may be lost.

TABLE II

Description and Analysis of Extraction	Extraction Steps	Eluant Handling
<p>Column Preparation/Regeneration Removes: Interfering substances from previous usage (step 1)</p>	<p>1. Add 1 mL Methanol, Turn on Vacuum. 2. Turn off Vacuum.</p>	Discard "WASTE"
<p>Sample Application</p>	<p>3. Apply all Samples, Turn on Vacuum. from Preliminary Extraction Procedure (step 10).</p>	Discard "WASTE"
<p>Purification/Removal of Vitamin D Metabolites Removes: Interfering polar lipids, salts, and pigments (step 4) 25(OH)D (Step 5) Remaining 25(OH)D and 24,25(OH)₂D/25,26(OH)₂D (step 6)</p>	<p>4. Add 5 mL 70:30 Methanol/Water (deionized or distilled). 5. Add 5 mL 90:10 Hexane/Methylene Chloride. 6. Add 5 mL 99:1 Hexane/Isopropanol. 7. Turn off the Vacuum.</p>	Discard "WASTE"
<p>Collection of 1,25-(OH)₂D Elution of purified 1,25-(OH)₂D (step 9)</p>	<p>IMPORTANT! 8. Switch Vac Elut to "Collect:" 9. Add 3 mL 92:8 Hexane/Isopropanol, Turn on the Vacuum. 10. Turn off the Vacuum.</p>	"COLLECT"

12. DRYING AND RECONSTITUTION OF ELUATES

- 12.1 Place the sample tubes containing the eluates in a heating block or water bath at 37°C (±2°C) for drying.
- 12.2 Dry the eluates under a hood using 2-4 psi of nitrogen gas (drying time 20-30 minutes).
- 12.3 Remove the tubes immediately after the eluate has dried.
- 12.4 Reconstitute each of the dried extracts with 50 µL of 95% ethanol; vortex gently at a low to medium speed. Add 125 µL of tracer into the same tubes containing the 50 µL of 95% ethanol, vortex gently again at a low to medium speed. **NOTE:** The vortex steps are very important for ensuring that the sample has been properly reconstituted and for obtaining good precision. **CAUTION:** Keep the vortex at the lower portion of the tube to prevent loss of sample volume which will ensure sufficient pipetting volume for the assay. Label one extra tube for Total count and one tube for NSB. Add 50 µL of 95% ethanol and 125 µL of tracer into both tubes. These will be used to create the TC (Total Count) and NSB duplicate tubes for the assay set up.
- 12.5 Perform the assay **immediately** after reconstituting the samples. For best results when performing larger assays, reconstitute 12 - 15 samples at a time and then pipette into the assay before reconstituting the next 12 - 15 samples.

13. ASSAY PROCEDURE

- 13.1 Set up labeled 12 x 75 mm disposable borosilicate glass tubes in duplicate for each calibrator (0-5), control and sample according to scheme of the assay. Carefully add 75 μ L of the reconstituted calibrator, control, and sample extracts into the duplicate assay tubes.
CAUTION: This step must be performed carefully since there is only 25 μ L excess in each tube.
- 13.2 Refer to "Drying and Reconstitution of Eluates" step number 4. Add 75 μ L from the TC (Total Count) tube into duplicate assay tubes. Repeat this step for the NSB duplicate assay tubes as well.
- 13.3 Add 300 μ L of NSB buffer into the NSB tubes.
- 13.4 Add 300 μ L of primary antibody into all tubes except the Total Counts and NSB tubes.
- 13.5 Mix well; incubate for 2 hours (\pm 15 minutes) at 20-25°C.
NOTE: Reconstitute the GAR Precipitating Complex with 35 mL of distilled or deionized water, mix thoroughly until the suspension appears homogenous and then allow it to stand for a minimum of 30 minutes before use at room temperature with occasional mixing before and during use.
- 13.6 Add 500 μ L of well-mixed GAR Precipitating Complex into all tubes except the Total Count tubes. Incubate for 20 minutes (\pm 5 minutes) at 20-25°C.
- 13.7 Centrifuge all tubes for 20 minutes at 20-25°C at 1800 x g*, except the Total Count tubes.
- 13.8 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.
- 13.9 Measure the radioactivity by counting all tubes for 1 minute on a gamma counter. Tubes should be counted for a minimum of 1 minute (see Limitations of Procedure section).

14. PROCEDURAL COMMENTS

- 14.1 Add each aliquot of reagent to the lower third of the assay tube to ensure complete mixture of reagents.
- 14.2 Correct solvent proportions are critical for good recoveries. Prepare solutions in volumes large enough to minimize measurement error.
- 14.3 If any sample reads greater than the highest calibrator, it should be re-assayed by diluting with the kit calibrator zero prior to extraction. Results should be multiplied by the appropriate dilution factor. For example, mix 500 μ L of the sample with 500 μ L of the calibrator zero, then assay 500 μ L of this sample mixture as per the product insert.
- 14.4 No assay drift was observed in the average time it takes to perform a 100 tube assay.

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

14.5 In order for a laboratory 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.

a. Total Counts

b. Maximum Binding

Average counts per minute (CPM) of 0 calibrator tubes/Average CPM of total count tubes.

c. Nonspecific Binding

Average CPM of the NSB tubes/Average CPM of total count tubes.

d. Slope of the Calibrator Curve

The 50% suppression can be monitored.

15. QUALITY CONTROL

Each laboratory should include at least two controls (one normal range control and one elevated range) control in every assay to monitor kit performance. Commercially available controls or the 2 reference controls provided with the kit may be utilized.

The controls used should be treated as unknown specimens and assayed in duplicate. Quality control charts should be maintained by the laboratory to follow performance of the controls. Acceptable performance limits should be determined by each individual laboratory for each level of control using statistically based methods designed to detect both random and systematic errors. Control results must meet the laboratory's criteria for acceptability prior to reporting patient test results.^{12,13,14}

16. CALCULATION OF RESULTS

There are many methods in existence for calculating results of RIA assays. 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 a %B/B₀ versus log concentration calculation method based on a Spline Smoothed curve fit program.

16.1 Calculation of Percent B/B₀

- a. Calculate the average CPM for each calibrator, control and unknown sample.
- b. Subtract the average CPM of the NSB tubes from all counts.
- c. Divide the average corrected CPM of each calibrator, control or unknown sample by the average corrected CPM of the 0 calibrator and multiply by 100.

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

16.2 Use of Calibrator Curve Plot

- a. Using 2 cycle log-logit or semi-log graph paper, plot percent B/B₀ (%) for the 1,25 (OH)₂D calibrators on the ordinate (Y axis) versus the calibrator concentration on the abscissa (X axis).

NOTE: Automated data reduction programs may also be utilized in the analysis of data. DiaSorin utilizes Multi-Calc (Pharmacia) with a LIN-LOG smooth-SPLINE fit program. Other data reduction methods must be validated before incorporating for regular use.

- b. Draw a best-fit line through the points.
- c. Interpolate the levels of 1,25-(OH)₂D in the samples from the plot of the calibrators.
- d. If any unknown sample has been diluted, correct for the appropriate dilution factor.
- e. The reportable range of the assay is 5.0 pg/mL to 200 pg/mL. Any value that reads below the lowest calibrator, 5.0 pg/mL, is an extrapolated value and may be reported as "less than 5 pg/mL".
- f. Calculate maximum binding by dividing CPM of 0 calibrator by the average total counts obtained in the total count tubes.

Typical sample data for the 1,25-(OH)₂D RIA is shown in TABLE IV and FIGURE 1; this information is for reference only and should not be used for the calculation of any value.

TABLE IV
DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA Sample Data

Tube	Duplicate CPM	Average CPM	Corrected CPM	Percent Bound (B/T)	Percent (B/B ₀)	Conc. (pg/mL)
Total Count	40,792 40,578	40,685				
NSB	1,438 1,439	1,439		3.5		
0 Calibrator	18,006 18,119	18,063	16,624	44.4	100.0	
Calibrators (pg/mL)						
1 (5.0)	16,710 16,770	16,740	15,302		92.0	
2 (15.0)	14,941 14,916	14,929	13,490		81.2	
3 (30.0)	13,087 13,124	13,106	11,667		70.2	
4 (75.0)	9,820 9,765	9,793	8,354		50.2	
5 (200)	6,412 6,464	6,438	5,000		30.0	
Controls						
Level 1: normal range	13,275 13,530	13,403	11,964		72.0	27.3
Level 2: high range:	8,206 8,124	8,165	6,727		40.5	119

DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA Sample Calibrator Curve

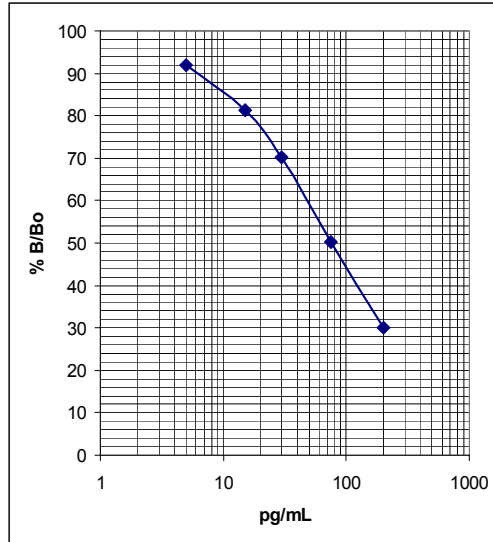


FIGURE 1

DATA REDUCTION

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

17. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- 17.1 Counting times should be sufficient to prevent the introduction of error due to counter inefficiency (for example, accumulation of 2,000 CPM will yield 5% error, 10,000 CPM will yield 1% error).
- 17.2 Assay results should be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in making individualized patient management decisions.
- 17.3 The performance characteristics of this assay have not been established in a pediatric population.

18. EXPECTED VALUES

Reference Interval for Normal Donors

It is important for each laboratory to establish its own reference interval representative of its typical population. However, 1,25-(OH)₂D values were collected from 123 apparently healthy volunteers from three Midwestern U.S.A cities in a clinical trial conducted at three sites during the summer and autumn months. These 123 healthy donors were composed of a racially diverse set of 37 males and 86 females, with an age range of 21-68 years. The mean 1,25-(OH)₂D value for the entire sample (n=123) was 43.9 pg/mL. The 95% reference interval estimated by a nonparametric method (following CLSI guideline C28-A2¹⁵) was 25.1-66.1 pg/mL.

End-stage renal disease patients

A clinical trial was conducted to evaluate the levels of 1,25-(OH)₂D that would be found in an adult population diagnosed with end-stage renal disease. A total of 87 such volunteers (49 males, 38 females, age range of 19-84) from three Midwestern U.S.A. cities were collected and assayed. The observed range of 1,25-(OH)₂D values for this sample (n=87) was 1.6-17.3 pg/mL. The 95% upper reference limit estimated by the nonparametric procedure is 14.2 pg/mL.

19. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

19.1 Precision

Assay precision was evaluated by DiaSorin based on the principles of the CLSI Guideline (EP5-A).¹⁶ Three human serum-based control levels with 1,25-(OH)₂-D concentrations distributed across the assay range were assayed over 25 assay days, spanning more than 60 operating days. Multiple technicians, as well as multiple lot numbers for all components were included. The combined results were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and are summarized in the following table.

Sample	N	Mean pg/mL	Within-run		Between Day		Total	
			S.D.	%CV	S.D.	%CV	S.D.	%CV
LOW	25	25.8	1.76	6.8	3.8	14.6	4.0	15.3
MID	25	41.3	3.16	7.7	4.6	11.1	5.1	12.3
HIGH	25	105.2	11.86	11.3	11.8	11.2	14.4	13.7

19.2 Trueness: The assay trueness has been checked by the linearity test and the recovery test.

Linearity (Parallelism)

Linearity of dilution was evaluated by DiaSorin consistent with the recommendations found in CLSI guideline, EP6-P.¹⁷ Three serum patient sample pools were prepared by serial dilution with calibrator zero and aliquots individually frozen at -20°C. Each sample and dilution were assayed in multiple replicates over three different assay dates. Expected values were determined by the undiluted values of each sample pool multiplied by the dilution factor. The data is summarized below and the composite results plotted as a linear regression of Expected vs. Observed Value.

Sample #	Dilution	Expected Value (pg/mL) (N=10)	Mean Observed Value (pg/mL) (N=10)
1	NEAT	49.6	49.6
	1:2	24.8	25.3
	1:4	12.4	11.1
	1:8	6.2	4.4
2	NEAT	50.2	50.2
	1:2	25.1	24.2
	1:4	12.6	12.2
	1:8	6.3	4.6
3	NEAT	62.0	62.0
	1:2	31	31.9
	1:4	15.5	13.4
	1:8	7.8	6.2

Recovery

The ability of the assay to quantitatively recover all of the analyte present in clinical samples was evaluated by the addition of different amounts of freshly prepared pure 1,25-(OH)₂-D antigen to three patient sample pools. Three concentrations were chosen and assayed in duplicate, and percent recovery determined. The mean % recovery by this method was 101%.

Sample #	Init. Conc (pg/mL) 1.0 mL	Spike Amount (pg)	*Expected (pg/mL)	Observed (pg/mL)	% Recovery
1	30.8	50.0	77.7	75.6	97
		62.5	88.9	87.2	98
		75.0	99.8	103	103
2	42.8	50.0	89.2	89.5	100
		62.5	100.3	98.9	99
		75.0	111.0	118	106
3	40.3	50.0	86.8	83.9	97
		62.5	97.9	103	105
		75.0	108.8	118	108

*Expected concentration calculation includes dilution factor introduced by spiking solution.

19.3 Analytical Sensitivity

The sensitivity of this assay, when defined as the lowest quantity differentiated from zero at 2 calibrator deviations below the means cpm of the calibrator zero (n=20), has been shown to be ≤ 2.0 pg/mL.

19.4 Analytical Specificity

Data on the cross-reactivity of the anti serum used in this kit is expressed as the ratio of 1,25-(OH)₂D₃ concentration to the cross-reacting substance concentration at 50% inhibition of maximum binding.

Analyte	Conc. At 50% B/Bo	% Cross Reactivity
24,25 D ₃	76,420 pg/mL	<0.5
25,26 D ₃	24,330 pg/mL	<0.5
25 D ₃	>>>1 mg/mL	<0.5

19.5 Interfering Substances

An interference study was conducted to determine whether elevated levels of common endogenous substances could negatively impact assay results. The evaluation was consistent with CLSI guidelines (EP7-P).¹⁸ Three human serum based samples containing low, medium or high levels of 1,25-(OH)₂-D₃ were tested with either additions of the test substance or as controls spiked with identical volumes of test substance vehicle. Each sample was extracted twice generating four replicates. Results presented below demonstrate that there was no interference by any of the tested substances, as determined by statistical testing by ANOVA (95% confidence interval), or by the mean value of the spiked samples exceeding ± 2 calibrator deviation ranges found for the controls.

Bilirubin

Sample #	Control Mean (pg/mL)	Control 2 SD range	Bilirubin Mean (pg/mL)	Interference ANOVA
Low	19.9	18.5-21.3	19.5	0.54
Mid	31.7	27.7-35.7	29.9	0.22
High	79.7	63.5-95.9	83.2	0.45

Cholesterol

Sample #	Control Mean (pg/mL)	Control 2 SD range	Cholesterol Mean (pg/mL)	Interference ANOVA
Low	19.9	18.5-21.3	19.4	0.64
Mid	31.7	27.7-35.7	29.7	0.15
High	79.7	63.5-95.9	75.2	0.40

Triglyceride

Sample #	Control Mean (pg/mL)	Control 2 SD range	Triglyceride Mean (pg/mL)	Interference ANOVA
Low	14.7	12.9-16.5	15.1	0.88
Mid	30.4	22.4-38.4	33.4	0.25
High	92.6	69.5-116.9	95.4	0.68

Hemoglobin

Sample #	Control Mean (pg/mL)	Control 2 SD range	Hemoglobin Mean (pg/mL)	Interference ANOVA
Low	21.5	17.5-25.5	20.8	0.53
Mid	38.6	35.4-41.8	40.0	0.43
High	112.7	101.4-124.0	120.6	0.17

Urea

Sample #	Control Mean (pg/mL)	Control 2 SD range	Urea Mean (pg/mL)	Interference ANOVA
Low	25.1	20.9-29.3	26.6	0.39
Mid	36.2	23.8-48.6	35.9	0.96
High	120.1	97.4-142.8	118.6	0.82

REFER TO LAST PAGE FOR REFERENCES

SCHEME OF THE ASSAY

1. The calibrators, controls and unknowns are all reconstituted with 95% ethanol and tracer after the column procedure dry down step.
2. Dispense reagents according to the following scheme:

Tubes/Reagents	Total Counts	NSB	Cal 0-5	Controls and unknown samples
Reconstituted Calibrators	-	-	75 µL	-
Reconstituted Controls and Unknown Samples	-	-	-	75 µL
95% Ethanol and Tracer **	75 µL	75 µL	-	-
NSB Buffer	-	300 µL	-	-
1,25-(OH) ₂ -D Antiserum	-	-	300 µL	300 µL

NOTE: Total count and NSB tubes are created by adding 50 µL of 95% ethanol with 125 µL of tracer and pipetting 75 µL of this mixture into duplicate assay tubes.

3. Mix well; incubate for 2 hours (+/- 15 minutes) at 20-25°C.
4. Dispense 500 µL of GAR precipitating reagent into all wells, except the total count tubes.
5. Mix well; incubate for 20 minutes (+/- 5 minutes) at 20-25°C.
6. Centrifuge using 1800 x g* for 20 minutes at 20-25°C.
7. Decant the supernatants.
8. Count each tube in a gamma counter for 1 minute.

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

TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE 1,25-DIHYDROXYVITAMINE D ¹²⁵I

1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

La trousse de dosage radio-immunologique 1,25-Dihydroxyvitamine D ¹²⁵I est un dosage radio-immunologique de l'équilibre de compétition qui permet la détermination quantitative de la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25-(OH)₂-D) dans le sérum humain ou le plasma sur EDTA afin d'évaluer la carence en 1,25-(OH)₂-D qui est associée avec les maladies rénales. 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 COMMENTAIRE

La vitamine D est dérivée de 2 sources : exogène (aliments) et endogène (biosynthèse, régulée par l'exposition à la lumière ultraviolette). La source exogène ou nutritionnelle inclut les aliments contenant des taux naturellement faibles de vitamine D₂ (par exemple le lait, le beurre, les céréales enrichies avec de la vitamine D₂), les suppléments nutritionnels sous forme de vitamines en vente libre et les formulations thérapeutiques des vitamines D₂.¹ La Vitamine D ne possède pas une activité inhérente quand elle entre dans le sang, par des voies alimentaires ou photochimiques. L'activité biologique est obtenue après après une série complexe d'étapes métaboliques.²

On sait que l'activation métabolique de la vitamine D est un procédé contrôlé extrêmement compliqué qui varie beaucoup en fonction de certaines variables Comme le taux de calcium et phosphore dans l'alimentation, le degré de carence en vitamine D, les déficits génétiques, les concentrations d'hormone parathyroïdienne, l'exposition à la lumière ultraviolette et le fonctionnement rénal.³ La biosynthèse des formes dihydroxylées de la vitamine D₃ commence avec l'action de la lumière ultraviolette du soleil sur le 7-déhydrocholestérol pour former la vitamine D₃ dans la peau. Dès que la vitamine D₃ entre dans le sang, elle est rapidement absorbée par le foie où elle est métabolisée en 25-hydroxyvitamine D₃ (25-OH-D₃). Le foie effectue aussi l'hydroxylation de la vitamine D₂ présente dans les aliments en 25-hydroxyvitamine D₂ (25-OH-D₂).^{2,4}

Après l'hydroxylation hépatique, le 25-OH-D est transporté, avec la protéine fixatrice de la vitamine D, dans les reins où une autre hydroxylation a lieu. L'addition d'un groupement hydroxyle à la position 1 produit la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25-(OH)₂-D). La 1,25-dihydroxyvitamine D est le métabolite naturel le plus actif de la vitamine D découvert jusqu'à ce jour, et sa production est étroitement régulée par l'intermédiaire des concentrations de calcium, phosphore et de l'hormone parathyroïdienne dans le sérum. Pendant les périodes de stress calcique, la 1,25-(OH)₂-D est le métabolite de la vitamine D le plus important produit par les reins.^{5,6}

Cela s'explique par son rôle essentiel dans l'absorption active efficace du calcium et du phosphore, ainsi que leur métabolisme normal. Par conséquent, la mesure de 1,25-(OH)₂-D devient rapidement un outil efficace dans l'étude des maladies et conditions qui affectent le métabolisme normal du phosphore et du calcium.^{7,8,9}

3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

Le dosage DiaSorin 1,25-(OH)₂-D est une procédure en deux temps. Le dosage comporte une extraction préliminaire suivie d'une purification des métabolites de la vitamine D dans le sérum ou le plasma sur EDTA en utilisant des cartouches C₁₈OH.¹⁰ Suite à l'extraction, l'échantillon traité est ensuite dosé par RIA de compétition. La méthode RIA repose sur un anticorps polyclonal spécifique de 1,25-(OH)₂D₂ et 1,25-(OH)₂D₃. L'échantillon, l'anticorps et le traceur sont incubés pendant 2 heures 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. Après centrifugation et décantation, la fraction fixée restant dans le granulé est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. Les valeurs sont calculées directement à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue avec des concentrations connues. La concentration finale de 1,25-(OH)₂D dans les échantillons de sérum et plasma sur EDTA est exprimée en pg/mL.

4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

TAMPON NSB 1,25-(OH) ₂ D	1 tube / 3 mL
ÉTALON 0 1,25-(OH) ₂ D	1 tube / 20 mL
ÉTALON 1-5 1,25-(OH) ₂ D ₃	5 tubes / 3 mL
ANTISÉRUM 1,25-(OH) ₂ D	1 flacon / 35 mL
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 tube / 10 mL
SOLUTION DE PRÉTRAITEMENT 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 flacon / 50 mL
COMPLEXE PRÉCIPITANT GAR 1,25-(OH) ₂ D	2 tubes / 35 mL
SÉRUM DE CONTRÔLE 1,25-(OH) ₂ D	2 tubes / 3 mL
ÉTHANOL 95%	1 tube / 7 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.

Pendant la reconstitution du contenu des tubes, agiter délicatement pour éviter la formation de mousse. Après utilisation, conserver tous les réactifs reconstitués à une température inférieure ou égale à -15°C. Les réactifs de lots différents ne doivent pas être mélangés.

4.1 Tampon NSB 1,25-(OH)₂D : réactif prêt à l'emploi

Tampon de gélatine de phosphate-potassium contenant ProClin® 300 (< 0,2%).

4.2 Étalons 0 1,25-(OH)₂D : Réactif prêt à l'emploi

Tampon phosphate contenant des protéines bovines sériques et ProClin 300 (< 0,2%).

4.3 Étalons (1-5) 1,25-(OH)₂D₃ : Réactif lyophilisé

Cinq étalons lyophilisés (1,25-(OH)₂D₃) à des concentrations comprises entre 5 et 200 pg/mL contenant du sérum humain et ProClin 300 (< 0,2%). Reconstituer chaque étalon avec 3,0 mL d'étalon zéro. Les concentrations exactes apparaissent sur les étiquettes des tubes. Les étalons de la trousse sont calibrés par quantification UV. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons patient lorsqu'ils sont utilisés avec les réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique in vitro, comme recommandé.

4.4 Antisérum 1,25-(OH)₂D : Réactif prêt à l'emploi

Du sérum de lapin anti-1,25-(OH)₂D est dilué dans un tampon de gélatine de phosphate contenant ProClin 300 (<0,2%).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃ Réactif prêt à l'emploi

Analogue radio-iodé 1,25-(OH)₂D₃ dilué dans un tampon d'éthylène glycol-phosphate.

4.6 Solution de prétraitement 1,25-(OH)₂D₃ : Réactif prêt à l'emploi

Tampon potassium-phosphate.

4.7 Contrôles 1,25-(OH)₂D : Niveau 1 (Normal), Niveau 2 (Élevé) : Réactif prêt à l'emploi

Les échantillons de sérum humain analysés, contenant ProClin 300 (<0,2%), dopés avec les quantités appropriées de 1,25-(OH)₂D pour obtenir des concentrations de contrôle comprises dans les intervalles spécifiés. Le Contrôle 1 est compris dans l'intervalle normal et le Contrôle 2 est compris dans un intervalle élevé. 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.

4.8 Complexe précipitant anti-lapin de chèvre (GAR) : Réactif lyophilisé

Sérum de lapin normal, pré-précipité avec du sérum anti-lapin de chèvre et du polyéthylène glycol (PEG), est dilué dans un tampon d'albumine bovine-borate contenant 0,1% d'azide de sodium et d'autres conservateurs (lyophilisés). Reconstituer le tube avec 35 mL d'eau distillée ou déminéralisée ; mélanger soigneusement jusqu'à ce que la suspension apparaisse homogène et laisser reposer pendant 30 minutes minimum à température ambiante ; mélanger de temps en temps.

4.9 Éthanol 95% : Réactif prêt à l'emploi

95% éthanol et 5% eau.

REMARQUE : Les cartouches C₁₈OH sont également requises pour ce dosage.

Commander ces cartouches séparément sous la référence DiaSorin 65101E.

5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

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 et des centres de recherche.

Les analyses doivent être effectuées uniquement par un personnel de laboratoire correctement qualifié et formé.

RÉACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

Traiter comme potentiellement infectieux.

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la U.S.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, de l'hépatite C (HCV), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, 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^{ème} 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. Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel 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'ÉTHANOL

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

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

RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 5,5 μCi (204 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.
- 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 DU SÉRUM ET DU PLASMA

500 µL de sérum ou de plasma sur EDTA sont nécessaires pour l'extraction avec la trousse 1,25-Dihydroxyvitamine D; un volume de 1,5 mL permettra les doublets d'analyse et un volume de pipetage adéquat.

Du sérum ou du plasma humain peut être utilisé dans cette trousse. L'EDTA peut être utilisé 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 en verre à vide de 5 ou 10 mL. Dans le cas du sérum, 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 en 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 -15°C maximum. Ne pas congeler un échantillon qui a été décongelé. Cependant, une étude menée par DiaSorin n'a pas mis en évidence un changement significatif des valeurs après 3 cycles de congélation-décongélation des échantillons. Les échantillons ont été stockés à DiaSorin pendant 6 mois maximum à des températures inférieures ou égales à -15°C et les résultats obtenus n'ont pas été significativement différents.

8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

- 8.1 Cartouches C₁₈OH (24 cartouches) à commander séparément sous la référence DiaSorin 65101E.
- 8.2 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm et 13 x 100 mm.
- 8.3 Portoir de tubes à essai.
- 8.4 Parafilm ou équivalent pour couvrir les tubes à essai.
- 8.5 Râtelier en mousse ou équivalent pour décanter.
- 8.6 Centrifugeuse pour tubes 12 x 75 mm pouvant atteindre 1800 x g*.
- 8.7 Compteur gamma capable de compter ¹²⁵I.
- 8.8 Agitateur-mélangeur vortex.
- 8.9 Pipettes :
 - a. Micropipettes calibrées pour distribuer 75 µL, 300 µL et 500 µL.
 - b. Distributeurs à répétition capables de distribuer 50 µL, 300 µL et 500 µL.
 - c. Pipettes volumétriques pour la reconstitution des étalons, 3,0 mL.
- 8.10 Eau déminéralisée ou distillée.
- 8.11 Solvants organiques :

Les solvants suivants sont requis pour préparer et extraire les échantillons.

Utiliser uniquement des solvants pour CLHP.

$$*g = (1118 \times 10^{-6}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

Ne pas mettre les solvants organiques en contact avec des articles en verre lavés avec un acide ou d'autres milieux acides.

- a. Acétonitrile.
- b. Méthanol.
- c. Hexane. (IMPORTANT: le n-hexane doit avoir un pourcentage supérieur à 95%)
- d. Chlorure de méthylène (ne doit **pas** contenir un alcool comme conservateur).
- e. Isopropanol (2-propanol).

8.12 Appareil recommandé pour les cartouches C₁₈OH :

- a. Station de traitement de l'échantillon Vac Elut. Analyse 24 colonnes par dosage. Peut être commandée chez Analytichem International ou DiaSorin. Pour commander chez DiaSorin, utiliser la référence DiaSorin 11610.

8.13 Produits requis pour sécher les échantillons :

- a. Azote gazeux.
- b. Chambre de séchage avec unité chauffante à 37°C (±2°C) ou un bain d'eau :
N-EVAP ou MULTI-VAP commercialisé par Organomation Associates (Berlin, MA) ou Reacti-Vap II et Reacti-Therm III commercialisé par Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

9. PRÉPARATION DES SOLVANTS ORGANIQUES POUR LA COLONNE D' EXTRACTION

REMARQUE : Les mélanges de solvants organiques doivent être préparés avant de démarrer l'extraction préliminaire.

PRÉCAUTIONS :

Préparer les mélanges de solvants conformément au TABLEAU I ; DiaSorin recommande de préparer un volume de 500 mL. Des volumes supérieurs ou inférieurs peuvent être préparés tant que les proportions restent constantes. Les volumes doivent cependant être suffisamment grands pour minimiser les erreurs de mesure. Pour obtenir des résultats optimaux, mesurer chaque solvant indépendamment.

PRÉCAUTIONS :

Utiliser de l'eau distillée ou déminéralisée quand nécessaire.

TABLEAU I
Préparation du solvant

Mélange des solvants	Produits	1 L	500 mL
70:30	méthanol eau	700 mL 300 mL	350 mL 150 mL
90:10	hexane chlorure de méthylène	900 mL 100 mL	450 mL 50 mL
99:1	hexane IPA	990 mL 10 mL	495 mL 5 mL
92:8	hexane IPA	920 mL 80 mL	460 mL 40 mL

10. EXTRACTION PRÉLIMINAIRE

- 10.1 Reconstituer chaque étalon lyophilisé avec 3,0 mL d'étalon zéro. Bien mélanger les étalons et laisser reposer entre 15 et 20 minutes pour garantir une reconstitution complète. Décongeler complètement les réactifs congelés. Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25°C. Bien mélanger tous les réactifs avant de les utiliser.
- 10.2 Pipeter 500 µL de chaque étalon (0-5), contrôle et échantillon patient dans des tubes en verre borosilicaté et étiquetés de 12 x 75 mm.
- 10.3 Ajouter 500 µL d'acétonitrile dans chaque échantillon ; agiter par intermittence, au moins 3 fois, pendant 10 minutes.
- 10.4 Centrifuger les tubes à 760 x g* pendant 10 minutes entre 20 et 25°C.
- 10.5 Décanter les surnageants dans des tubes à essai étiquetés de 12 x 75 mm ou 13 x 100 mm (selon la préférence) ; éliminer les granulés.
- 10.6 Ajouter 500 µL de solution de prétraitement dans chaque tube et agiter dans le Vortex.
REMARQUE : Cette trousse permet d'effectuer jusqu'à 48 extractions y compris les étalons et contrôles plus 40 inconnus. 24 échantillons peuvent donc être extraits immédiatement sur le VacElut et les 24 échantillons restants peuvent être extraits après. Les extractions sur la colonne doivent être effectuées le plus rapidement possible après l'addition du prétraitement. Cependant, une fois que la colonne est extraite, les échantillons peuvent être stockés pendant 96 heures à des températures inférieures ou égales à -15°C.
- 10.7 Les échantillons sont maintenant prêts à être déposés sur les cartouches C₁₈OH.

11. PROCÉDURE AVEC LA COLONNE

- 11.1 Pour une explication sur le fonctionnement de VAC ELUT, consulter le guide de l'utilisateur VAC ELUT. Assembler la station en suivant les instructions.
- 11.2 Étiqueter un tube en verre borosilicaté de 13 x 100 mm pour chaque étalon (0-5), contrôle et échantillon inconnu. Mettre ces tubes dans le VAC ELUT. Vérifier que le couvercle du VAC ELUT est en position "DÉCHETS" et que les tubes sont placés correctement pour récupérer les éluats souhaités. Mettre les cartouches C₁₈OH sur le couvercle du VAC ELUT.
- 11.3 Ajouter les mélanges de solvants dans la cartouche indiquée conformément au TABLEAU II.

IMPORTANT :

Utilisation du vide :

Mettre le vide après chaque addition de solvant et laisser le mélange de solvants couler **complètement** à travers la cartouche avant d'utiliser le solvant suivant. Mettre le vide et fermer le vide aux étapes recommandées dans le TABLEAU II (Si on préfère, le vide peut être mis ou fermé entre chaque addition de solvant). Le vide doit avoir une pression inférieure ou égale à 254 mm de Hg. Éluer chaque mélange de solvants à travers la sortie "DÉCHETS" et dans les récipient à déchets appropriés jusqu'à l'étape finale de récupération.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

Application à l'échantillon :

Les échantillons peuvent être décantés directement sur la cartouche ou déposés avec une pipette.

Ne pas laisser la cartouche sécher à l'air pendant plus de 5 minutes entre les applications.

Prétraitement de la cartouche C₁₈OH :

Les cartouches C₁₈OH doivent être lavées avec 5 mL de 90:10 (hexane : chlorure de méthylène), 5 mL d'IPA et 5 mL d'éthanol avant leur première utilisation. Le mélange de solvants 90:10 (hexane : chlorure de méthylène) peut être préparé en mesurant 900 mL d'hexane et 100 mL de chlorure de méthylène. Mettre les cartouches neuves sur le VAC ELUT, en position "DÉCHETS", et ajouter 5 mL de 90:10 (hexane : chlorure de méthylène) suivis de 5 mL d'IPA sur chaque colonne puis 5 mL de méthanol. Laisser chaque mélange de solvants traverser complètement les cartouches avant d'utiliser le mélange suivant. Après cette préparation initiale, il ne sera pas nécessaire de répéter cette étape puisque les cartouches seront régénérées pendant l'extraction.

REMARQUE : Dans le cas d'extraction d'échantillons supplémentaires (plus de 24), régénérer les cartouches en utilisant la même procédure décrite dans le TABLEAU II. Les cartouches peuvent être utilisées jusqu'à 30 fois.

REMARQUE : Le produit dans les cartouches C₁₈OH est maintenu en place à l'aide d'une composition de fibres poreuses. Éliminer les cartouches avec des compositions déplacées ou manquantes car du produit C₁₈OH peut avoir été perdu.

TABLEAU II

Description et analyse de l'extraction	Étapes de l'extraction	Manipulation de l'éluant
<p>Préparation/Régénération de la colonne Élimine : les substances interférentes provenant de son utilisation précédente (étape 1)</p>	<p>1. Ajouter 1 mL de méthanol, mettre le vide. 2. Fermer le vide.</p>	Éliminer "DÉCHETS"
<p>Application à l'échantillon</p>	<p>3. Déposer tous les échantillons, mettre le vide. voir la procédure d'extraction préliminaire (étape 10).</p>	Éliminer "DÉCHETS"
<p>Purification/Élimination des métabolites de la vitamine D</p> <p>Élimine : Les lipides polaires interférents, sels et pigments (étape 4)</p> <p>25(OH)D (Étape 5)</p> <p>25(OH)D et 24,25(OH)₂D/25,26(OH)₂D restants (étape 6)</p>	<p>4. Ajouter 5 mL de 70:30 Méthanol/Eau (deminéralisée ou distillée). 5. Ajouter 5 mL de 90:10 Hexane/Chlorure de méthylène. 6. Ajouter 5 mL de 99:1 Hexane/ Isopropanol. 7. Fermer le vide.</p>	Éliminer "DÉCHETS"
<p>Récupération du 1,25-(OH)₂D</p> <p>Élution du 1,25-(OH)₂D purifié (étape 9)</p>	<p>IMPORTANT!</p> <p>8. Mettre le Vac Elut en position "Récupération :" 9. Ajouter 3 mL de 92:8 Hexane/Isopropanol, mettre le vide. 10. Fermer le vide.</p>	"RÉCUPÉRATION"

12. SÉCHAGE ET RECONSTITUTION DES ÉLUATS

- 12.1** Placer les tubes échantillons contenant les éluats dans une unité chauffante ou bain d'eau à 37°C (±2°C) pour les sécher.
- 12.1** Sécher les éluats sous une hotte avec de l'azote gazeux à 2-4 psi (durée de séchage 20-30 minutes).
- 12.3** Enlever les tubes dès que l'éluat est sec.
- 12.4** Reconstituer chaque extrait sec avec 50 µL d'éthanol 95%; agiter délicatement dans le vortex en utilisant une vitesse lente à moyenne. Ajouter 125 µL de traceur dans les mêmes tubes contenant 50 µL d'éthanol 95%, agiter délicatement dans le vortex en utilisant une vitesse lente à moyenne. **REMARQUE :** Les étapes d'agitation sont très importantes car elles permettent de garantir la bonne reconstitution de l'échantillon ainsi qu'une bonne précision. **ATTENTION:** Limiter l'agitation à la portion inférieure du tube pour éviter de perdre de l'échantillon et permettre le pipetage suffisant du volume pour le dosage. Étiqueter un tube supplémentaire pour la numération totale et un tube pour NSB. Ajouter 50 µL d'éthanol 95% et 125 µL de traceur dans les deux tubes. Ils vont être utilisés pour créer les tubes de NT (numération totale) et NSB en doublets pour le dosage.

- 12.5 Effectuer le dosage immédiatement après la reconstitution des échantillons. Pour obtenir des résultats optimaux lors des dosages plus grands, reconstituer 12 - 15 échantillons à la fois puis pipeter pour le dosage avant de reconstituer les 12 - 15 échantillons suivants.

13. PROCÉDURE DE DOSAGE

- 13.1 Installer des tubes en verre borosilicaté jetables de 12 x 75 mm étiquetés en doublets pour chaque étalon (0-5), contrôle et échantillon selon le profil de dosage. Ajouter lentement 75 µL d'étalon reconstitué, du contrôle et des extraits échantillons dans les tubes de dosage en doublets.
ATTENTION Faire attention à cette étape car il n'y a que 25 µL de solution en excès dans chaque tube.
- 13.2 Se référer à l'étape numéro 4 "Séchage et reconstitution des éluats". Ajouter 75 µL du tube de NT (Numération totale) dans les tubes de dosage en doublets. Répéter cette étape avec les tubes de dosage NSB en doublets.
- 13.3 Ajouter 300 µL de tampon NSB dans les tubes NSB.
- 13.4 Ajouter 300 µL d'anticorps primaire dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale et NSB.
- 13.5 Bien mélanger ; incuber pendant 2 heures (± 15 minutes) entre 20 et 25°C.
REMARQUE : Reconstituer le complexe précipitant GAR avec 35 mL d'eau distillée ou déminéralisée, bien mélanger jusqu'à ce que la suspension apparaissent homogène puis laisser reposer pendant 30 minutes minimum avant de l'utiliser à température ambiante. Mélanger de temps en temps avant et pendant l'utilisation.
- 13.6 Ajouter 500 µL de complexe précipitant GAR bien mélangé dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale. Incuber pendant 20 minutes (± 5 minutes) entre 20 et 25°C.
- 13.7 Centrifuger tous les tubes pendant 20 minutes entre 20 et 25°C à 1800 x g*, à l'exception des tubes de numération totale.
- 13.8 Décanter 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 appropriés. 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.
- 13.9 Mesurer la radioactivité en procédant à la numération de chaque tube pendant 1 minute dans un compteur gamma. Les tubes doivent être comptés pendant au moins 1 minute (voir la section : Limitations de la procédure).

14. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

- 14.1 Ajouter chaque aliquote de réactif au tiers inférieur du tube de dosage pour garantir le mélange complet des réactifs.
- 14.2 Les proportions correctes de solvant doivent être respectées pour obtenir des bons taux de récupération. Préparer les solutions dans des volumes suffisamment larges pour minimiser l'erreur de mesure.
- 14.3 Si un échantillon est supérieur à l'étalon le plus élevé, il doit être dilué avec l'étalon zéro de la trousse et dosé de nouveau avant l'extraction. Les résultats doivent être multipliés par le facteur de dilution approprié. Par exemple, mélanger 500 µL d'échantillon avec 500 µL d'étalon zéro, puis doser 500 µL de cet échantillon dilué conformément à la notice d'utilisation du produit.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

- 14.4** Aucun écart de dosage n'a été observé pendant la durée moyenne de dosage de 100 tubes.
- 14.5** Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, le laboratoire peut parfois vérifier d'autres facteurs. 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) des tubes de l'étalon 0/CPM moyenne des tubes de numération totale.
 - c. Liaison non spécifique**
CPM moyenne des tubes NSB/CPM moyenne des tubes de numération totale.
 - d. Pente de la courbe d'étalonnage**
On peut suivre l'inhibition de 50%.

15. CONTRÔLE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit inclure au moins deux contrôles (un contrôle au niveau normal et un au niveau élevé) à chaque dosage pour surveiller la précision de la trousse. Des contrôles disponibles dans le commerce ou les 2 contrôles de référence fournis avec la trousse peuvent être utilisés.

Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus et dosés en doublets. Le laboratoire doit tenir à jour des tableaux de contrôle qualité pour suivre la précision des contrôles. Les limites acceptables de précision doivent être déterminées par chaque laboratoire pour chaque niveau de contrôle en utilisant 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.^{12,13,14}

16. 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. Le laboratoire de contrôle qualité DiaSorin utilise la méthode de calcul avec programme d'ajustement de spline cubique (Spline Smoothed curve fit) % B/B₀ par rapport à la concentration logarithmique .

16.1 Calcul du pourcentage B/B₀

- a.** Calculer la CPM moyenne pour chaque étalon, contrôle et échantillon inconnu.
- b.** Soustraire la CPM moyenne des tubes NSB de toutes les numérations.
- c.** Diviser la CPM moyenne corrigée de chaque étalon, contrôle ou échantillon inconnu par la CPM moyenne corrigée de l'étalon 0 et multiplier par 100.

$$\frac{\text{CPM moyenne (Étalon ou échantillon inconnu)} - \text{moyenne CPM (NSB)}}{\text{moyenne CPM (Étalon 0)} - \text{moyenne CPM (NSB)}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

16.2 Utiliser le tracé de la courbe d'étalonnage

- a. En utilisant du papier semi-logarithmique ou logarithmique à 2 cycles, tracer le pourcentage B/B₀ (%) pour les étalons 1,25 (OH)₂D portés en ordonnée (axe Y) par rapport à la concentration des étalons portée en abscisse (axe X).

REMARQUE : Des programmes de réduction automatique des données peuvent également être utilisés pour l'analyse des données. DiaSorin utilise Multi-Calc (Pharmacia) avec programme d'ajustement *LIN-LOG* de spline cubique. D'autres méthodes de réduction des données doivent être validées avant de les incorporer pour une utilisation régulière.

- b. Tracer la droite de meilleur ajustement d'un point à l'autre.
- c. Interpoler les niveaux de 1,25-(OH)₂D dans les échantillons inconnus en utilisant la courbe d'étalonnage.
- d. Si un échantillon inconnu a été dilué, corriger en fonction du facteur de dilution approprié.
- e. L'intervalle de dosage est compris entre 5,0 pg/mL et 200 pg/mL. Toute valeur qui est inférieure à l'étalon le plus faible, 5,0 pg/mL, a été extrapolée et peut être notée comme "inférieure à 5 pg/mL".
- f. Calculer la liaison maximale en divisant la CPM de l'étalon 0 par les numérations totales moyennes obtenues dans les tubes de numération totale.

Des données d'échantillon typiques pour RIA 1,25-(OH)₂D sont rassemblées dans le TABLEAU IV et à la FIGURE 1 ; ces informations sont données à titre de référence seulement et ne doivent pas être utilisées pour le calcul d'une valeur quelconque.

TABLEAU IV
Données d'échantillon RIA 1,25-(OH)₂D DiaSorin

Tube	Doublet CPM	Moyenne CPM	Corrigé CPM	Pourcentage Liaison (B/T)	Pourcentage (B/B ₀)	Conc. (pg/mL)
Numération totale	40.792 40.578	40.685				
NSB	1.438 1.439	1.439		3,5		
Étalon 0	18.006 18.119	18.063	16.624	44,4	100,0	
Étalons (pg/mL)						
1 (5,0)	16.710 16.770	16.740	15.302		92,0	
2 (15,0)	14.941 14.916	14.929	13.490		81,2	
3 (30,0)	13.087 13.124	13.106	11.667		70,2	
4 (75,0)	9.820 9.765	9.793	8.354		50,2	
5 (200)	6.412 6.464	6.438	5.000		30,0	
Contrôles						
Niveau 1: valeurs normales	13.275 13.530	13.403	11.964		72,0	27,3
Niveau 2: valeurs élevées:	8.206 8.124	8.165	6.727		40,5	119

Courbe d'étalonnage pour l'échantillon RIA 1,25-(OH)₂D DiaSorin

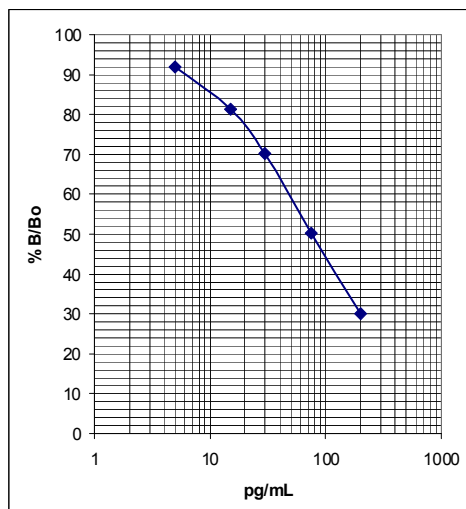


FIGURE 1

RÉDUCTION DES DONNÉES

Le laboratoire QC DiaSorin utilise un programme d'ajustement de spline cubique.

17. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

- 17.1 Les temps de numération doivent être suffisamment long pour empêcher les erreurs dues à l'inefficacité du compteur (par exemple, 2000 CPM comporteront 5% d'erreur et 10000 CPM 1% d'erreur).
- 17.2 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.
- 17.3 Les caractéristiques de précision de ce dosage n'ont pas été établies chez l'enfant.

18. VALEURS ESCOMPTÉES

Intervalle de référence pour des donneurs normaux

Il est important que chaque laboratoire établisse son propre intervalle de référence représentatif de sa population typique. Cependant, les valeurs de 1,25-(OH)₂D ont été obtenues au cours d'un essai clinique qui s'est déroulé pendant l'été et l'automne, et qui comptait 123 volontaires apparemment en bonne santé provenant de trois villes du Midwest des États-Unis. Ces 123 donneurs sains, 37 hommes et 86 femmes, étaient d'origine ethnique variée et âgés de 21 à 68 ans. La valeur moyenne de 1,25-(OH)₂D pour l'échantillon complet (n=123) était de 43,9 pg/mL. L'intervalle de référence de 95% estimé par une méthode non-paramétrique (conformément aux directives CLSI C28-A2¹⁵) était compris entre 25,1 et 66,1 pg/mL.

Patients souffrant d'une maladie rénale terminale

Un essai clinique a été mené pour évaluer les taux de 1,25-(OH)₂D chez des adultes diagnostiqués avec une maladie rénale terminale. Un total de 87 volontaires remplissant ces conditions (49 hommes, 38 femmes, âgés entre 19 et 84 ans) issus de trois villes du Midwest aux États-Unis ont été inclus dans l'étude. Les valeurs de 1,25-(OH)₂D pour cet échantillon (n=87) étaient comprises entre 1,6 et 17,3 pg/mL. La limite de référence de 95% supérieure estimée l'aide de la procédure non-paramétrique est de 14,2 pg/mL.

19. CRITERES DE QUALITE

19.1 Précision

La précision du dosage a été évalué par DiaSorin en se basant sur les principes de la directive CLSI (EP5-A).¹⁶ Trois niveaux de contrôle contenant du sérum humain avec des concentrations de 1,25-(OH)₂-D choisies dans tout l'intervalle de dosage ont été analysés sur 25 jours, ce qui représente une période de plus de 60 jours. Plusieurs techniciens et des numéros de lots multiples ont été inclus pour tous les éléments. Les résultats combinés ont été évalués par l'analyse de la variance (ANOVA) et sont rassemblés dans le tableau suivant.

Échantillon	N	Intra-essai		D'un jour à l'autre		Total		
		Moyenne pg/mL	Ecart- type	%CV	Ecart- type	%CV	Ecart- type	%CV
FAIBLE	25	25,8	1,76	6,8	3,8	14,6	4,0	15,3
MOYENNE	25	41,3	3,16	7,7	4,6	11,1	5,1	12,3
ÉLEVÉ	25	105,2	11,86	11,3	11,8	11,2	14,4	13,7

19.2 PURETÉ : LA PURETÉ DU DOSAGE A ÉTÉ VÉRIFIÉE PAR LE TEST DE LINÉARITÉ ET DE RÉCUPÉRATION.

Linéarité (parallélisme)

La linéarité de la dilution a été évaluée par DiaSorin conformément aux recommandations de la directive CLSI EP6-P.¹⁷ Trois échantillons de sérum humain ont été préparés en effectuant des dilutions successives avec l'étalon zéro et des aliquotes congelés individuellement à -20°C. Chaque échantillon et dilution a été dosé plusieurs fois à trois dates de dosage différentes. Les valeurs escomptées ont été déterminées en multipliant les valeurs non-diluées de chaque échantillon par le facteur de dilution. Les données sont rassemblées ci-dessous et les résultats ont permis de tracer la courbe de régression linéaire des valeurs escomptées par rapport à la valeur observée.

Échantillon #	Dilution	Valeur Escomptée (pg/mL) (N=10)	Valeur Observée Moyenne (pg/mL) (N=10)
1	PUR	49,6	49,6
	1:2	24,8	25,3
	1:4	12,4	11,1
	1:8	6,2	4,4
2	PUR	50,2	50,2
	1:2	25,1	24,2
	1:4	12,6	12,2
	1:8	6,3	4,6
3	PUR	62,0	62,0
	1:2	31	31,9
	1:4	15,5	13,4
	1:8	7,8	6,2

RÉCUPÉRATION

On a évalué le taux de récupération quantitatif de tout l'analyte présent dans les échantillons cliniques obtenu avec ce dosage en ajoutant des quantités différentes d'antigène pur fraîchement préparé de 1,25-(OH)₂-D aux trois échantillons patients. Trois concentrations ont été choisies et dosées en doublets pour déterminer le pourcentage de récupération. La moyenne de récupération (%) obtenue par cette méthode était de 101%.

Échantillon #	Conc. init. (pg/mL) 1,0 mL	Quantité de dopage (pg)	*Escomptée (pg/mL)	Observée (pg/mL)	% Récupération
1	30,8	50,0	77,7	75,6	97
		62,5	88,9	87,2	98
		75,0	99,8	103	103
2	42,8	50,0	89,2	89,5	100
		62,5	100,3	98,9	99
		75,0	111,0	118	106
3	40,3	50,0	86,8	83,9	97
		62,5	97,9	103	105
		75,0	108,8	118	108

*Le calcul de la concentration attendue inclut un facteur de dilution introduit en dopant la solution.

19.3 Sensibilité analytique

La sensibilité de ce dosage lorsqu'elle est définie comme la quantité la plus faible différente de zéro à 2 écarts-types en-dessous de la cpm moyenne de l'étalon zéro (n=20), s'est avérée ≤ 2.0 pg/mL.

19.4 Spécificité analytique

Les données de réactivité croisée de l'antisérum utilisé dans cette trousse sont exprimées comme la concentration de 1,25-(OH)₂D₃ rapportée à la réaction croisée de concentration de substance avec inhibition de 50 % de la liaison maximale.

Conc.	mesurée à 50% B/Bo	% Réactivité croisée
24,25 D ₃	76 420 pg/mL	<0,5
25,26 D ₃	24 330 pg/mL	<0,5
25 D ₃	>>>1 mg/mL	<0,5

19.5 Substances interférentes

Une étude de l'interférence a été faite pour déterminer si des taux élevés de substances endogènes courantes pouvaient avoir un effet négatif sur les résultats du dosage. L'évaluation était conforme aux directives CLSI (EP7-P).¹⁸ Trois échantillons de sérum humain contenant des taux faibles, moyens et élevés de 1,25-(OH)₂-D₃ ont été dosés après addition de la substance analysée ou addition des contrôles dopés avec des volumes identiques du véhicule de la substance dosée. Chaque échantillon a été extrait deux fois ce qui a donné quatre résultats. Les résultats rassemblés ci-dessous montrent

l'absence d'interférence avec les substances dosées, après l'analyse statistique par ANOVA (intervalle de confiance de 95%), ou par la valeur moyenne des échantillons dopés dépassant les intervalles des contrôles avec ± 2 écarts-types.

Bilirubine

Échantillon #	Moyenne du contrôle (pg/mL)	intervalle \pm 2 écarts types du contrôle	Moyenne de bilirubine (pg/mL)	Interférence ANOVA
Faible	19,9	18,5-21,3	19,5	0,54
Moyen	31,7	27,7-35,7	29,9	0,22
Élevé	79,7	63,5-95,9	83,2	0,45

Cholestérol

Échantillon #	Moyenne du contrôle (pg/mL)	intervalle \pm 2 écarts types du contrôle	Moyenne de cholestérol (pg/mL)	Interférence ANOVA
Faible	19,9	18,5-21,3	19,4	0,64
Moyen	31,7	27,7-35,7	29,7	0,15
Élevé	79,7	63,5-95,9	75,2	0,40

Triglycéride

Échantillon #	Moyenne du contrôle (pg/mL)	intervalle \pm 2 écarts types du contrôle	Moyenne de triglycéride (pg/mL)	Interférence ANOVA
Faible	14,7	12,9-16,5	15,1	0,88
Moyen	30,4	22,4-38,4	33,4	0,25
Élevé	92,6	69,5-116,9	95,4	0,68

Hémoglobine

Échantillon #	Moyenne du contrôle (pg/mL)	intervalle \pm 2 écarts types du contrôle	Moyenne de l'hémoglobine (pg/mL)	Interférence ANOVA
Faible	21,5	17,5-25,5	20,8	0,53
Moyen	38,6	35,4-41,8	40,0	0,43
Élevé	112,7	101,4-124,0	120,6	0,17

Urée

Échantillon #	Moyenne du contrôle (pg/mL)	intervalle \pm 2 écarts types du contrôle	Moyenne de l'urée (pg/mL)	Interférence ANOVA
Faible	25,1	20,9-29,3	26,6	0,39
Moyen	36,2	23,8-48,6	35,9	0,96
Élevé	120,1	97,4-142,8	118,6	0,82

VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR RÉFÉRENCE

PROCÉDURE DE DOSAGE

1. Les étalons, contrôles et inconnus sont tous reconstitués avec de l'éthanol 95% et du traceur après l'étape de séchage de la procédure avec la colonne.
2. Distribuer les réactifs conformément au profil :

Tubes/réactifs	Numérations totales	NSB	Étalon 0-5	Contrôles et échantillons inconnus
Étalons reconstitués	-	-	75 µL	-
Contrôles et échantillons inconnus reconstitués	-	-	-	75 µL
Éthanol 95% et traceur **	75 µL	75 µL	-	-
Tampon NSB	-	300 µL	-	-
Antisérum 1,25-(OH) ₂ -D	-	-	300 µL	300 µL

REMARQUE : Les tubes de numération totale et NSB sont obtenus en ajoutant 50 µL d'éthanol 95% avec 125 µL de traceur et en pipetant 75 µL de ce mélange dans les tubes de dosage en doublets.

3. Bien mélanger ; incuber pendant 2 heures (+/- 15 minutes) entre 20 et 25°C.
4. Distribuer 500 µL de réactif précipitant GAR dans les puits, à l'exception des tubes de numération totale.
5. Bien mélanger ; incuber pendant 20 minutes (+/- 5 minutes) entre 20 et 25°C.
6. Centrifuger à 1 800 x g* pendant 20 minutes entre 20 et 25°C.
7. Décanter les surnageants.
8. Procéder à la numération de chaque tube dans un compteur gamma pendant 1 minute.

$$*g = (1118 \times 10^{-8}) (\text{rayon en cm}) (\text{tr/min})^2$$

1,25-DIHYDROXYVITAMIN D ¹²⁵I RIA-KIT

1. VERWENDUNGSZWECK

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Der 1,25-Dihydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA ist ein kompetitiver Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂-D) in Humanserum oder EDTA-Plasma für die Beurteilung des mit Nierenerkrankungen assoziierten 1,25-(OH)₂-D-Mangels. Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen und labordiagnostischen Daten verwendet werden, um den Arzt dabei zu unterstützen, bei Erwachsenenpopulationen individuelle Patientenmanagement-Entscheidungen zu treffen.

2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Vitamin D entsteht aus zwei Quellen: Es wird exogen durch die Nahrung zugeführt und endogen aufgebaut (durch UV-Licht-Exposition regulierte Biosynthese). Zur exogenen Quelle gehören Nahrungsmittel mit einem natürlich niedrigen Vitamin D₂-Gehalt (z. B. Milch, Butter, mit Vitamin D₂ angereichertes Getreide), Nahrungsergänzungsmittel in Form von frei verkäuflichen Vitaminen und therapeutische Rezepturen von D₂-Vitaminen.¹ Vitamin D ist nicht inhärent aktiv, wenn es über die Nahrung oder über photochemische Prozesse in den Kreislauf gelangt. Es wird erst nach mehreren komplexen Stoffwechselschritten biologisch aktiv.²

Es ist bekannt, dass die metabolische Aktivierung von Vitamin D ein komplizierter, kontrollierter Prozess ist, der durch verschiedene Faktoren beeinflusst wird, wie z. B. durch Nahrungscalcium und -phosphor, den Grad des Vitamin-D-Mangels, genetische Mängel, Parathormon-Konzentrationen, die Einwirkung von UV-Licht und den Grad der Nierenfunktion.³ Die Biosynthese der dihydroxylierten Formen von Vitamin D₃ beginnt damit, dass in der Haut unter Einwirkung von ultraviolettem Sonnenlicht aus 7-Dehydrocholesterin Vitamin D₃ gebildet wird. Sobald Vitamin D₃ in den Kreislauf eintritt, wird es schnell von der Leber aufgenommen und dort zu 25-Hydroxyvitamin D₃ (25-OH-D₃) metabolisiert. In der Leber wird auch Vitamin D₂ in 25-Hydroxyvitamin D₂ (25-OH-D₂) hydroxyliert.^{2,4}

Nach der Hydroxylierung in der Leber wird 25-OH-D mit dem Vitamin-D-bindenden Protein zur Niere transportiert, wo es weiter hydroxyliert wird. Durch Hinzufügen einer Hydroxylgruppe an Position 1 entsteht 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂-D). 1,25-Dihydroxyvitamin D ist der stärkste, natürlich vorkommende Vitamin-D-Metabolit, der bisher entdeckt wurde. Seine Produktion wird durch die Serumkonzentrationen von Calcium, Phosphor und Parathormon streng kontrolliert. Bei Calciumstress ist 1,25-(OH)₂-D der wichtigste Vitamin-D-Metabolit, der in der Niere gebildet wird.^{5,6}

Dies ist auf seine wichtige Rolle bei der aktiven Absorption von Calcium und Phosphor sowie ihrem normalen Stoffwechsel zurückzuführen. Die Messung von 1,25-(OH)₂-D hat sich daher als effizientes Mittel in der Erforschung von Erkrankungen herausgestellt, die den normalen Phosphor- und Calciumstoffwechsel beeinträchtigen.^{7,8,9}

3. TESTPRINZIP

Der DiaSorin 1,25-(OH)₂-D Test wird in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst werden Vitamin-D-Metaboliten aus Serum oder EDTA-Plasma mit Hilfe von C₁₈OH-Kartuschen extrahiert und anschließend gereinigt.¹⁰ Nach der Extraktion wird die vorbehandelte Probe in einem kompetitiven Radioimmunoassay untersucht. Der Radioimmunoassay basiert auf einem polyklonalen Antikörper, der sowohl für 1,25-(OH)₂ D₂ als auch 1,25-(OH)₂ D₃ spezifisch ist. Die Probe, der Antikörper und der Tracer werden 2 Stunden lang bei 20-25°C inkubiert. Die Phasentrennung erfolgt nach 20-minütiger Inkubation bei 20-25°C mit einem zweiten präzipitierenden Antikörperkomplex. Nach der Zentrifugation und Dekantierung wird die gebundene Fraktion im Pellet in einem Gammazähler gemessen.

Die Werte werden direkt aus einer Eichkurve bekannter Konzentrationen berechnet. Die Endkonzentration des 1,25-(OH)₂D in Serum- und EDTA-Plasmaproben wird in pg/mL ausgedrückt.

4. KITREAGENZIEN

1,25-(OH) ₂ D NSB-PUFFER	1 Fläschchen / 3 mL
1,25-(OH) ₂ D NULLKALIBRATOR	1 Fläschchen / 20 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ KALIBRATOR 1-5	5 Fläschchen / 3 mL
1,25-(OH) ₂ D ANTISERUM	1 Flasche / 35 mL
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 Fläschchen / 10 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ VORBEHANDLUNGSLÖSUNG	1 Flasche / 50 mL
1,25-(OH) ₂ D PRÄZIPITIERENDER ZIEGE- ANTI-KANINCHEN-KOMPLEX	2 Fläschchen / 35 mL
1,25-(OH) ₂ D KONTROLLSERUM	2 Fläschchen / 3 mL
95%iges ETHANOL	1 Fläschchen / 7 mL
Anzahl der Tests	100

LAGERUNG: Der 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.

Bei der Rekonstitution den Inhalt der Fläschchen vorsichtig mischen, um Schaumbildung zu vermeiden. Alle rekonstituierten Reagenzien sofort nach Gebrauch bei -15°C oder darunter lagern. Reagenzien aus verschiedenen Chargen dürfen nicht vermischt werden.

4.1 1,25-(OH)₂D NSB-Puffer: gebrauchsfertiges Reagenz

Kaliumphosphatgelatinepuffer mit ProClin® 300 (< 0,2 %).

4.2 1,25-(OH)₂D Nullkalibrator: gebrauchsfertiges Reagenz

Phosphatpuffer mit Rinderserumproteinen und ProClin 300 (< 0,2 %).

4.3 1,25-(OH)₂D₃ Kalibratoren (1-5): lyophilisiertes Reagenz

Fünf lyophilisierte (1,25-(OH)₂D₃) Kalibratoren in Konzentrationen zwischen 5 und 200 pg/mL mit Humanserum und ProClin 300 (<0,2%). Jeden Kalibrator mit 3,0 mL des Nullkalibrators rekonstituieren. Die genauen Konzentrationen sind auf den Fläschchenetiketten angegeben. Die Kalibratoren des Kits werden mittels UV-Bestimmung kalibriert. Die Kitkalibratoren sind mit Patientenproben austauschbar, wenn sie mit Reagenzien verwendet werden und dieser diagnostische In-vitro-Test wie empfohlen durchgeführt wird.

4.4 1,25-(OH)₂D Antiserum: gebrauchsfertiges Reagenz

Kaninchen-anti-1,25-(OH)₂D-Serum, verdünnt in Phosphatgelatinepuffer mit ProClin 300 (<0,2%).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃ gebrauchsfertiges Reagenz

Radiodiertes 1,25-(OH)₂D₃-Analogon, verdünnt in einem Ethylglykolphosphatpuffer.

4.6 1,25-(OH)₂D₃ Vorbehandlungslösung: gebrauchsfertiges Reagenz

Kaliumphosphatpuffer.

4.7 1,25-(OH)₂D Kontrollen: Konzentration 1 (normal), Konzentration 2 (hoch): gebrauchsfertiges Reagenz

Vorbehandelter Humanserum-Pool mit ProClin 300 (<0,2%), versetzt mit den entsprechenden Mengen 1,25-(OH)₂D, um Kontrollkonzentrationen innerhalb der angegebenen Bereiche zu erhalten. Kontrolle 1 liegt innerhalb des Normalbereichs,

Kontrolle 2 innerhalb eines erhöhten Bereichs. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können.

4.8 Präzipitierender Ziege-anti-Kaninchen (GAR)-Komplex: lyophilisiertes Reagenz Normales Kaninchenserum, vor-präzipitiert mit Ziege-anti-Kaninchenserum und Polyethylenglykol (PEG), wird in einem BSA-Boratpuffer mit 0,1% Natriumazid und anderen zugefügten (lyophilisierten) Konservierungsmitteln verdünnt. Das Fläschchen mit 35 ml destilliertem oder entionisiertem Wasser rekonstituieren, bis die Suspension homogen aussieht, dann bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten lang stehen lassen und gelegentlich mischen.

4.9 95 % Ethanol: gebrauchsfertiges Reagenz
95% Ethanol und 5% Wasser.

HINWEIS: Für dieses Verfahren werden ebenfalls C₁₈OH-Kartuschen benötigt. Diese Kartuschen müssen gesondert unter der DiaSorin Kat. Nr. 65101E bestellt werden.

5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

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

REAGENZEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS

Dieses Produkt ist als potenzieller Infektionserreger zu behandeln.

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden 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 Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken mit den geeigneten Vorsichtsmaßnahmen zu handhaben, wie im Handbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren) (4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage) der Centers for Disease Control and Prevention und der National Institutes of Health (amerikanische Krankheitsforschungszentren / Staatliche Gesundheitsinstitute) beschrieben.

REAGENZEN MIT NATRIUMAZID

VORSICHT: Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid, das gegebenenfalls mit Blei- oder Kupferleitungen reagieren und höchst explosive Metallazide bilden kann. Zur Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen, um Azidaufbau zu vermeiden. Weitere Informationen finden Sie im Abschnitt "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" (Dekontaminierung von Abflüssen in Laborspülbecken zur Entsorgung von Azidsalzen) des Handbuchs "Safety Management" (Sicherheitsmaßnahmen), Nr. CDC-22, herausgegeben von den Centers for Disease Control and Prevention (US-Krankheitsforschungszentren), Atlanta, Bundesstaat Georgia, 1976.

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

R 20/21/22 - Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.

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

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

ETHANOL ENTHALTENDE REAGENZIEN

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

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 5,5 µCi (204 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 MÖGLICHEN VERFALL DER KITREAGENZIE

- 6.1 Das Vorhandensein abnormer Partikel in einem der Reagenzien.
- 6.2 Eine Veränderung der Steigung oder des Verlaufs der Eichkurve im Vergleich zu den gewöhnlich erzielten Ergebnissen.
- 6.3 Eine Abnahme der maximalen Bindung
- 6.4 Eine hohe nichtspezifische Bindung

7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG VON SERUM UND PLASMA

Beim 1,25-Dihydroxyvitamin D-Kit werden für die Extraktion 500 µL Serum oder EDTA-Plasma benötigt; 1,5 mL ermöglichen Wiederholungsanalysen und stellen zudem ein adäquates Pipettiervolumen dar.

In diesem Kit kann humanes Serum oder Plasma verwendet werden. Bei diesem Test kann das Antikoagulans EDTA verwendet werden. Nüchternproben werden empfohlen, sie sind jedoch nicht erforderlich. Blut unter aseptischen Bedingungen durch Venenpunktion in ein 5- oder 10-mL-Glasröhrchen aufnehmen. Bei Serumproben Blut bei Raumtemperatur (15-25°C) gerinnen lassen. Zur Gewinnung von hämolysefreiem Serum Blutproben 15 Minuten lang mit ca. 760 x g* zentrifugieren. Zur Aufrechterhaltung der Probenreinheit sind weder Zusatzstoffe noch Konservierungsmittel erforderlich. Alle mit der Probe in Kontakt gekommenen Kunststoffbehälter, Glasbehälter oder anderen Materialien sind von jeder Verunreinigung freizuhalten.

Serum- oder Plasmaproben bei -15°C oder darunter lagern. Die Proben dürfen nicht wiederholt eingefroren und wieder aufgetaut werden. In einer von DiaSorin durchgeführten Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass sich die Werte nach dreimaligem Einfrieren und Auftauen der Proben nicht signifikant geändert haben. Die Proben wurden bei DiaSorin bis zu sechs Monate lang bei -15°C oder darunter gelagert, ohne dass sich die Ergebnisse signifikant geändert haben.

8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

- 8.1 C₁₈OH-Kartuschen (24 Kartuschen), gesondert zu bestellen unter DiaSorin Kat. Nr. 65101E
- 8.2 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 x 75 mm und 13 x 100 mm
- 8.3 Röhrchenständer
- 8.4 Parafilm oder gleichwertige Abdeckung für Teströhrchen
- 8.5 Schaumstoffständer zum Dekantieren oder Gleichwertiges
- 8.6 Zentrifuge für 12 x 75 mm Röhrchen (1800 x g*)
- 8.7 Gammazähler zur Messung von ¹²⁵I.
- 8.8 Vibrationsmischer (Vortex)
- 8.9 Pipettiergeräte:
 - a. Mikropipetten zur Abgabe von 75 µL, 300 µL und 500 µL
 - b. Multipipetten zur Abgabe von 50 µL, 300 µL und 500 µL
 - c. Messpipetten zur Rekonstitution von Kalibratoren, 3,0 mL
- 8.10 Destilliertes oder entionisiertes Wasser

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

- 8.11** Organische Lösungsmittel:
Die folgenden Lösungsmittel werden für die Probenvorbereitung und -extraktion benötigt.
Nur HPLC-Lösungsmittel verwenden.
Die organischen Lösungsmittel dürfen nicht mit säuregewaschenen Glasbehältern oder anderen säurehaltigen Mitteln in Kontakt kommen.
- Acetonitril
 - Methanol
 - Hexan (WICHTIG: Der Anteil von Hexan muss mehr als 95 % betragen.)
 - Methylenchlorid (darf **nicht** Alkohol als Konservierungsmittel enthalten)
 - Isopropanol (2-Propanol)
- 8.12** Empfohlenes Gerät für die C₁₈OH-Kartuschen:
- Vac Elut Probenverarbeitungsstation. Verarbeitet 24 Säulen pro Serie. Erhältlich bei Analytichem International oder DiaSorin. Bestellung bei DiaSorin unter der DiaSorin Kat. Nr. 11610.
- 8.13** Zum Trocknen der Proben benötigte Materialien:
- Stickstoffgas
 - Mehrfach trocknen mit 37°C (±2°C) warmem Heizblock oder Wasserbad: N-EVAP oder MULTI-VAP, erhältlich bei Organomation Associates (Berlin, MA), oder Reacti-Vap II und Reacti-Therm III, erhältlich bei Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

9. VORBEREITUNG ORGANISCHER LÖSUNGSMITTEL ZUR SÄULENEXTRAKTION

HINWEIS: Die Mischungen der organischen Lösungsmittel sollten vor Beginn des vorläufigen Extraktionsverfahrens vorbereitet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN:

Lösungsmittelmischungen wie in TABELLE I beschrieben vorbereiten; DiaSorin empfiehlt die Vorbereitung von 500 mL. Größere oder kleinere Volumen können vorbereitet werden, solange die Verhältnisse beibehalten werden. Die Volumen sollten jedoch groß genug sein, um Messfehler zu minimieren. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn jedes Lösungsmittel unabhängig gemessen wird.

VORSICHTSMASSNAHMEN:

Destilliertes oder entionisiertes Wasser verwenden.

TABELLE I
Lösungsmittelvorbereitung

Lösungsmittel mischung	Materialien	1 L	500 mL
70:30	Methanol Wasser	700 mL 300 mL	350 mL 150 mL
90:10	Hexan Methylenchlorid	900 mL 100 mL	450 mL 50 mL
99:1	Hexan IPA	990 mL 10 mL	495 mL 5 mL
92:8	Hexan IPA	920 mL 80 mL	460 mL 40 mL

10. VORLÄUFIGES EXTRAKTIONSVERFAHREN

- 10.1** Jeden lyophilisierten Kalibrator mit 3,0 mL Nullkalibrator rekonstituieren. Die Kalibratoren gut mischen und 15-20 Minuten lang stehen lassen, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Gefrorene Reagenzien vollständig auftauen. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25°C erwärmt werden. Alle Reagenzien vor Gebrauch gut mischen.
- 10.2** 500 µL jedes Kalibrators (0-5), jeder Kontrolle und jeder Patientenprobe in 12 x 75 mm Borosilikatglasröhrchen pipettieren.
- 10.3** Zu jeder Probe 500 µL Acetonitril geben; intermittierend mindestens 3-mal in einem Zeitraum von 10 Minuten auf dem Vortex mischen.
- 10.4** Die Röhrchen mit 760 x g* 10 Minuten lang bei 20-25°C zentrifugieren.
- 10.5** Die Probenüberstände in 12 x 75 mm oder 13 x 100 mm Teströhrchen dekantieren; die Pellets verwerfen.
- 10.6** Zu jedem Röhrchen 500 µL Vorbehandlungslösung geben und auf dem Vortex mischen.
- Hinweis:** Dieser Kit ist für bis zu 48 Extraktionen einschließlich Kalibratoren und Kontrollen sowie 40 unbekanntenen Proben ausgelegt. Das bedeutet, dass 24 Proben sofort mit dem VacElut und die übrigen 24 Proben anschließend extrahiert werden können. Die Säulenextraktionen sollten nach der Zugabe der Vorbehandlungslösung so bald wie möglich durchgeführt werden. Nach der Säulenextraktion können die Proben jedoch 96 Stunden lang bei -15°C oder darunter aufbewahrt werden.
- 10.7** Die Proben können jetzt auf die C₁₈OH-Kartuschen appliziert werden.

11. SÄULENVERFAHREN

- 11.1** Erklärungen zum VAC ELUT finden Sie in der VAC ELUT Gebrauchsanweisung. Die Station wie angegeben aufbauen.
- 11.2** Ein 13 x 100 mm Borosilikatglasröhrchen für jeden Kalibrator (0-5), jede Kontrolle und jede unbekanntene Probe beschriften. Diese Röhrchen in den VAC ELUT stellen. Der VAC ELUT muss sich in der Position "WASTE" befinden, und die Röhrchen muss so positioniert sein, dass sie die gewünschten Eluate auffangen. Die C₁₈OH-Kartusche auf die VAC ELUT Abdeckung legen.
- 11.3** Die Lösungsmittelmischungen wie in TABELLE II beschrieben zur Kartusche geben.

WICHTIG:

Vakuumeinsatz:

Nach jeder Lösungsmittelzugabe das Vakuum einschalten und die Lösungsmittelmischung **vollständig** durch die Kartusche fließen lassen, bevor mit dem nächsten Lösungsmittel fortgefahren wird. Das Vakuum bei den empfohlenen Schritten (siehe TABELLE II) ein- und wieder ausschalten (das Vakuum kann auch zwischen jeder Lösungsmittelzugabe ausgeschaltet werden). Das Vakuum sollte auf 10 Zoll (254 mmHg) oder niedriger eingestellt werden. Jede Lösungsmittelmischung bis zum letzten Schritt durch den Auslass "WASTE" und in geeignete Abfallbehälter eluieren.

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

Probenapplikation:

Die Proben können entweder direkt auf die Kartusche dekantiert oder mit einer Pipette appliziert werden.

Die Kartuschen dürfen zwischen den Applikationen nicht länger als 5 Minuten an der Luft trocknen.

Vorbehandlung der C₁₈ OH-Kartusche:

Vor dem ersten Gebrauch sollten die C₁₈ OH-Kartuschen mit 5 mL 90:10 (Hexan: Methylenchlorid), 5 mL IPA und 5 mL Methanol gewaschen werden. Die 90:10 (Hexan: Methylenchlorid)-Lösungsmittelmischung kann vorbereitet werden, indem 900 mL Hexan und 100 mL Methylenchlorid abgemessen werden. Die neuen, ungebrauchten Kartuschen auf den VAC ELUT legen, die Position "WASTE" einstellen, zuerst 5 mL 90:10 (Hexan: Methylenchlorid) und dann 5 mL IPA zu jeder Säule und schließlich 5 mL Methanol zugeben. Jede Lösungsmittelmischung muss vollständig durch die Kartuschen fließen, bevor mit der nächsten Mischung fortgefahren wird. Nach dieser Vorbereitung ist es nicht notwendig, diesen Schritt zu wiederholen, da die Kartuschen während des Extraktionsverfahrens aufbereitet werden.

HINWEIS: Wenn weitere Proben extrahiert werden sollen (mehr als 24), die Kartuschen nach dem in TABELLE II skizzierten Verfahren aufbereiten. Die Kartuschen können bis zu 30-mal wiederverwendet werden.

HINWEIS: Das Material der C₁₈ OH-Kartusche wird mit einer porösen Glasfaserfritte in Position gehalten. Kartuschen mit dislozierten oder fehlenden Fritten verwerfen, da das C₁₈ OH-Material verloren gehen kann.

TABELLE II

Extraktionsbeschreibung und -analyse	Extraktionsschritte	Handhabung Elutionsmittel
<p>Säulenvorbereitung/ Aufbereitung Entfernt: Störende Substanzen vom vorherigen Gebrauch (Schritt 1)</p>	<p>1. 1 mL Methanol zugeben, Vakuum einschalten. 2. Vakuum ausschalten.</p>	Verwerfen "WASTE"
<p>Probenapplikation</p>	<p>3. Alle Proben applizieren, Vakuum einschalten. aus vorläufigem Extraktionsverfahren (Schritt 10).</p>	Verwerfen "WASTE"
<p>Reinigung/Entfernung von Vitamin-D-Metaboliten</p> <p>Entfernt: Störende polare Lipide, Salze und Pigmente (Schritt 4)</p> <p>25(OH)D (Schritt 5)</p> <p>Verbleibendes 25(OH)D und 24,25(OH)₂D/25,26(OH)₂D (Schritt 6)</p>	<p>4. 5 mL 70:30 Methanol/Wasser (entionisiert oder destilliert) zugeben. 5. 5 mL 90:10 Hexan/Methylenchlorid zugeben. 6. 5 mL 99:1 Hexan/Isopropanol zugeben. 7. Das Vakuum ausschalten.</p>	Verwerfen "WASTE"
<p>Gewinnung von 1,25-(OH)₂D</p> <p>Elution von gereinigtem 1,25-(OH)₂D (Schritt 9)</p>	<p>WICHTIG!</p> <p>8. Den Vac Elut auf "Collect:" schalten. 9. 3 mL 92:8 Hexan/Isopropanol zugeben, das Vakuum einschalten. 10. Das Vakuum ausschalten.</p>	"COLLECT"

12. TROCKNEN UND REKONSTITUIEREN VON ELUATEN

- 12.1** Die Probenröhrchen mit den Eluaten zum Trocknen in einen Heizblock oder in ein Wasserbad bei 37°C (±2°C) stellen.
- 12.2** Die Eluate unter einer Abzugshaube mit 2-4 psi Stickstoffgas (Trocknungszeit 20-30 Minuten) trocknen.
- 12.3** Die Röhrchen sofort entfernen, nachdem das Eluat getrocknet ist.
- 12.4** Jedes der getrockneten Extrakte mit 50 µL 95%igem Ethanol rekonstituieren; vorsichtig bei niedriger bis mittlerer Geschwindigkeit auf dem Vortex mischen. 125 µL des Tracers in die Röhrchen geben, die 50 µL 95%iges Ethanol enthalten, erneut vorsichtig auf dem Vortex bei niedriger bis mittlerer Geschwindigkeit mischen. **HINWEIS:** Die Vortexschritte sind für die richtige Rekonstitution der Probe und für eine gute Präzision äußerst wichtig. **VORSICHT:** Den Vortex im unteren Teil des Röhrchens halten, um einen Verlust des Probenvolumens zu vermeiden und ein ausreichendes Pipetiervolumen für den Assay sicherzustellen. Ein zusätzliches Röhrchen für die Totalaktivität und eines für NSB beschriften. Zu beiden Röhrchen 50 µL 95%iges Ethanol und 125 µL Tracer zugeben. Diese werden zur Anfertigung der Duplikate für TA- (Totalaktivität) und NSB-Röhrchen verwendet.

- 12.5 Den Assay sofort nach der Rekonstitution der Proben durchführen. Bei größeren Assays werden die besten Ergebnisse erzielt, wenn 12-15 Proben gleichzeitig rekonstituiert und dann in den Assay pipettiert werden, bevor die nächsten 12-15 Proben rekonstituiert werden.

13. TESTVERFAHREN

- 13.1 Beschriftete 12 x 75 mm Einweg-Borosilikatglasröhrchen in doppelter Ausführung für jeden Kalibrator (0-5), jede Kontrolle und jede Probe gemäß Testschema vorbereiten. Vorsichtig 75 µL der rekonstituierten Kalibrator-, Kontrollen- und Probenextrakte in die doppelten Teströhrchen geben.
VORSICHT: Bei diesem Schritt muss mit Vorsicht vorgegangen werden, da der Überschuss in jedem Röhrchen nur 25 µL beträgt.
- 13.2 Siehe Schritt Nr. 4, "Trocknen und Rekonstituieren von Eluaten". 75 µL aus dem TA-Röhrchen (Totalaktivität) in die doppelten Teströhrchen geben. Diesen Schritt für die NSB-Teströhrchen (Duplikate) wiederholen.
- 13.3 300 µL NSB-Puffer in die NSB-Röhrchen geben.
- 13.4 300 µL des primären Antikörpers in alle Röhrchen außer den Totalaktivitäts- und NSB-Röhrchen geben.
- 13.5 Gut mischen; 2 Stunden lang (± 15 Minuten) bei 20-25°C inkubieren.
HINWEIS: Den präzipitierenden Ziege-anti-Kaninchen-Komplex mit 35 mL destilliertem oder entionisiertem Wasser rekonstituieren und gut mischen, bis die Suspension homogen aussieht, dann bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten lang stehen lassen und gelegentlich vor und während des Gebrauchs mischen.
- 13.6 500 µL des gut gemischten Ziege-anti-Kaninchen-Komplexes in alle Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen geben. 20 Minuten lang (± 5 Minuten) bei 20-25°C inkubieren.
- 13.7 Mit Ausnahme der Totalaktivität-Röhrchen alle Röhrchen 20 Minuten lang bei 20-25°C mit 1800 x g* zentrifugieren.
- 13.8 Die Überstände außer bei den Totalaktivität-Röhrchen vorsichtig mit Hilfe eines Schaumstoffständers o.ä. dekantieren. Dazu den Ständer über einem geeigneten Abfallbehälter umdrehen. Den umgedrehten Ständer für 2-3 Minuten auf Saugpapier stellen. Die Röhrchen vorsichtig ausschlagen, um zurück-gebliebene Flüssigkeit zu entfernen.
- 13.9 Zur Messung der Radioaktivität alle Röhrchen in einem Gammazähler 1 Minute messen. Die Röhrchen sollten mindestens 1 Minute lang gemessen werden (siehe Abschnitt "Grenzen des Verfahrens").

14. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

- 14.1 Jedes Aliquot des Reagenz in das untere Drittel des Teströhrchens geben, damit sich die Reagenzien vollständig vermischen.
- 14.2 Für eine gute Wiederfindung sind die richtigen Lösungsmittelverhältnisse von entscheidender Bedeutung. Lösungen vorbereiten, deren Volumen groß genug sind, um Messfehler zu minimieren.
- 14.3 Wenn die Werte einer Probe größer sind als die größten Kalibratorwerte, ist die Probe vor der Extraktion mit Nullkalibrator zu verdünnen und neu zu testen. Die Ergebnisse müssen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Mischen Sie beispielsweise 500 µL Probe mit 500 µL Nullkalibrator und untersuchen Sie dann 500 µL dieser Probenmischung gemäß Packungsbeilage.

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

- 14.4** In der Zeit, die durchschnittlich für einen Assay mit 100 Röhrchen benötigt wird, wurde kein Assay-Drift beobachtet.
- 14.5** Für eine komplette Laborkontrolle des beständigen Verhaltens eines RIA sind zusätzliche Faktoren zu berücksichtigen. DiaSorin empfiehlt, die folgenden Parameter regelmäßig zu überprüfen, um sicherzustellen, dass die Leistung des Kits konsistent ist.
- a. Totalaktivität**
 - b. Maximale Bindung**
Durchschnittliche Impulse pro Minute (I/M) der Nullkalibrator-Röhrchen / Durchschnittliche I/M der Totalaktivität-Röhrchen
 - c. Nichtspezifische Bindung**
Durchschnittliche I/M des NSB-Röhrchens / Durchschnittliche I/M der Totalaktivität-Röhrchen
 - d. Steigung der Eichkurve**
Die 50%ige Suppression kann überwacht werden.

15. QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte in jedem Assay mindestens zwei Kontrollen (eine im Normalbereich und eine im erhöhten Bereich) einsetzen, um die Leistung des Kits zu überwachen. Es können handelsübliche Kontrollen oder die beiden Referenzkontrollen verwendet werden, die im Kit enthalten sind.

Die Kontrollen sollten als unbekannte Proben behandelt und doppelt untersucht werden. Um die Leistung der Kontrollen zu überwachen, sollten vom Labor 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 Kontrolleergebnisse müssen den Akzeptabilitätskriterien des Labors entsprechen, bevor die Testergebnisse des Patienten mitgeteilt werden können.^{12,13,14}

16. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Eichkurve 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/B₀ gegen log Konzentration. Sie basiert auf einem Smoothed-Spline-Kurvenanpassungsprogramm.

16.1 Berechnung des Anteils B/B₀

- a.** Den durchschnittlichen I/M-Wert für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede unbekannte Probe berechnen.
- b.** Den durchschnittlichen I/M-Wert der NSB-Röhrchen von allen Zählungen abziehen.
- c.** Den korrigierten durchschnittlichen I/M-Wert jedes Kalibrators, Kontrolle oder unbekanntes Probe durch den korrigierten durchschnittlichen I/M-Wert des Nullkalibrators teilen und mit 100 multiplizieren.

$$\frac{\text{durchschn. I/M (Kalibrator oder unbekannte Probe)} - \text{durchschn. I/M (NSB)}}{\text{durchschn. I/M (Nullkalibrator)} - \text{durchschn. I/M (NSB)}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

16.2 Eichkurve

- a. Auf halblogarithmischem oder doppellogarithmischem Millimeterpapier prozentuale Bindungen B/B_0 (%) für die $1,25$ (OH)₂D-Kalibratoren auf der Ordinate (y-Achse) gegen die Kalibratorkonzentration auf der Abszisse (x-Achse) auftragen.

HINWEIS: Für die Datenanalyse können auch automatische Datenreduktionsprogramme verwendet werden. DiaSorin verwendet Multi-Calc (Pharmacia) mit einem *LIN-LOG* Smooth-SPLINE-Anpassungsprogramm. Andere Datenreduktionsmethoden müssen validiert werden, bevor sie regelmäßig eingesetzt werden.

- b. Durch die Punkte eine Ausgleichsgerade legen.
- c. Die Konzentrationen von $1,25$ -(OH)₂D in den Proben aus dem Kurvendiagramm interpolieren.
- d. Wenn eine unbekannte Probe verdünnt wurde, muss der Wert mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor korrigiert werden.
- e. Der angegebene Testbereich beträgt 5,0 bis 200 pg/mL. Alle Werte, die unter dem niedrigsten Kalibratorwert (5,0 pg/mL) liegen, sind extrapolierte Werte und können als "unter 5 pg/mL" angegeben werden.
- f. Die maximale Bindung wird berechnet, indem der I/M-Wert des Nullkalibrators durch die in den Totalaktivität-Röhrchen erhaltenen Gesamtzählungen dividiert wird.

TABELLE I und ABBILDUNG 1 zeigen typische Probanddaten für den 1,25-(OH)₂D RIA; diese Informationen dienen nur zu Referenzzwecken und sollten nicht zur Berechnung von Probenwerten verwendet werden.

TABELLE IV
DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA Probanddaten

Röhrchen	Doppelte I/M	Durchschn. I/M	Korrigierte I/M	Prozent Gebunden (B/T)	Prozent (B/B ₀)	Konz. (pg/mL)
Totalaktivität	40.792 40.578	40.685				
NSB	1.438 1.439	1.439		3,5		
Nullkalibrator	18.006 18.119	18.063	16.624	44,4	100,0	
Kalibratoren (pg/mL)						
1 (5,0)	16.710 16.770	16.740	15.302		92,0	
2 (15,0)	14.941 14.916	14.929	13.490		81,2	
3 (30,0)	13.087 13.124	13.106	11.667		70,2	
4 (75,0)	9.820 9.765	9.793	8.354		50,2	
5 (200)	6.412 6.464	6.438	5.000		30,0	
Kontrollen						
Stufe 1:	13.275	13.403	11.964		72,0	27,3
Normalbereich						
Stufe 2:	8.206	8.165	6.727		40,5	119
Hoher Bereich:	8.124					

DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA Proben-Eichkurve

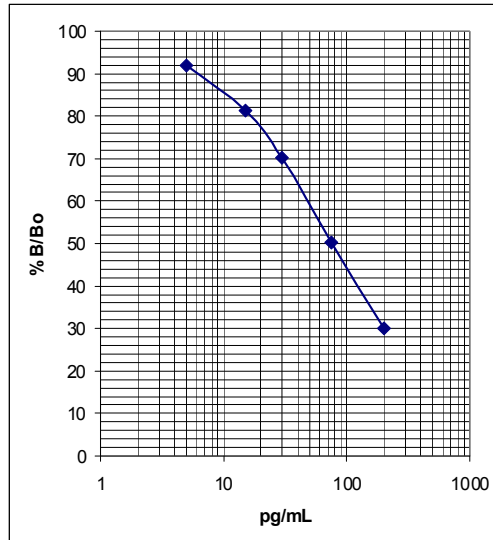


ABBILDUNG 1

DATENREDUKTION

Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

17. GRENZEN DES VERFAHRENS

- 17.1 Die Zählzeiten sollten ausreichend lang sein, um Fehler zu vermeiden (2.000 I/M ergeben z. B. 5% Fehler; 10.000 I/M ergeben 1% Fehler).
- 17.2 Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen und labordiagnostischen Daten verwendet werden, um den Arzt dabei zu unterstützen, individuelle Patientenmanagement-Entscheidungen zu treffen.
- 17.3 Die Leistungsmerkmale dieses Assays konnten bei Kindern und Jugendlichen nicht nachgewiesen werden.

18. ERWARTETE WERTE

Referenzintervall bei normalen Spendern

Es ist wichtig, dass jedes Labor sein eigenes Referenzintervall festlegt, das für seine typische Population repräsentativ ist. Die 1,25-(OH)₂D-Werte wurden jedoch von 123 scheinbar gesunden Freiwilligen aus drei Städten des mittleren Westens der USA in einer klinischen Studie gewonnen, die in den Sommer- und Herbstmonaten an drei Zentren durchgeführt wurde. 37 dieser 123 gesunden Spender unterschiedlicher Rasse waren männlich, 86 waren weiblich. Der Altersbereich betrug 21-68 Jahre. Der mittlere 1,25-(OH)₂D-Wert für die gesamte Probe (n=123) war 43,9 pg/mL. Das mit einer nichtparametrischen Methode geschätzte 95%-Referenzintervall (nach CLSI-Richtlinie C28-A2¹⁵) war 25,1-66,1 pg/mL.

Patienten mit Niereninsuffizienz im Endstadium

Es wurde eine klinische Studie durchgeführt, um die Konzentrationen von 1,25-(OH)₂D zu bestimmen, die bei einer Erwachsenenpopulation mit Niereninsuffizienz im Endstadium festgestellt werden würden. Es wurden die Proben von 87 solcher Probanden (49 männlich, 38 weiblich, 19-84 Jahre alt) aus drei Städten des mittleren Westens der USA untersucht. Der beobachtete Bereich der 1,25-(OH)₂D-Werte für diese Probe (n=87) war 1,6-17,3 pg/mL. Die obere Grenze des mit der nicht-parametrischen Methode geschätzten 95%-Referenzintervalls liegt bei 14,2 pg/mL.

19. TESTCHARAKTERISTIKA

19.1 Präzision

Die Assay-Präzision wurde von DiaSorin nach den Grundsätzen der CLSI-Richtlinie (EP5-A) ermittelt.¹⁶ Drei Kontrollstufen auf Humanserumbasis mit über den Assay-Bereich verteilten 1,25-(OH)₂-D-Konzentrationen wurden an 25 Assay-Tagen, d. h. an mehr als 60 Arbeitstagen, untersucht. An der Untersuchung waren mehrere Personen beteiligt. Darüber hinaus wurden für alle Komponenten mehrere Chargennummern verwendet. Die per Varianzanalyse (ANOVA) ausgewerteten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	N	Mittelwert pg/mL	Intra-Assay		Von Tag zu Tag		Gesamt	
			S.A.	% VK	S.A.	% VK	S.A.	% VK
NIEDRIG	25	25,8	1,76	6,8	3,8	14,6	4,0	15,3
MITTEL	25	41,3	3,16	7,7	4,6	11,1	5,1	12,3
HOCH	25	105,2	11,86	11,3	11,8	11,2	14,4	13,7

19.2 RICHTIGKEIT: DIE RICHTIGKEIT DES ASSAYS WURDE MIT HILFE DES LINEARITÄTS- UND WIEDERFINDUNGSTESTS ÜBERPRÜFT.

Linearität (Parallelität)

Die Linearität der Verdünnung wurde von DiaSorin in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der CLSI-Richtlinie EP6-P evaluiert.¹⁷ Drei Serumpatienten-proben-pools wurde durch Serienvdünung mit Nullkalibrator vorbereitet und die Aliquots bei -20°C einzeln eingefroren. Jede Probe und Verdünnung wurde in mehreren Replikaten an drei verschiedenen Testdaten untersucht. Die erwarteten Werte wurden bestimmt, indem die unverdünnten Werte jedes Probenpools mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurden. Die Daten sind unten zusammengefasst. Die Ergebnisse wurden als lineare Regression des erwarteten gegenüber dem beobachteten Wert aufgetragen.

Probe Nr.	Verdünnung	Erwarteter Wert (pg/mL) (N=10)	Mittlerer Beobachteter Wert (pg/mL) (N=10)
1	UNVERDÜNNT	49,6	49,6
	1:2	24,8	25,3
	1:4	12,4	11,1
	1:8	6,2	4,4
2	UNVERDÜNNT	50,2	50,2
	1:2	25,1	24,2
	1:4	12,6	12,2
	1:8	6,3	4,6
3	UNVERDÜNNT	62,0	62,0
	1:2	31	31,9
	1:4	15,5	13,4
	1:8	7,8	6,2

WIEDERFINDUNG

Die Fähigkeit des Assays, alle Analyten in den klinischen Proben quantitativ wiederzufinden, wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen eines frisch vorbereiteten reinen 1,25-(OH)₂-D-Antigens zu den drei Patientenprobenpools evaluiert. Es wurden drei Konzentrationen gewählt und in doppelter Ausführung untersucht. Anschließend wurde die Wiederfindungsrate bestimmt. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug 101 %.

Probe Nr.	Init. Konz. (pg/mL) 1,0 mL	Spike-Menge (pg)	*Erwartet (pg/mL)	Beobachtet (pg/mL)	Wiederfindungsrate
1	30,8	50,0	77,7	75,6	97
		62,5	88,9	87,2	98
		75,0	99,8	103	103
2	42,8	50,0	89,2	89,5	100
		62,5	100,3	98,9	99
		75,0	111,0	118	106
3	40,3	50,0	86,8	83,9	97
		62,5	97,9	103	105
		75,0	108,8	118	108

*Bei der Berechnung der erwarteten Konzentration wurde der von der Spike-Lösung eingebrachte Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

19.3 Analytische Sensitivität

Die Sensitivität dieses Assays, definiert als die niedrigste von Null zu unterscheidende Menge bei zweifacher Standardabweichung unter dem mittleren I/M-Wert des Nullkalibrators (n=20), ist gleich oder weniger $\leq 2,0$ pg/mL.

19.4 Analytische Spezifität

Die Kreuzreaktivität des in diesem Kit verwendeten Antiserums wird ausgedrückt als das Verhältnis der 1,25-(OH)₂D₃-Konzentration zur Konzentration der kreuzreaktiven Substanz bei 50%iger Inhibierung der maximalen Bindung.

Analyt	Konz. bei 50% B/Bo	% Kreuzreaktivität
24,25 D ₃	76.420 pg/mL	<0,5
25,26 D ₃	24.330 pg/mL	<0,5
25 D ₃	>>>1 mg/mL	<0,5

19.5 Störende Substanzen

Es wurde eine Interferenzstudie durchgeführt, um zu bestimmen, ob erhöhte Konzentrationen häufig vorkommender endogener Substanzen die Assay-Ergebnisse negativ beeinflussen können. Die Evaluierung erfolgte in Übereinstimmung mit den CLSI-Richtlinien (EP7-P).¹⁸ Es wurden drei Proben auf Humanserumbasis mit niedrigen, mittleren oder hohen Konzentrationen von 1,25-(OH)₂-D₃ entweder mit Zusätzen der Testsubstanz oder als mit identischen Volumen der Testsubstanz versetzten Kontrollen untersucht. Jede Probe wurde zweimal extrahiert und ergab vier Replikate. Die unten dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es keine Interferenzen durch eine der getesteten Substanzen gab. Die Bestimmung erfolgte durch statistisches Testen mit ANOVA (95%-Konfidenzintervall) oder über den Mittelwert der versetzten Proben, die den für die Kontrollen ermittelten Standardabweichungsbereich um mehr als ± 2 überschritten.

Bilirubin

Probe Nr.	Kontrolle MW (pg/mL)	Kontrolle 2 SA-Bereich	Bilirubin MW (pg/mL)	Interferenz ANOVA
Niedrig	19,9	18,5-21,3	19,5	0,54
Mittel	31,7	27,7-35,7	29,9	0,22
Hoch	79,7	63,5-95,9	83,2	0,45

Cholesterin

Probe Nr.	Kontrolle MW (pg/mL)	Kontrolle 2 SA-Bereich	Cholesterin MW (pg/mL)	Interferenz ANOVA
Niedrig	19,9	18,5-21,3	19,4	0,64
Mittel	31,7	27,7-35,7	29,7	0,15
Hoch	79,7	63,5-95,9	75,2	0,40

Triglycerid

Probe Nr.	Kontrolle MW (pg/mL)	Kontrolle 2 SA-Bereich	Triglycerid MW (pg/mL)	Interferenz ANOVA
Niedrig	14,7	12,9-16,5	15,1	0,88
Mittel	30,4	22,4-38,4	33,4	0,25
Hoch	92,6	69,5-116,9	95,4	0,68

Hämoglobin

Probe Nr.	Kontrolle MW (pg/mL)	Kontrolle 2 SA-Bereich	Hämoglobin MW (pg/mL)	Interferenz ANOVA
Niedrig	21,5	17,5-25,5	20,8	0,53
Mittel	38,6	35,4-41,8	40,0	0,43
Hoch	112,7	101,4-124,0	120,6	0,17

Harnstoff

Probe Nr.	Kontrolle MW (pg/mL)	Kontrolle 2 SA-Bereich	Harnstoff MW (pg/mL)	Interferenz ANOVA
Niedrig	25,1	20,9-29,3	26,6	0,39
Mittel	36,2	23,8-48,6	35,9	0,96
Hoch	120,1	97,4-142,8	118,6	0,82

LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

TESTSCHEMA

1. Alle Kalibratoren, Kontrollen und unbekanntes Proben werden nach dem Trocknungsschritt des Säulenverfahrens mit 95%igem Ethanol und Tracer rekonstituiert.
2. Reagenzien wie folgt dispensieren:

Röhrchen/Reagenzien	Totalaktivität	NSB	Kal 0-5	Kontrollen und unbekanntes Proben
Rekonstituierte Kalibratoren	-	-	75 µL	-
Rekonstituierte Kontrollen und unbekanntes Proben	-	-	-	75 µL
95%iges Ethanol und Tracer **	75 µL	75 µL	-	-
NSB-Puffer	-	300 µL	-	-
1,25-(OH) ₂ -D Antiserum	-	-	300 µL	300 µL

HINWEIS: Totalaktivität- und NSB-Röhrchen werden durch Zugabe von 50 µL 95%igem Ethanol mit 125 µL Tracer und durch Pipettieren von 75 µL dieser Mischung in doppelte Teströhrchen hergestellt.

3. Gut mischen; 2 Stunden lang (+/- 15 Minuten) bei 20-25°C inkubieren.
4. 500 µL präzipitierendes Ziege-anti-Kaninchen-Reagenz in alle Röhrchen außer den Totalaktivität-Röhrchen dispensieren.
5. Gut mischen; 20 (+/- 5) Minuten lang bei 20-25°C inkubieren.
6. Mit 1800 x g* 20 Minuten lang bei 20-25°C zentrifugieren.
7. Die Überstände dekantieren.
8. Alle Röhrchen in einem Gammazähler 1 Minute messen.

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

EQUIPO RIA PARA 1,25-DIHIIDROXIVITAMINA D ¹²⁵I

1. USO INDICADO

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

El equipo RIA 1,25-Dihidroxitamina D ¹²⁵I es un ensayo radioinmunológico que tiene como finalidad la determinación cuantitativa de 1,25-dihidroxitamina D (1,25-(OH)₂-D) en suero humano o plasma EDTA para utilizarlo en la evaluación de deficiencia de 1,25-(OH)₂-D asociada con enfermedades renales. Los resultados del ensayo deben utilizarse junto con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar al médico en la toma de decisiones para el tratamiento individual de pacientes en población adulta.

2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La vitamina D procede de 2 fuentes: exógena (de la dieta) y endógena (biosíntesis, regulada por la exposición a la luz ultravioleta). La fuente exógena o nutricional incluye alimentos que contengan de forma natural niveles bajos de vitamina D₂ (p. ej. leche, mantequilla, cereales con suplemento de vitamina D₂), suplementos alimenticios en forma de vitaminas de venta sin receta y fórmulas terapéuticas de las vitaminas D₂.¹ La acción de la vitamina D no es inherente al entrar en circulación por vía dietética o fotoquímica. La actividad biológica se alcanza tras una compleja serie de pasos metabólicos.²

En la actualidad se sabe que la activación metabólica de la vitamina D consiste en un complicado proceso controlado, sujeto a importantes alteraciones debido a variables que incluyen el calcio y el fósforo de la dieta, el grado de deficiencia de vitamina D, deficiencias genéticas, concentraciones de hormona paratiroides, exposición a los rayos ultravioleta y grado de funcionamiento renal.³ La biosíntesis de las formas dihidroxiladas de vitamina D₃ comienza con la acción de la luz ultravioleta solar sobre el 7-dehidrocolesterol para formar vitamina D₃ en la piel. Una vez que la vitamina D₃ entra en circulación es absorbida rápidamente por el hígado donde se metaboliza a 25-hidroxitamina D₃ (25-OH-D₃). El hígado también hidroxila la vitamina D₂ de la dieta para formar 25-hidroxitamina D₂ (25-OH-D₂).^{2,4}

Tras la hidroxilación hepática, la 25-OH-D se transporta junto con una proteína de unión de la vitamina D hasta el riñón, donde sigue produciéndose hidroxilación. La adición de un grupo hidroxilo en la posición 1 produce 1,25-dihidroxitamina D (1,25-(OH)₂-D). Ésta es la vitamina D más potente encontrada hasta la fecha y su producción está estrictamente controlada por la concentración en suero de calcio, fósforo y hormona paratiroides. En los momentos de estrés cálcico, la 1,25-(OH)₂-D es la vitamina D más importante producida por el riñón.^{5,6}

Esto es debido a su papel esencial en la absorción activa efectiva del calcio y el fósforo, así como en su metabolismo normal. Por consecuencia, la medición de 1,25-(OH)₂-D está convirtiéndose en una eficiente herramienta en la investigación de enfermedades y condiciones que afectan al metabolismo normal del fósforo y el calcio.^{7,8,9}

3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo DiaSorin 1,25-(OH)₂-D es un procedimiento de dos pasos. Incluye una extracción preliminar y la subsiguiente purificación de los metabolitos de vitamina D del suero o plasma EDTA mediante cartuchos C₁₈OH.¹⁰ Tras la extracción, la muestra tratada se somete a un ensayo con un competitivo procedimiento RIA. El método RIA se basa en un anticuerpo policlonal específico tanto para 1,25-(OH)₂D₂ y 1,25-(OH)₂D₃. La muestra, el anticuerpo y el trazador, se incuban durante 2 horas entre 20 y 25°C. La fase de separación se alcanza tras una incubación de 20 minutos entre 20 y 25°C con un segundo complejo de precipitación de anticuerpos. Tras la centrifugación y decantación, la parte unida remanente en la pastilla se cuenta en un contador gamma.

Los valores se calculan de forma directa a partir de una curva de calibrador de concentraciones conocidas. La concentración final de 1,25-(OH)₂D en las muestras de suero y plasma EDTA se expresa en pg/mL.

4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

TAMPÓN NSD 1,25-(OH) ₂ D	1 vial / 3 mL
CALIBRADOR 0 1,25-(OH) ₂ D	1 vial / 20 mL
CALIBRADOR 1 - 5 1,25-(OH) ₂ D ₃	5 viales / 3 mL
ANTISUERO 1,25-(OH) ₂ D	1 frasco / 35 mL
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 vial / 10 mL
SOLUCIÓN DE TRATAMIENTO PREVIO 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 frasco / 50 mL
COMPLEJO DE PRECIPITACIÓN GAR 1,25-(OH) ₂ D	2 viales / 35 mL
SUERO DE CONTROL 1,25-(OH) ₂ D	2 viales / 3 mL
ETANOL 95%	1 vial / 7 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.

Quando reconstituya el contenido de los viales, mezcle suavemente para evitar la formación de espuma. Almacene todos los reactivos reconstituidos a -15°C o menos inmediatamente después de usarlos. No deben mezclarse reactivos de diferentes lotes.

4.1 Tampón NSB 1,25-(OH)₂D: reactivo listo para utilizar

Tampón de gelatina de fosfato de potasio que contiene ProClin® 300 (< 0,2%).

4.2 Calibrador 0 1,25-(OH)₂D: reactivo listo para utilizar

Tampón de fosfato que contiene proteínas de suero bovino y ProClin 300 (< 0,2%).

4.3 Calibrador (1-5) 1,25-(OH)₂D₃: reactivo liofilizado

Cinco calibradores liofilizados (1,25-(OH)₂D₃) en concentraciones entre 5 y 200 pg/mL que contienen suero humano y ProClin 300 (<0,2%). Reconstituya cada calibrador con 3,0 mL de calibrador 0. La concentración exacta se indica en la etiqueta del vial. Los calibradores del equipo están ajustados con cuantificación UV. 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.

4.4 Antisero 1,25-(OH)₂D: reactivo listo para utilizar

Suero anti-1,25-(OH)₂D de conejo diluido en tampón de gelatina de fosfato que contiene ProClin 300 (<0,2%).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃ reactivo listo para utilizar

1,25-(OH)₂D₃ radio yodado análogo diluido en un tampón de etileno glicol fosfato.

4.6 Solución de tratamiento previo 1,25-(OH)₂D₃: reactivo listo para utilizar

Tampón de fosfato de potasio.

4.7 Controles 1,25-(OH)₂D: nivel 1 (Normal), nivel 2 (Elevado): reactivo listo para utilizar

Mezcla de suero humano procesado que contiene ProClin 300 (<0,2%), con las cantidades apropiadas de 1,25-(OH)₂D para obtener concentraciones de control dentro de los rangos especificados. El control 1 está dentro del rango normal y el control 2 está dentro de un rango elevado. 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.

4.8 Complejo de precipitación GAR (Goat Anti-Rabbit): reactivo liofilizado

El suero de conejo normal previamente precipitado con suero anti-conejo y polietilenglicol (PEG) está diluido con tampón borato-ASB con azida sódica al 0,1% y otros conservantes (liofilizado). Reconstituya el vial con 35 mL de agua destilada desionizada; mezcle hasta que la suspensión sea homogénea y deje reposar al menos durante 30 minutos a temperatura ambiente removiendo cada cierto tiempo.

4.9 Etanol 95%: reactivo listo para utilizar
95% de etanol y 5% de agua.

NOTA: También son necesarios cartuchos C₁₈OH para este procedimiento. Dichos cartuchos deben solicitarse por separado con el número de pedido de DiaSorin 65101E.

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 u organismos de investigación. Las pruebas debe realizarlas únicamente el personal de laboratorio debidamente competente y capacitado.

REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

Trátese como potencialmente infeccioso.

Todas las unidades de donantes de suero/plasma se han probado en conformidad con un método aprobado 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 que se detecten 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 puede ofrecer una seguridad total de la ausencia del virus de la hepatitis B, de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manejar de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4ª ed., mayo 1999 o actual, por Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.

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. Al desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," en el 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 ETANOL

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

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 5,5 μCi (204 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 enjugarse 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.
- 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. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE SUERO Y PLASMA

El equipo 1,25-Dihidroxitamina D precisa 500 µL de suero o plasma EDTA para realizar la extracción para el ensayo; un volumen de 1,5 mL permitirá repetir el ensayo y proporciona la dosificación adecuada.

Con este equipo puede utilizarse suero o plasma humanos. Con este ensayo puede utilizarse el anticoagulante EDTA. 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. Para el suero, deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugue durante 15 minutos con aproximadamente 760 x 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 -15°C o menos. No debe congelar y descongelar las muestras de forma reiterada. No obstante, un estudio realizado por DiaSorin mostró que no se produce un cambio significativo en los valores en muestras que se han congelado y descongelado 3 veces. Se han conservado muestras hasta 6 meses a 15°C o menos sin que se produzcan cambios significativos en los resultados.

8. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- 8.1 Cartuchos C₁₈OH (24 unidades) pedidos por separado con el número de pedido DiaSorin 65101E.
- 8.2 12 tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm y 13 x 100 mm.
- 8.3 Portatubos.
- 8.4 Parafilm o un equivalente para cubrir los tubos de ensayo.
- 8.5 Portatubos de espuma o equivalente.
- 8.6 Centrifuga con capacidad para 12 tubos de 75 mm a 1800 x g*.
- 8.7 Contador gamma válido para yodo ¹²⁵.
- 8.8 Mezclador vórtex.
- 8.9 Utensilios de dosificación:
 - a. Micropipetas calibradas para suministrar 75 µL, 300 µL y 500 µL.
 - b. Dispensadores de repetición para suministrar 50 µL, 300 µL, y 500 µL.
 - c. Pipetas volumétricas para reconstituir calibradores, 3,0 mL.

8.10 Agua desionizada o destilada.

8.11 Disolventes orgánicos:

Para la preparación y extracción de muestras se precisarán los siguientes disolventes.

Utilice solo disolventes de grado HPLC.

No exponga los disolventes orgánicos a materiales de vidrio lavados con ácido ni a otras condiciones de acidez.

- a. Acetonitrilo.
- b. Metanol.
- c. Hexano. (IMPORTANTE: el porcentaje de n-hexano debe ser superior al 95%)
- d. Cloruro de metileno (no debe contener alcohol como conservante).
- e. Isopropanol (2-propanol).

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

- 8.12** Dispositivo recomendado para los cartuchos C₁₈OH:
- Estación de procesamiento de muestras Vac Elut. Procesa 24 columnas en cada ciclo. Puede solicitarse a Analytichem International o a DiaSorin. Para pedirla a DiaSorin, utilice el número de pedido DiaSorin 11610.
- 8.13** Material necesario para secar muestras:
- Nitrógeno gaseoso.
 - Colector de secado con baño de agua o bloque calentador a 37°C (±2°C): N-EVAP o MULTI-VAP disponible a través de Organomation Associates (Berlín, MA) o Reacti-Vap II y Reacti-Therm III disponibles a través Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

9. PREPARACIÓN DE DISOLVENTES ORGÁNICOS PARA LA EXTRACCIÓN DE COLUMNAS

NOTA: Las mezclas de disolventes orgánicos deben prepararse antes de iniciar el procedimiento de extracción preliminar.

PRECAUCIONES:

Prepare mezclas de disolventes como se describe en la TABLA I; DiaSorin recomienda la preparación de 500 mL de disolución. Es posible preparar cantidades diferentes siempre que se respeten las proporciones. No obstante, los volúmenes deben ser suficientemente grandes como para minimizar posibles errores de medida. Mida cada disolvente de forma independiente para lograr mejores resultados.

PRECAUCIONES:

Utilice agua destilada o desionizada cuando proceda.

TABLA I
Preparación disolvente

Mezcla disolvente	Materiales	1 L	500 mL
70:30	metanol agua	700 mL 300 mL	350 mL 150 mL
90:10	hexano cloruro de metileno	900 mL 100 mL	450 mL 50 mL
99:1	hexano Alcohol isopropílico	990 mL 10 mL	495 mL 5 mL
92:8	hexano Alcohol isopropílico	920 mL 80 mL	460 mL 40 mL

10. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN PRELIMINAR

- Reconstituya cada calibrador liofilizado con 3,0 mL de calibrador cero. Mezcle bien los calibradores y deje reposar durante 15 a 20 minutos para asegurar una completa reconstitución. Descongele por completo los reactivos congelados. Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente. No permita que los reactivos alcancen temperaturas superiores a los 25°C. Mezcle bien todos los reactivos antes de utilizarlos.
- Dosifique 500 µL de cada calibrador (0-5), control y muestra del paciente en los 12 tubos etiquetados de vidrio de borosilicato de 75 mm.
- Añada 500 µL de acetonitrilo a cada muestra; utilice el mezclador vórtex de forma intermitente al menos 3 veces durante 10 minutos.

- 10.4** Centrifugue los tubos a 760 x g* durante 10 minutos a 20 - 25°C.
- 10.5** Decante los sobrenadantes de la muestra en los 12 tubos etiquetados de 75 mm o los 13 de 100 mm (si lo prefiere); deseche las pastillas.
- 10.6** Añada 500 µL de disolución de tratamiento previo a cada tubo y al mezclador vórtex.
- NOTA:** Este equipo está diseñado para colocar hasta 48 extracciones incluidos los controladores y controles y 40 desconocidos. Esto quiere decir que pueden extraerse 24 muestras en el VacElut de forma inmediata y las 24 restantes pueden extraerse más adelante. Las extracciones de columna deberían realizarse tan pronto como sea posible tras la adición del tratamiento previo. Sin embargo, una vez extraída la columna, las muestras pueden almacenarse durante 96 horas a -15°C o menos.
- 10.7** Ahora, las muestras están listas para aplicarlas a los cartuchos C₁₈OH.

11. PROCEDIMIENTO DE COLUMNA

- 11.1** Para obtener una descripción del VAC ELUT, consulte su Manual de usuario. Monte la estación tal como se indica.
- 11.2** Etiquete un tubo de vidrio de borosilicato de 13 x 100 mm para cada calibrador (0-5), control y muestra desconocida. Coloque dichos tubos en el VAC ELUT. Compruebe que la tapa del VAC ELUT está en la posición "WASTE" y que los tubos están colocados para recoger los eluatos deseados. Coloque los cartuchos C₁₈OH en la cubierta del VAC ELUT.
- 11.3** Añada las mezclas de disolventes a los cartuchos específicos tal como se describe en la TABLA II.

IMPORTANTE:

Utilización del vacío:

Accione el vacío tras cada adición de disolvente y permita que la mezcla de disolvente fluya **por completo** a través del cartucho antes de pasar al siguiente disolvente. Active y desactive el vacío en los pasos recomendados en la TABLA II (si se prefiere, el vacío puede desactivarse tras cada adición de disolvente).

El vacío debe ajustarse a 10 pulgadas (254 mm de Hg) o menos. Deje salir cada mezcla de disolvente a través de la salida "WASTE" a contenedores apropiados hasta el paso de recolección final.

Aplicación de muestra:

Las muestras pueden decantarse directamente sobre el cartucho o bien aplicarse con una pipeta.

No deje que el cartucho se seque al aire durante más de 5 minutos entre aplicaciones.

Tratamiento previo con cartucho C₁₈OH:

Los cartuchos C₁₈OH deben lavarse con 5 mL de disolución 90:10 (hexano: cloruro de metileno), 5 mL de alcohol isopropílico y 5 mL de metanol antes de utilizarlos por primera vez. Para preparar la mezcla de disolventes 90:10 (hexano: cloruro de metileno) mida 900 mL de hexano y 100 mL de cloruro de metileno. Coloque los cartuchos nuevos, sin utilizar, en el aparato VAC ELUT, ajuste la posición "WASTE" y añada 5 mL de disolución 90:10 (hexano: cloruro de metileno) seguido de 5 mL de alcohol isopropílico y, a continuación, 5 mL de metanol. Deje que cada mezcla de disolventes pase por completo a través de los cartuchos antes de comenzar con la mezcla siguiente. Tras esta preparación inicial no será necesario repetir este paso ya que los cartuchos se regeneran durante el procedimiento de extracción.

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

NOTA: Si es preciso extraer muestras adicionales (más de 24), regenere los cartuchos con el método descrito en la TABLA II. Los cartuchos pueden reutilizarse hasta 30 veces.

NOTA: El material del cartucho C₁₈OH se sujeta mediante una frita de fibra porosa. Deseche los cartuchos con fritas sueltas o en los que falte alguna ya que podría perderse el material C₁₈OH.

TABLA II

Descripción y análisis de la extracción	Pasos de la extracción	Tratamiento de eluyentes
Preparación de columna / regeneración Elimina: sustancias que interfieren de utilizations previas (paso 1)	1. Añada 1 mL de metanol, active el vacío 2. Desactive el vacío.	Deseche "WASTE"
Aplicación de muestra	3. Aplique todas las muestras, active el vacío. Procedimiento de extracción preliminar (paso 10).	Deseche "WASTE"
Purificación/eliminación de metabolitos de vitamina D Elimina: pigmentos, sales y lípidos polares que interfieren (paso 4) 25(OH)D (paso 5) 25(OH)D y 24,25(OH) ₂ D/25,26(OH) ₂ D remanentes (paso 6)	4. Añada 5 mL de disolución 70:30 metanol/agua (desionizada o destilada). 5. Añada 5 mL de disolución 90:10 hexano/cloruro de metileno. 6. Añada 5 mL de disolución 99:1 hexano/isopropanol. 7. Desactive el vacío.	Deseche "WASTE"
Recogida de 1,25-(OH)₂D Elución de 1,25-(OH) ₂ D purificado (paso 9)	IMPORTANTE 8. Ajuste el Vac Elut en la posición "Collect." 9. Añada 3 mL de disolución 92:8 hexano/isopropanol, active el vacío. 10. Desactive el vacío.	"COLLECT"

12. SECADO Y RECONSTITUCIÓN DE ELUATOS

- 12.1 Coloque los tubos de muestra con eluatos en un bloque calentador o un baño de agua a 37°C (±2° C) para que se sequen.
- 12.2 Seque los eluatos bajo un extractor utilizando 2-4 psi de nitrógeno gaseoso (tiempo de secado, 20-30 minutos).
- 12.3 Retire los tubos inmediatamente después de que se haya secado el eluato.

- 12.4 Reconstituya cada uno de los extractos secados 50 µL de etanol 95% ; agite con suavidad en vórtex a velocidad media o baja. Añada 125 µL de trazador en los tubos que contienen los 50 µL de etanol 95%, agite con suavidad de nuevo en vórtex a velocidad media a baja. **Nota:** Los pasos de vórtex son muy importantes para asegurar que la muestra está correctamente reconstituida y para lograr un buen nivel de precisión. **Precaución:** Mantenga el vórtex en la posición más baja del tubo para evitar la pérdida de volumen de muestra lo que garantiza suficiente volumen de dosificación para el ensayo. Etiquete un tubo adicional para cuentas totales y un tubo para NSB. Añada 50 µL de etanol 95% y 125 µL de trazador en ambos tubos. Esto se utilizará para crear los tubos duplicados para TC (cuentas totales) y NSB para la configuración del ensayo.
- 12.5 Realice el ensayo **inmediatamente** después de reconstituir las muestras. Para obtener resultados óptimos cuando se realizan ensayos grandes, reconstituya 12 - 15 muestras de una vez y dosifique en el ensayo antes de reconstituir las 12 - 15 siguientes.

13. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

- 13.1 Disponga 12 tubos etiquetados de vidrio de borosilicato de 75 mm en duplicado para cada calibrador (0-5), control y muestra de acuerdo con el esquema del ensayo. Añada con cuidado 75 µL del calibrador reconstituido, extractos de muestras y control en los tubos de ensayo duplicados.
PRECAUCIÓN: Este paso debe realizarse con cuidado ya que solo se dispone de 25 µL de excedente en cada tubo.
- 13.2 Consulte "Secado y reconstitución de eluatos", paso número 4. Añada 75 µL del tubo TC (cuentas totales) en los tubos de ensayo duplicados. Repita este paso para los tubos de ensayo duplicados de NSB.
- 13.3 Añada 300 µL de tampón NSB a los tubos NSB.
- 13.4 Añada 300 µL de anticuerpo primario en todos los tubos excepto los tubos de cuentas totales y de NSB.
- 13.5 Mezcle bien; incube durante 2 horas (± 15 minutos) a 20 - 25°C.
NOTA: Reconstituya el complejo de precipitación GAR con 35 mL de agua destilada o desionizada, mezcle bien hasta que la suspensión aparezca homogénea y deje que repose durante un mínimo de 30 minutos antes de utilizar a temperatura ambiente mezclando ocasionalmente antes y durante la utilización.
- 13.6 Añada 500 µL de complejo de precipitación GAR bien mezclado en todos los tubos excepto en los de cuentas totales. Incube durante 20 minutos (± 5 minutos) a 20 - 25°C.
- 13.7 Centrifugue todos los tubos durante 20 minutos a 20 - 25°C a 1800 x g*, salvo los tubos de cuentas totales.
- 13.8 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.
- 13.9 Mida la radioactividad contando todos los tubos durante 1 minuto en un contador gamma. Los tubos deben contarse durante al menos 1 minuto (vea la sección Limitaciones del procedimiento).

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

14. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

- 14.1** Añada cada alícuota de reactivo al tercio inferior del tubo de ensayo para asegurar la mezcla completa de los reactivos.
- 14.2** Las proporciones correctas de disolvente son cruciales para que las recuperaciones sean buenas. Prepare disoluciones en volúmenes suficientemente grandes para minimizar los errores de medida.
- 14.3** Que el calibrador más alto, debe repetirse el ensayo diluyendo con el calibrador cero del equipo antes de la extracción. Los resultados deben multiplicarse por el factor de disolución apropiado. Por ejemplo, mezcle 500 μL de la mezcla con 500 μL del calibrador cero y, a continuación, realice un ensayo sobre 500 μL de esta mezcla como indica el envoltorio del producto
- 14.4** No se ha observado ninguna desviación del ensayo en el tiempo medio que toma realizar un ensayo de 100 tubos.
- 14.5** Para que un laboratorio pueda controlar el desempeño uniforme de un ensayo RIA hay factores adicionales que deben comprobarse. DiaSorin recomienda comprobar periódicamente los siguientes parámetros para asegurar el desempeño uniforme del equipo.
- Cuentas totales**
 - Unión máxima**
Promedio de cuentas por minuto (CPM) del tubo de calibrador 0/Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales.
 - Uniones no específicas**
Promedio de CMP de los tubos NSB/Promedio de CPM de los tubos de cuentas totales.
 - Pendiente de la curva de calibrador**
Puede controlarse el 50% de supresión.

15. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos dos controles (uno de rango normal y otro de rango elevado) 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.

Los controles deben tratarse como muestras desconocidas y someterse al ensayo por duplicado. El laboratorio debe mantener gráficos de control de calidad para llevar un seguimiento del desempeño del control. Cada laboratorio debe establecer límites de desempeño aceptables para cada nivel de control mediante métodos estadísticos diseñados para detectar errores sistemáticos y aleatorios. Los resultados de control deben cumplir los criterios de aceptabilidad del laboratorio antes de informar los resultados de las pruebas con pacientes.^{12,13,14}

16. 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_0 frente a un método de concentración logarítmica basado en un programa de ajuste de línea estriada alisada.

16.1 Cálculo de porcentaje B/B₀

- a. Calcule el promedio de CMP de cada calibrador, control y muestra desconocida.
- b. Reste el promedio de CPM de los tubos NSB de todas las cuentas.
- c. Divida el promedio de las CPM corregidas de cada calibrador, control o muestra desconocida por el promedio de las CPM corregidas del calibrador 0 y multiplique por 100.

$$\frac{\text{prom. CPM (calibrador o muestra desconocida)} - \text{prom. CPM (NSB)}}{\text{prom. CPM (calibrador 0)} - \text{prom. CPM (NSB)}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

16.2 Utilización del trazado de la curva de calibrador

- a. Con un papel gráfico semilog de 2 ciclos o log-logit, trace el B/B₀ porcentual (%) para los calibradores 1,25 (OH)₂D en el eje de ordenadas (eje Y) frente a la concentración de calibradores en el eje de abscisas (eje X).
NOTA: Para analizar los datos también pueden utilizarse programas automáticos de reducción de datos. DiaSorin utiliza Multi-Calc (Pharmacia) con un programa de ajuste suavizado SPLINE LIN-LOG. Todos los demás métodos de reducción de datos han de ser validados antes utilizarlos con regularidad.
- b. Una los puntos con una línea de ajuste óptimo.
- c. Interpole los niveles de 1,25-(OH)₂D en las muestras del trazado de los calibradores.
- d. Si alguna muestra desconocida está diluida, corríjala para obtener el factor de dilución adecuado.
- e. El rango que se registra del ensayo es desde 5,0 pg/mL hasta 200 pg/mL. Cualquier valor por debajo del calibrador más bajo, 5,0 pg/mL, es un valor extrapolado y puede registrarse como "inferior a 5 pg/mL".
- f. Calcule la unión máxima dividiendo las CPM del calibrador 0 por el promedio de cuentas totales obtenido con los tubos de cuentas totales.

La TABLA IV y la FIGURA 1 muestran ejemplos de datos típicos de muestras para el ensayo RIA 1,25-(OH)₂D RIA; esta información sólo debe utilizarse como referencia y no para calcular ningún valor.

TABLA IV
 Datos de muestras de ensayo RIA 1,25-(OH)₂D de DiaSorin

Tubo	CPM duplicado	Promedio CPM	CPM corregido	Porcentaje unión (B/T)	Porcentaje (B/B ₀)	Conc. (pg/mL)
Cuentas totales	40.792 40.578	40.685				
NSB	1.438 1.439	1.439		3,5		
Calibrador 0	18.006 18.119	18.063	16.624	44,4	100,0	
Calibradores (pg/mL)						
1 (5,0)	16.710 16.770	16.740	15.302		92,0	
2 (15,0)	14.941 14.916	14.929	13.490		81,2	
3 (30,0)	13.087 13.124	13.106	11.667		70,2	
4 (75,0)	9.820 9.765	9.793	8.354		50,2	
5 (200)	6.412 6.464	6.438	5.000		30,0	
Controles						
Nivel 1: rango normal	13.275 13.530	13.403	11.964		72,0	27,3
Nivel 2: rango alto:	8.206 8.124	8.165	6.727		40,5	119

Curva de calibrador de muestra de ensayo RIA 1,25-(OH)₂D RIA de DiaSorin

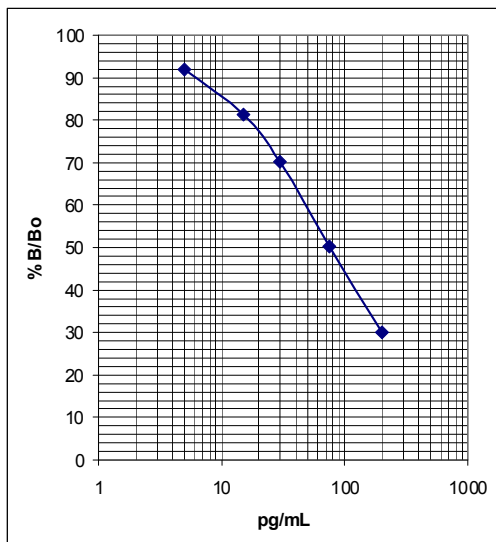


FIGURA 1

REDUCCIÓN DE DATOS

El laboratorio de control de calidad de DiaSorin utiliza un ajuste de línea estriada alisada.

17. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 17.1 La frecuencia de las cuentas debería bastar para evitar errores debido a ineficacia del contador (por ejemplo, la acumulación de 2.000 CPM dará como resultado un error del 5%, 10.000 CPM dará como resultado un error del 1%).
- 17.2 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.
- 17.3 No se han establecido las características del desempeño de este ensayo en poblaciones pediátricas.

18. VALORES PREVISTOS

Intervalo de referencia para donantes normales

Es importante que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia con respecto a la población a la que atiende. No obstante, se recogieron valores de 1,25-(OH)₂D de 123 voluntarios aparentemente sanos en tres ciudades de la región central de EE.UU. en unos exámenes clínicos realizados en tres lugares durante los meses de verano y otoño. Estos 123 donantes sanos se componían de 37 hombres y 86 mujeres de diferentes razas con edades comprendidas entre los 21 y los 68 años. La media del valor de 1,25-(OH)₂D de la muestra total (n=123) fue de 43,9 pg/mL. El intervalo de referencia de 95% estimado con un método no paramétrico (siguiendo la directriz C28-A2 de CLSI¹⁵) fue 25,1-66,1 pg/mL.

Pacientes con enfermedad renal en estado terminal

Se realizó un estudio para evaluar los niveles de 1,25-(OH)₂D que se encontrarían en una población adulta diagnosticada con enfermedad renal en estado terminal. Se recogieron y sometieron a ensayo muestras de un total de 87 voluntarios (49 hombres, 38 mujeres con edades comprendidas entre 19 y 84 años) de tres ciudades de la región central de EE.UU. El rango observado de valores de 1,25-(OH)₂D para esta muestra (n=87) fue de 1,6-17,3 pg/mL. El límite de referencia superior de 95% estimado en el procedimiento no paramétrico es de 14,2 pg/mL.

19. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ESPECÍFICAS

19.1 Precisión

DiaSorin evaluó la precisión del ensayo sobre la base de la directriz de CLSI (EP5-A).¹⁶ Se realizaron ensayos sobre tres niveles de control basados en suero humano con concentraciones de 1,25-(OH)₂-D distribuidos en todo el rango del ensayo en 25 días de ensayo a lo largo de 60 días de trabajo. Se incluyeron numerosos técnicos, así como numerosos números de lote para todos los componentes. Los resultados combinados se evaluaron según análisis de variación (ANOVA) y se resumen en la tabla siguiente.

Muestra	N	Media pg/mL	Intraensayo		Entre día		Total	
			S.D.	% CV	S.D.	% CV	S.D.	% CV
BAJA	25	25,8	1,76	6,8	3,8	14,6	4,0	15,3
MEDIA	25	41,3	3,16	7,7	4,6	11,1	5,1	12,3
ALTA	25	105,2	11,86	11,3	11,8	11,2	14,4	13,7

19.2 VERACIDAD: LA VERACIDAD DEL ENSAYO SE COMPROBÓ CON LA PRUEBA DE LINEALIDAD Y DE RECUPERACIÓN.

Linealidad (paralelismo)

DiaSorin evaluó la linealidad de disolución de forma consistente con las recomendaciones de la directriz EP6-P de CLSI.¹⁷ Se prepararon tres mezclas de muestras de suero de pacientes mediante disolución en serie con calibrador cero y se congelaron alícuotas de forma individual a -20°C. Cada muestra y disolución se sometió a ensayo en múltiples réplicas en tres días diferentes. Los valores previstos se determinaron con los valores no diluidos de cada mezcla de muestras multiplicados por el factor de dilución. Los datos se resumen a continuación y los resultados compuestos se trazan como una regresión lineal de valores previstos frente a valores observados.

Muestra nº	Dilución	Valor Previsto (pg/mL) (N=10)	Valor Medio Observado (pg/mL) (N=10)
1	NO DILUIDA	49,6	49,6
	1:2	24,8	25,3
	1:4	12,4	11,1
	1:8	6,2	4,4
2	NO DILUIDA	50,2	50,2
	1:2	25,1	24,2
	1:4	12,6	12,2
	1:8	6,3	4,6
3	NO DILUIDA	62,0	62,0
	1:2	31	31,9
	1:4	15,5	13,4
	1:8	7,8	6,2

RECUPERACIÓN

La capacidad del ensayo de recuperar cuantitativamente todo el analizado presente en las muestras clínicas se evaluó mediante la adición de diferentes cantidades de antígeno de 1,25-(OH)₂-D puro recién preparado a tres mezclas de muestras de pacientes. Se seleccionaron y sometieron a ensayo tres concentraciones y se determinó el porcentaje de recuperación. El porcentaje medio de recuperación con este método fue del 101%.

Muestra nº	Conc. inic. (pg/mL) 1,0 mL	Cantidad introducida (pg)	*Prevista (pg/mL)	Observada (pg/mL)	% recuperación
1	30,8	50,0	77,7	75,6	97
		62,5	88,9	87,2	98
		75,0	99,8	103	103
2	42,8	50,0	89,2	89,5	100
		62,5	100,3	98,9	99
		75,0	111,0	118	106
3	40,3	50,0	86,8	83,9	97
		62,5	97,9	103	105
		75,0	108,8	118	108

*El cálculo de la concentración prevista incluye el factor de dilución introducido por la solución añadida.

19.3 Sensibilidad analítica

La sensibilidad de este ensayo, definida como la cantidad más baja diferenciada de cero con 2 desviaciones de calibrador por debajo del promedio de CPM del calibrador 0 (n = 20), ha demostrado ser $\leq 2,0$ pg/mL.

19.4 Especificidad analítica

Los datos sobre reactividad cruzada del antisuero utilizado en este equipo se expresan como la relación entre la concentración de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ y la concentración de la sustancia que presenta reactividad cruzada con una inhibición del 50% de unión máxima.

Analizado	Conc. a 50% B/Bo	% reactividad cruzada
24,25 D ₃	76.420 pg/mL	<0,5
25,26 D ₃	24.330 pg/mL	<0,5
25 D ₃	>>>1 mg/mL	<0,5

19.5 SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

Se realizó un estudio de interferencias para determinar si un nivel elevado de endógenos comunes pueden afectar negativamente a los resultados del ensayo. La evaluación era coherente con las directrices de CLSI (EP7-P).¹⁸ Se probaron tres muestras basadas en suero humano con nivel bajo, medio y alto de $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ con adición de la sustancia en prueba o como controles, añadiendo volúmenes idénticos del vehículo de la sustancia de prueba. Se realizaron dos extracciones de cada muestra lo que generó cuatro réplicas. Los resultados presentados a continuación demuestran que ninguna de las sustancias probadas produjo interferencias, como se determinó en las pruebas estadísticas de ANOVA (intervalo de confianza de 95%), o por el valor medio de las muestras añadidas que sobrepasan los rangos de desviación de calibrador en ± 2 halladas para los controles.

Bilirrubina

Muestra n°	Media de control (pg/mL)	Rango de control 2 SD	Media bilirrubina (pg/mL)	Interferencia ANOVA
Baja	19,9	18,5-21,3	19,5	0,54
Media	31,7	27,7-35,7	29,9	0,22
Alta	79,7	63,5-95,9	83,2	0,45

Colesterol

Muestra n°	Media de control (pg/mL)	Rango de control 2 SD	Media de colesterol (pg/mL)	Interferencia ANOVA
Baja	19,9	18,5-21,3	19,4	0,64
Media	31,7	27,7-35,7	29,7	0,15
Alta	79,7	63,5-95,9	75,2	0,40

Triglicéridos

Muestra nº	Media de control (pg/mL)	Rango de control 2 SD	Media de triglicéridos (pg/mL)	Interferencia ANOVA
Baja	14,7	12,9-16,5	15,1	0,88
Media	30,4	22,4-38,4	33,4	0,25
Alta	92,6	69,5-116,9	95,4	0,68

Hemoglobina

Muestra nº	Media de control (pg/mL)	Rango de control 2 SD	Media de hemoglobina (pg/mL)	Interferencia ANOVA
Baja	21,5	17,5-25,5	20,8	0,53
Media	38,6	35,4-41,8	40,0	0,43
Alta	112,7	101,4-124,0	120,6	0,17

Urea

Muestra nº	Media de control (pg/mL)	Rango de control 2 SD	Media de urea (pg/mL)	Interferencia ANOVA
Baja	25,1	20,9-29,3	26,6	0,39
Media	36,2	23,8-48,6	35,9	0,96
Alta	120,1	97,4-142,8	118,6	0,82

CONSULTE LA BIBLIOGRAFÍA EN LA ÚLTIMA PÁGINA.

PROGRAMA DEL ENSAYO

1. Los calibradores, controles y desconocidos se reconstituyen con etanol 95% y trazador tras el paso de secado del procedimiento de columna.
2. Suministre los reactivos según el siguiente programa:

Tubos/Reactivos	Cuentas totales	NSB	CAL 0-5	Controles y muestras desconocidas
Calibradores reconstituidos	-	-	75 µL	-
Controles y muestras desconocidas reconstituidos	-	-	-	75 µL
Etanol 95% y trazador **	75 µL	75 µL	-	-
Tampón NSB	-	300 µL	-	-
Antisuero 1,25-(OH) ₂ -D	-	-	300 µL	300 µL

NOTA: Los tubos de cuentas totales y NSB se crean mediante la adición de 50 µL de etanol 95% con 125 µL de trazador y la dosificación de 75 µL de esta mezcla en tubos de ensayo duplicados.

3. Mezcle bien; incube durante 2 horas (+/- 15 minutos) a 20-25°C.
4. Suministre 500 µL de reactivo de precipitación GAR en todos los tubos salvo en los de cuentas totales.
5. Mezcle bien; incube durante 20 minutos (+/- 5 minutos) a 20-25°C.
6. Centrifugue con 1800 x g* durante 20 minutos a 20-25°C.
7. Decante los sobrenadantes.
8. Cuente cada tubo en un contador gamma durante 1 minuto.

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

KIT ¹²⁵I RIA 1,25-DIIDROSSIVITAMINA D

1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Il kit ¹²⁵I RIA 1,25-Diidrossivitamina D per l'analisi radioimmunologica ad equilibrio competitivo serve per la determinazione quantitativa di 1,25-diidrossivitamina D (1,25-(OH)₂-D) nel siero umano o plasma EDTA, nonché per la valutazione della carenza di 1,25-(OH)₂-D nei casi di affezioni renali. 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

La vitamina D deriva da due fonti: fonte esogena (dietetica) e fonte endogena (biosintesi, regolata dall'esposizione alla luce ultravioletta). La fonte esogena, o nutritiva, comprende cibi contenenti per loro natura bassi livelli di vitamina D₂ (ad esempio, latte, burro, cereali arricchiti di D₂), supplementi nutrizionali sotto forma di vitamine da banco e formulazioni terapeutiche delle vitamine D₂.¹ La vitamina D non è di per sé attiva quando entra in circolazione per vie dietetiche o fotochimiche. L'attività biologica è attivata da una serie complessa di fasi metaboliche.²

È noto che l'attivazione metabolica della vitamina D è un processo complesso, soggetto ad un'alterazione estensiva dovuta a variabili quali la presenza di calcio e fosforo nella dieta, il livello di carenza di vitamina D, deficienze di natura genetica, concentrazioni dell'ormone paratiroideo, esposizione alla luce ultravioletta e livello della funzione renale.³ La biosintesi delle forme diidrossilate della vitamina D₃ inizia con l'azione della luce ultravioletta su 7-deidrocolesterolo per la formazione della vitamina D₃ nella pelle. Quando la vitamina D₃ entra in circolazione, essa viene rapidamente assorbita dal fegato dove viene metabolizzata in 25-idrossivitamina D₃ (25-OH-D₃). Nel fegato, inoltre, avviene l'idrossilasi della vitamina D₂ ricavata dal cibo in 25-idrossivitamina D₂ (25-OH-D₂).^{2,4}

Successivamente all'idrossilazione epatica, 25-OH-D viene trasportato assieme alla proteina di legame della vitamina D nei reni dove avviene una successiva azione di idrossilazione. L'aggiunta di un idrossile nella posizione 1 produce 1,25-diidrossivitamina D (1,25-(OH)₂-D). La 1,25-diidrossivitamina D è il metabolita naturale più potente finora scoperto, e la sua produzione è strettamente regolata da concentrazioni di calcio in siero, fosforo e dall'ormone paratiroideo. In periodi di deficienza di calcio, 1,25-(OH)₂-D è il metabolita di vitamina D più importante prodotto dai reni.^{5,6}

Ciò è dovuto al suo ruolo essenziale di assorbimento attivo ed efficace di calcio e fosforo, nonché al normale metabolismo di queste sostanze. Perciò, la misurazione di 1,25-(OH)₂-D si sta affermando come uno strumento efficace per l'individuazione di malattie e condizioni che interessano il normale metabolismo di fosforo e calcio.^{7,8,9}

3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'analisi DiaSorin 1,25-(OH)₂-D prevede una procedura a due fasi. È prevista una estrazione preliminare e successiva purificazione dei metaboliti della vitamina D dal siero o dal plasma EDTA mediante l'impiego di cartucce C₁₈OH.¹⁰ Dopo l'estrazione, il campione trattato viene analizzato usando una procedura RIA competitiva. Il metodo RIA si basa su un anticorpo policlonale che è specifico sia per 1,25-(OH)₂-D₂ sia per 1,25-(OH)₂-D₃. Il campione, l'anticorpo e il tracciante vengono incubati per due ore 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. Dopo la centrifugazione e la decantazione, la frazione legata che rimane nel precipitato viene misurata con un contatore a raggi gamma. I valori sono calcolati direttamente con una curva di calibrazione di concentrazioni note. La concentrazione finale di 1,25-(OH)₂-D nei campioni di siero e plasma EDTA è espressa in pg/mL.

4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

TAMPONE NSB 1,25-(OH) ₂ D	1 fiala/3 mL
CALIBRATORE O 1,25-(OH) ₂ D	1 fiala/20 mL
CALIBRATORI 1-5 1,25-(OH) ₂ D ₃	5 fiale/3 mL
ANTISIERO 1,25-(OH) ₂ D	1 flacone/35 mL
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 fiala/10 mL
SOLUZIONE PRETRATTANTE 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 flacone/50 mL
COMPLESSO PRECIPITANTE 1,25-(OH) ₂ D GAR	2 fiale/35 mL
SIERO DI CONTROLLO 1,25-(OH) ₂ D	2 fiale/3 mL
ETANOLO AL 95%	1 fiala/7 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. Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Conservare tutti i reagenti ricostituiti a -15°C o a temperatura inferiore immediatamente dopo l'uso. Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

4.1 Tampone NSB 1,25-(OH)₂D: Reagente pronto all'uso

Tampone gelatina-potassio fosfato contenente ProClin® 300 (< 0,2%).

4.2 Calibratore 0 1,25-(OH)₂D: Reagente pronto all'uso

Tampone fosfato contenente proteine di siero bovino e ProClin 300 (< 0,2%).

4.3 Calibratori (1-5) 1,25-(OH)₂D₃: Reagente liofilizzato

Cinque calibratori liofilizzati (1,25-(OH)₂D₃) a concentrazioni varianti fra 5 - 200 pg/mL contenenti siero umano e ProClin 300 (<0,2%). Ricostituire ogni calibratore con 3,0 mL di calibratore zero. Le concentrazioni esatte sono indicate sulle etichette delle fiale. I calibratori di questo kit sono calibrati mediante determinazione quantitativa UV. 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.

4.4 Antisiero 1,25-(OH)₂D: Reagente pronto all'uso

Siero di coniglio anti-1,25-(OH)₂D diluito in un tampone gelatina-fosfato contenente ProClin 300 (<0,2%).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃ Reagente pronto all'uso

Analogo radio-iodato 1,25-(OH)₂D₃ diluito in un tampone fosfato-glicole etilenico.

4.6 Soluzione pretrattante 1,25-(OH)₂D₃: Reagente pronto all'uso

Tampone potassio fosfato.

4.7 Controlli 1,25-(OH)₂D: Livello 1 (Normale), Livello 2 (Elevato): Reagente pronto all'uso

Pool di siero umano elaborato, contenente ProClin 300 (<0,2%), a cui sono state aggiunte le quantità necessarie di 1,25-(OH)₂D per ottenere concentrazioni di controllo nei range specificati. Il Controllo 1 indica un range normale, mentre il Controllo 2 indica un range elevato. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili.

4.8 Complesso precipitante GAR (Goat Anti-Rabbit, Capra Anti-coniglio): Reagente liofilizzato

Il normale siero di coniglio, pre-precipitato con siero di capra anti-coniglio e glicole polietilenico (PEG), è diluito in un tampone BSA-borato con 0,1% sodio azide ed altri conservanti aggiunti (liofilizzati). Ricostituire la fiala con 35 mL di acqua distillata o deionizzata; agitare bene fino a quando la sospensione si presenta omogenea e lasciare riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente agitando di tanto in tanto.

4.9 Etanolo al 95%: Reagente pronto all'uso
95% di etanolo e 5% di acqua.

NOTA: Per questa procedura è necessario anche l'uso delle cartucce C₁₈OH. Le cartucce devono essere ordinate separatamente alla DiaSorin facendo riferimento al numero di catalogo 65101E.

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 o istituti di ricerca. I test devono essere eseguiti unicamente da personale di laboratorio qualificato e adeguatamente addestrato.

REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA

Trattare come potenzialmente infettivi.

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. 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.

Frase 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 ETANOLO

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

R11 - Highly Flammable (altamente infiammabile)

S16 - Keep away from sources of ignition - No smoking (Tenere lontano da fonti di ignizione - 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 5,5 μCi (204kBq) 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.
- 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. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL SIERO E DEL PLASMA

Per l'utilizzo del kit 1,25-Diidrossivitamina D sono richiesti 500 µL di siero o plasma EDTA per eseguire l'estrazione; un volume di 1,5 mL 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. Per questa analisi si può usare anticoagulante EDTA. 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. Per il siero, 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 -15°C o a temperatura inferiore. I campioni non devono essere congelati e scongelati più volte. Tuttavia, uno studio eseguito da DiaSorin non ha indicato alcun cambiamento significativo nei valori dopo 3 cicli di congelamento-scongelo dei campioni. I campioni sono stati conservati per un periodo di 6 mesi a -15°C o temperature inferiori senza presentare cambiamenti significativi nei risultati.

8. ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI, NON FORNITI IN DOTAZIONE

- 8.1 Cartucce C₁₈OH (24 cartucce) ordinabili separatamente con riferimento al numero di catalogo 65101E.
- 8.2 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm e 13 x 100 mm.
- 8.3 Portaprovette.
- 8.4 Pellicola o equivalente per coprire le provette.
- 8.5 Portaprovette con alloggiamento in schiuma per la decantazione (o materiale equivalente).
- 8.6 Centrifuga in grado di contenere 12 provette da 75 mm e raggiungere 1800 x g*.
- 8.7 Contatore a raggi gamma in grado di contare ¹²⁵I.
- 8.8 Mixer Vortex.
- 8.9 Dispositivi per operazioni con pipetta:
 - a. Micropipette dosatrici calibrate per inviare 75 µL, 300 µL e 500 µL.
 - b. Dosatori a ripetizione in grado di inviare 50 µL, 300 µL e 500 µL.
 - c. Pipette volumetriche per la ricostituzione dei calibratori, 3,0 mL.
- 8.10 Acqua distillata o deionizzata.

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

- 8.11 Solventi organici:**
Sono richiesti i seguenti solventi per la preparazione e l'estrazione dei campioni.
Usare solo solventi di grado HPLC.
Non esporre nessun solvente organico ad oggetti in vetro lavati in acidi o a qualsiasi altra condizione acida.
- Acetonitrile.
 - Metanolo.
 - Esano. (IMPORTANTE: la percentuale di n-esano deve essere superiore del 95%)
 - Cloruro di metilene (**non** deve contenere alcool come conservante).
 - Isopropanolo (2-propanolo).
- 8.12** Dispositivo consigliato per le cartucce C₁₈OH:
- Stazione di trattamento dei campioni Vac Elut. Tratta 24 colonne per analisi. Disponibile presso Analytichem International o DiaSorin. Per ordinare da DiaSorin, indicare il numero di catalogo 11610.
- 8.13** Materiali necessari per asciugare i campioni:
- Azoto.
 - Collettore essiccante completo di blocco riscaldante a 37°C (±2°C) o bagno di acqua:
N-EVAP o MULTI-VAP disponibile presso Organomation Associates (Berlin, MA) o Reacti-Vap II e Reacti-Therm III disponibile presso Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

9. PREPARAZIONE DEI SOLVENTI ORGANICI PER L'ESTRAZIONE IN COLONNA

NOTA: Le miscele di solventi organici devono essere preparate prima di iniziare la procedura di estrazione preliminare.

PRECAUZIONI:

Preparare le miscele di solventi come descritto nella TABELLA I; DiaSorin consiglia la preparazione di un volume di 500 mL. Si possono preparare volumi maggiori o inferiori a condizione che le proporzioni siano costanti. I volumi, tuttavia, devono essere sufficientemente abbondanti da ridurre l'errore di misurazione. Per ottenere i migliori risultati, misurare ogni solvente separatamente.

PRECAUZIONI:

Dove richiesto, usare acqua distillata o deionizzata.

TABELLA I
Preparazione del solvente

Miscela di solvente	Materiali	1 L	500 mL
70:30	metanolo acqua	700 mL 300 mL	350 mL 150 mL
90:10	esano cloruro di metilene	900 mL 100 mL	450 mL 50 mL
99:1	esano IPA	990 mL 10 mL	495 mL 5 mL
92:8	esano IPA	920 mL 80 mL	460 mL 40 mL

10. PROCEDURA DI ESTRAZIONE PRELIMINARE

- 10.1 Ricostituire ogni calibratore liofilizzato con 3,0 mL di calibratore zero. Mescolare bene i calibratori e lasciar riposare per 15 - 20 minuti per garantire la completa ricostituzione. Scongela completamente eventuali reagenti congelati. Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C. Mescolare bene tutti i reagenti prima dell'uso.
- 10.2 Iniettare con pipetta 500 µL di calibratore (0-5), controllo e campione in 12 provette da 75 mm in vetro borosilicato etichettate.
- 10.3 Aggiungere 500 µL di acetonitrile in ogni campione; agitare ad intermittenza nel Vortex, almeno 3 volte, per un tempo di 10 minuti.
- 10.4 Centrifugare le provette a 760 x g* per 10 minuti a 20 - 25°C.
- 10.5 Far decantare i liquidi superficiali del campione in 12 provette etichettate da 75 mm o 13 provette da 100 mm (a seconda delle preferenze); scartare i precipitati.
- 10.6 Aggiungere 500 µL di soluzione pretrattante in ogni provetta e agitare nel Vortex.
NOTA: Questo kit serve per eseguire fino a 48 estrazioni complete con calibratori e controlli, più 40 campioni non noti. Ciò significa che si possono estrarre 24 campioni immediatamente su VacElut e la serie rimanente di 24 campioni può essere estratta successivamente. Le estrazioni in colonna devono essere eseguite al più presto possibile dopo l'aggiunta del pretrattante. Tuttavia, una volta estratti in colonna, i campioni possono essere conservati per 96 ore a -15°C o a temperatura inferiore.
- 10.7 I campioni sono pronti per essere versati nelle cartucce C₁₈OH.

11. PROCEDURA PER LA COLONNA

- 11.1 Per una descrizione del VAC ELUT, consultare la relativa Guida per l'utente. Montare la stazione come da istruzioni.
- 11.2 Etichettare 13 provette in vetro borosilicato da 100 mm per ogni calibratore (0-5), controllo e campione non noto. Inserire le provette nel VAC ELUT. Controllare che il coperchio del VAC ELUT sia in posizione "WASTE" e che le provette siano disposte in modo da raccogliere gli eluati richiesti. Porre le cartucce C₁₈OH sul coperchio del VAC ELUT.
- 11.3 Aggiungere le miscele di solvente alle cartucce specifiche come descritto nella TABELLA II.

IMPORTANTE:

Uso del vuoto:

Azionare il vuoto dopo ogni aggiunta di solvente e lasciare che la miscela del solvente passi **completamente** nella cartuccia prima di trattare il solvente successivo. Azionare e spegnere il vuoto seguendo le indicazioni date nella TABELLA II (è possibile spegnere il vuoto prima di aggiungere ogni solvente). Il vuoto deve essere regolato a 10 pollici (254 mm di Hg) o a un valore inferiore. Eluire ogni miscela di solvente attraverso l'apertura "WASTE" e nei relativi contenitori per rifiuti fino a giungere alla fase finale di raccolta.

*g = (1118 x 10⁻⁸) (raggio in cm) (rpm)²

Applicazione dei campioni:

I campioni possono essere fatti decantare direttamente nella cartuccia o iniettati con una pipetta.

Non permettere che le cartucce si asciugino all'aria per più di 5 minuti fra le applicazioni.

Pretrattamento della cartuccia C₁₈OH:

Le cartucce C₁₈OH devono essere lavate con 5 mL di 90:10 (esano: cloruro di metilene), 5 mL di IPA e 5 mL di metanolo prima del primo utilizzo. La miscela di solvente 90:10 (esano: cloruro di metilene) può essere preparata misurando 900 mL di esano e 100 mL di cloruro di metilene. Inserire le nuove cartucce intatte nel dispositivo VAC ELUT, regolare sulla posizione "WASTE" ed aggiungere 5 mL di 90:10 (esano: cloruro di metilene) e quindi 5 mL di IPA in ogni colonna, infine 5 mL di metanolo. Lasciare che ogni miscela di solvente passi completamente attraverso le cartucce prima di procedere con la miscela successiva. Dopo questa preparazione iniziale, non sarà più necessario ripetere questa operazione in quanto le cartucce verranno rigenerate durante la procedura di estrazione.

NOTA: Se si devono estrarre altri campioni (più di 24), rigenerare le cartucce utilizzando lo stesso metodo descritto nella TABELLA II. Le cartucce possono essere riutilizzate fino a 30 volte.

NOTA: Il materiale che compone la cartuccia C₁₈OH è tenuto assieme da un composto in fibra porosa. Scartare le cartucce con vetri porosi mal posizionati o mancanti al fine di evitare la perdita di materiale C₁₈OH.

TABELLA II

Descrizione dell'analisi di estrazione	Fasi di estrazione	Utilizzo dell'eluente
Preparazione/Rigenerazione nella colonna Rimuove: sostanze interferenti dall'utilizzo precedente (fase 1)	1. Aggiungere 1 mL di metanolo, azionare il vuoto. 2. Spegnerne il vuoto.	Scartare "WASTE"
Applicazione del campione	3. Applicare tutti i campioni, azionare il vuoto. Vedere procedura di estrazione preliminare (fase 10).	Scartare "WASTE"
Purificazione/Rimozione dei metaboliti della vitamina D Rimuove: Lipidi polari interferenti, sali e pigmenti (fase 4) 25(OH)D (Fase 5) 25(OH)D e 24,25(OH) ₂ D/25,26(OH) ₂ D rimanente (fase 6)	4. Aggiungere 5 mL di 70:30 metanolo/acqua (deionizzata o distillata). 5. Aggiungere 5 mL di 90:10 esano/cloruro di metilene. 6. Aggiungere 5 mL di 99:1 esano/isopropanolo. 7. Spegnerne il vuoto.	Scartare "WASTE"
Raccolta di 1,25-(OH)₂D Eluizione di 1,25-(OH) ₂ D purificato (fase 9)	IMPORTANTE! 8. Azionare il Vac Elut per "Collect:" (raccogliere) 9. Aggiungere 3 mL di 92:8 esano/isopropanolo e azionare il vuoto. 10. Spegnerne il vuoto.	"COLLECT"

12. ESSICCAZIONE E RICOSTITUZIONE DEGLI ELUATI

- 12.1** Disporre le provette contenenti gli eluati in un blocco riscaldante o in bagno di acqua a 37°C (±2°C) per l'essiccazione.
- 12.2** Essiccare gli eluati sotto una cappa utilizzando azoto a 2-4 psi (tempo di essiccazione 20-30 minuti).
- 12.3** Togliere le provette immediatamente dopo l'essiccazione degli eluati.
- 12.4** Ricostituire ogni estratto essiccato con 50 µL di etanolo al 95%; agitare nel vortex a velocità bassa o media. Aggiungere 125 µL di tracciante nelle stesse provette contenenti 50 µL di etanolo al 95%, agitare delicatamente nel vortex a una velocità bassa o media. **NOTA:** Le operazioni con il vortex sono molto importanti per garantire una adeguata ricostituzione dei campioni e per ottenere una buona precisione. **ATTENZIONE:** Tenere il vortex nella parte più bassa della provetta per evitare perdita di volume del campione che servirà a garantire un volume sufficiente di prelievo con pipetta per l'analisi. Etichettare una provetta supplementare per il Conteggio totale e una provetta per NSB. Aggiungere 50 µL di etanolo al 95% e 125 µL di tracciante in entrambe le provette. Queste provette verranno usate per ottenere il TC (Total Count, Conteggio totale) e una seconda serie di provette NSB per la configurazione dell'analisi.

- 12.5 Eseguire l'analisi **immediatamente** dopo la ricostituzione dei campioni. Per ottenere i migliori risultati quando si eseguono analisi più estese, ricostituire 12 - 15 campioni alla volta e quindi iniettare con pipetta prima di ricostituire i 12 - 15 campioni successivi.

13. PROCEDURA DI ANALISI

- 13.1 Preparare ed etichettare due serie di 12 provette da 75 mm in vetro borosilicato monouso per ogni calibratore (0-5), controllo e campione in base allo schema di analisi. Con cautela, aggiungere 75 µL il calibratore ricostituito, controllo ed estratti di campione nella seconda serie di provette.
ATTENZIONE: Questa fase deve essere eseguita con cautela, in quanto ci sono solo 25 µL di eccedenza in ogni provetta.
- 13.2 Fare riferimento alla fase 4 di "Essiccazione e ricostituzione degli eluati". Aggiungere 75 µL dalla provetta TC (Total Count, Conteggio totale) nella seconda serie di provette. Ripetere questa operazione anche per la seconda serie di provette NSB.
- 13.3 Aggiungere 300 µL di tampone NSB nelle provette NSB.
- 13.4 Aggiungere 300 µL di anticorpo primario in tutte le provette, eccetto per le provette per i conteggi totali e NSB.
- 13.5 Mescolare bene; lasciare in incubazione per 2 ore (± 15 minuti) a 20 - 25°C.
NOTA: Ricostituire il complesso precipitante GAR con 35 mL di acqua distillata o deionizzata, mescolare completamente fino a quando la sospensione si presenta omogenea, quindi lasciar riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente prima dell'uso mescolando occasionalmente prima e durante l'uso.
- 13.6 Aggiungere 500 µL di complesso precipitante GAR ben mescolato in tutte le provette, eccetto le provette per il Conteggio totale. Lasciare in incubazione per 20 minuti (± 5 minuti) a 20 - 25°C.
- 13.7 Centrifugare tutte le provette per 20 minuti a 20 - 25°C a 1800 x g*, eccetto le provette per il Conteggio totale.
- 13.8 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.
- 13.9 Misurare con un contatore a raggi gamma la radioattività contando tutte le provette per 1 minuto. Le provette devono essere contate per almeno 1 minuto (vedere la sezione: Limiti della procedura).

14. COMMENTI ALLA PROCEDURA

- 14.1 Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.
- 14.2 Proporzioni corrette di solvente sono indispensabili per un buon recupero. Preparare le soluzioni in volumi sufficientemente abbondanti in modo da ridurre errori di misurazione.
- 14.3 Se un campione dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere analizzato nuovamente diluendolo con il calibratore 0 prima dell'estrazione. I risultati dovranno essere moltiplicati per il fattore di diluizione appropriato. Ad esempio, mescolare 500 µL di campione con 500 µL di calibratore 0, quindi analizzare 500 µL della miscela come da istruzioni allegate.

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

- 14.4** Non è stata osservata alcun drift nel tempo medio necessario per eseguire l'analisi di 100 provette.
- 14.5** 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) delle provette del calibratore 0/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
 - c. Legame non specifico
CPM medio delle provette NSB/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
 - d. Pendenza della curva di calibrazione
Si può monitorare la soppressione al 50%.

15. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due controlli (uno a livello normale ed uno a livello elevato) 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 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.^{12, 13, 14}

16. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di analisi 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/B₀ rispetto alla concentrazione logaritmica basata su un programma di retta curvilinea uniforme.

16.1 Calcolo della percentuale B/B₀

- a. Calcolare il CPM medio per ogni calibratore, controllo e campione non noto.
- b. Sottrarre il CPM medio delle provette NSB da tutti i conteggi.
- c. Dividere il CPM corretto di ogni calibratore, controllo o campione non noto per il CPM medio corretto del calibratore 0 e moltiplicare per 100.

$$\frac{\text{CPM medio (Calibratore o Campione non noto)} - \text{CPM medio (NSB)}}{\text{CPM medio (Calibratore 0)} - \text{CPM medio (NSB)}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

16.2 Uso della curva del calibratore

- a. Utilizzando carta millimetrata per modello log-logit o semi-logaritmica a due cicli, tracciare la percentuale di B/B₀ (%) per i calibratori 1,25 (OH)₂D sull'asse delle ordinate (asse Y) e la concentrazione del calibratore sull'asse delle ascisse (asse X).

NOTA: Si possono usare programmi di riduzione automatica dei dati per analizzare i dati. DiaSorin utilizza Multi-Calc (Pharmacia) con un programma *LIN-LOG* a CURVA uniforme. Altri metodi di riduzione dei dati devono essere convalidati prima di includerli nell'uso regolare.

- b. Tracciare una linea di miglior interpolazione fra i punti.
- c. Interpolare i livelli di 1,25-(OH)₂D nei campioni dal tracciato dei calibratori.
- d. Se è stato diluito un campione non noto, correggere con il fattore di diluizione idoneo.
- e. Il range riferibile dell'analisi è da 5,0 pg/mL a 200 pg/mL. Un valore inferiore al calibratore più basso, 5,0 pg/mL, è un valore estrapolato e può essere indicato come "less than 5 pg/mL" (inferiore a 5 pg/mL).
- f. Calcolare il legame massimo dividendo il CPM del calibratore 0 per la media dei conteggi totali ottenuta nelle provette dei conteggi totali.

I dati di campioni tipici per 1,25-(OH)₂D RIA sono indicati nella TABELLA IV e nella FIGURA 1; queste informazioni servono solo a scopo di riferimento e non devono essere usate per il calcolo dei valori.

TABELLA IV
Dati campione DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA

Provetta	Duplicato CPM	Media CPM	CPM corretto	Percent. Bound (B/T)	Percent. (B/B ₀)	Conc. (pg/mL)
Conteggio totale	40.792 40.578	40.685				
NSB	1.438 1.439	1.439		3,5		
Calibratore 0	18.006 18.119	18.063	16.624	44,4	100,0	
Calibratori (pg/mL)						
1 (5,0)	16.710 16.770	16.740	15.302		92,0	
2 (15,0)	14.941 14.916	14.929	13.490		81,2	
3 (30,0)	13.087 13.124	13.106	11.667		70,2	
4 (75,0)	9.820 9.765	9.793	8.354		50,2	
5 (200)	6.412 6.464	6.438	5.000		30,0	
Controlli						
Livello 1: range normale	13.275 13.530	13.403	11.964		72,0	27,3
Livello 2: range elevato:	8.206 8.124	8.165	6.727		40,5	119

Curva campione di calibratore DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA

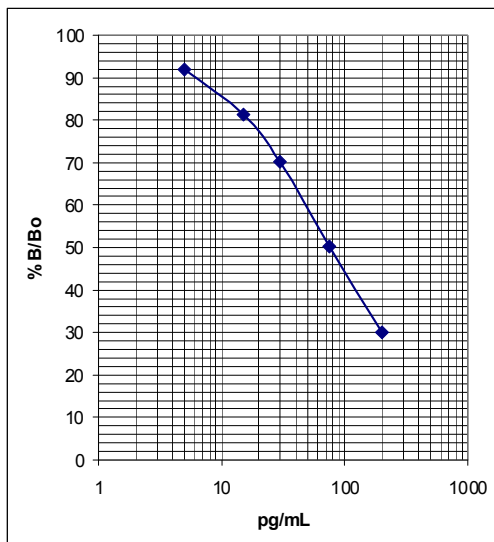


FIGURA 1

RIDUZIONE DEI DATI

Il Laboratorio di controllo di qualità DiaSorin QC utilizza una retta curvilinea uniforme.

17. LIMITI DELLA PROCEDURA

- 17.1 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire l'introduzione di un errore dovuto ad inaccuratezza del contatore (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%, 10.000 CPM produrrà un errore dell'1%).
- 17.2 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.
- 17.3 Le caratteristiche di efficacia di questa analisi non sono state studiate sulla popolazione pediatrica.

18. VALORI PREVISTI

Intervallo di riferimento per donatori normali

È importante che ogni laboratorio stabilisca un intervallo di riferimento proprio, rappresentativo della sua popolazione tipica. Tuttavia, sono stati raccolti valori di 1,25-(OH)₂D sulla base di 123 volontari apparentemente sani di tre città centro-occidentali degli Stati Uniti in un trial clinico condotto in tre siti nei mesi estivi e autunnali. Questi 123 donatori sani erano composti da un gruppo di 37 uomini e 86 donne di razze diverse, di età media fra 21 e 68 anni. Il valore medio di 1,25-(OH)₂D dell'intero campione (n=123) è stato di 43,9 pg/mL. Il 95% dell'intervallo di riferimento valutato con metodo non parametrico (in base alle linee guida CLSI C28-A2¹⁵) è stato di 25,1-66,1 pg/mL.

Pazienti con insufficienza renale allo stadio finale

È stato eseguito un trial clinico al fine di valutare i livelli di 1,25-(OH)₂D che normalmente si trovano in una popolazione adulta con diagnosi di insufficienza renale allo stadio finale.

Sono stati prelevati e analizzati campioni da un totale di 87 volontari (49 uomini, 38 donne, di età compresa fra 19 e 84anni) di tre città centro-occidentali degli Stati Uniti. Il range osservato dei valori di 1,25-(OH)₂D per questo campione (n=87) è stato di 1,6-17,3 pg/mL. Il 95% del limite superiore di riferimento valutato con procedura non parametrica è di 14,2 pg/mL.

19. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

19.1 Precisione

La precisione delle analisi è stata valutata dalla DiaSorin sulla base dei principi delle Linee guida CLSI (EP5-A).¹⁶ Sono stati analizzati tre livelli di controllo basati su siero umano con concentrazioni di 1,25-(OH)₂-D distribuiti nel range di analisi che comprendono 25 analisi in oltre 60 giorni operativi. Per tutti i componenti hanno operato più tecnici, e sono inoltre stati inclusi più numeri di lotto. I risultati combinati sono stati valutati in base all'analisi della varianza (ANOVA) e riepilogati nella tabella seguente.

Campione	N	In un ciclo di analisi			Fra giorni		Totale	
		pg/mL medio	D.S.	% CV	D.S.	% CV	D.S.	% CV
BASSO	25	25,8	1,76	6,8	3,8	14,6	4,0	15,3
MEDIO	25	41,3	3,16	7,7	4,6	11,1	5,1	12,3
ALTO	25	105,2	11,86	11,3	11,8	11,2	14,4	13,7

19.2 ACCURATEZZA: L'ACCURATEZZA DELL'ANALISI È STATA CONTROL-LATA MEDIANTE TEST DI LINEARITÀ E TEST DI RECUPERO.

Linearità (Parallelismo)

La linearità di diluizione è stata considerata da DiaSorin coerente con le raccomandazioni delle Linee guida CLSI, EP6-P.¹⁷ Sono stati preparati tre gruppi di campioni di siero mediante diluizione seriale con calibratore 0 e parti sono state congelate a -20°C. Ogni campione e ogni diluizione è stato analizzato più volte in tre date diverse. I valori previsti sono stati stabiliti in base ai valori di ogni gruppo di campioni non diluito moltiplicato per il fattore di diluizione. I dati sono riepilogati di seguito e i risultati compositi tracciati sotto forma di regressione lineare di Valore previsto rispetto a Valore osservato.

N. campione	Diluizione	Valore Previsto (pg/mL) (N=10)	Valore Medio Osservato (pg/mL) (N=10)
1	NON DILUITO	49,6	49,6
	1:2	24,8	25,3
	1:4	12,4	11,1
	1:8	6,2	4,4
2	NON DILUITO	50,2	50,2
	1:2	25,1	24,2
	1:4	12,6	12,2
	1:8	6,3	4,6
3	NON DILUITO	62,0	62,0
	1:2	31	31,9
	1:4	15,5	13,4
	1:8	7,8	6,2

RECUPERO

La capacità di recuperare quantitativamente tutti gli analiti presenti nei campioni clinici è stata valutata mediante aggiunta di quantità diverse di antigene puro 1,25-(OH)₂-D appena preparato in tre gruppi di campioni. Sono state scelte e analizzate in duplice copia tre concentrazioni, quindi è stata stabilita la percentuale di recupero. La percentuale media di recupero in base a questo metodo è stata di 101%.

N. Campione	Conc. iniziale (pg/mL) 1.0 mL	Quantità aggiunta (pg)	*Previsto (pg/mL)	Osservato (pg/mL)	% di recupero
1	30,8	50,0	77,7	75,6	97
		62,5	88,9	87,2	98
		75,0	99,8	103	103
2	42,8	50,0	89,2	89,5	100
		62,5	100,3	98,9	99
		75,0	111,0	118	106
3	40,3	50,0	86,8	83,9	97
		62,5	97,9	103	105
		75,0	108,8	118	108

*Il calcolo della concentrazione prevista comprende il fattore di diluizione introdotto dalla soluzione che viene aggiunta.

19.3 Sensibilità analitica

La precisione di questa analisi, se definita come quantità minore differenziata da zero, a 2 deviazioni del calibratore sotto il CPM medio del calibratore zero (n=20), si è dimostrata essere ≤ 2.0 pg/mL.

19.4 Specificità analitica

I dati sulla reattività incrociata dell'antisiero utilizzato in questo kit sono espressi come rapporto di concentrazione di 25-OH₂D₃ rispetto alla concentrazione della sostanza reagente incrociata al 50% di inibizione del legame massimo.

Analita	Conc. A 50% B/Bo	% di reattività incrociata
24,25 D ₃	76.420 pg/mL	<0,5
25,26 D ₃	24.330 pg/mL	<0,5
25 D ₃	>>>1 mg/mL	<0,5

19.5 Sostanze interferenti

È stato eseguito uno studio sull'interferenza per stabilire se livelli elevati di sostanze endogene comuni possono influire negativamente sui risultati dell'analisi. La valutazione si è basata sulle Linee guida CLSI (EP7-P).¹⁸ Sono stati testati tre campioni di siero umano contenenti livelli bassi, medi o elevati di 1,25-(OH)₂-D₃ con aggiunta o di una sostanza di prova o controllo a cui sono stati aggiunti volumi identici di una sostanza veicolo di prova. Ogni campione è stato estratto due volte ottenendo così quattro replicati. I risultati indicati di seguito dimostrano che non c'è stata alcuna interferenza da parte di nessuna delle sostanze testate, come stabilito da prove statistiche ANOVA (95% di intervallo di certezza), o dal valore medio dei campioni che superava ± 2 intervalli di deviazione del calibratore trovati per i controlli.

Bilirubina

N. campione	Media controllo (pg/mL)	Intervallo di controllo di 2 dev. standard	Media bilirubina (pg/mL)	Interferenza ANOVA
Basso	19,9	18,5-21,3	19,5	0,54
Medio	31,7	27,7-35,7	29,9	0,22
Alto	79,7	63,5-95,9	83,2	0,45

Colesterolo

N. campione	Media controllo (pg/mL)	Intervallo di controllo di 2 dev. standard	Media colesterolo (pg/mL)	Interferenza ANOVA
Basso	19,9	18,5-21,3	19,4	0,64
Medio	31,7	27,7-35,7	29,7	0,15
Alto	79,7	63,5-95,9	75,2	0,40

Trigliceridi

N. campione	Media controllo (pg/mL)	Intervallo di controllo di 2 dev. standard	Media trigliceridi (pg/mL)	Interferenza ANOVA
Basso	14,7	12,9-16,5	15,1	0,88
Medio	30,4	22,4-38,4	33,4	0,25
Alto	92,6	69,5-116,9	95,4	0,68

Emoglobina

N. campione	Media controllo (pg/mL)	Intervallo di controllo di 2 dev. standard	Media emoglobina (pg/mL)	Interferenza ANOVA
Basso	21,5	17,5-25,5	20,8	0,53
Medio	38,6	35,4-41,8	40,0	0,43
Alto	112,7	101,4-124,0	120,6	0,17

Urea

N. campione	Media controllo (pg/mL)	Intervallo di controllo di 2 dev. standard	Media urea (pg/mL)	Interferenza ANOVA
Basso	25,1	20,9-29,3	26,6	0,39
Medio	36,2	23,8-48,6	35,9	0,96
Alto	120,1	97,4-142,8	118,6	0,82

FARE RIFERIMENTO ALL'ULTIMA PAGINA PER LA BIBLIOGRAFIA

SCHEMA DI ANALISI

1. I calibratori, i controlli e i campioni non noti vengono tutti ricostituiti con etanolo al 95% e tracciante dopo la fase di essiccazione.
2. Versare il reagente seguendo lo schema seguente:

Provette/Reagenti	Conteggi totali	NSB	CAL 0-5	Controlli e campioni non noti
Calibratori ricostituiti	-	-	75 µL	-
Controlli e campioni non noti ricostituiti	-	-	-	75 µL
Etanolo al 95% e tracciante**	75 µL	75 µL	-	-
Tampone NSB	-	300 µL	-	-
Antisiero 1,25-(OH) ₂ -D	-	-	300 µL	300 µL

NOTA: Le provette per il conteggio totale e NSB sono composte mediante aggiunta di 50 µL di etanolo al 95% con 125 µL di tracciante e iniettando con pipetta 75 µL di questa miscela nella seconda serie di provette.

3. Mescolare bene; lasciare in incubazione per 2 ore (+/- 15 minuti) a 20-25°C.
4. Versare 500 µL di reagente precipitante GAR in tutti i recipienti, eccetto nelle provette per il conteggio totale.
5. Mescolare bene; lasciare in incubazione per 20 minuti (+/- 5 minuti) a 20-25°C.
6. Centrifugare usando 1800 x g* per 20 minuti a 20-25°C.
7. Far decantare i liquidi superficiali.
8. Contare ogni provetta in un contatore a raggi gamma per 1 minuto.

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

1,25-DIHYDROXYVITAMIN D ¹²⁵I RIA KIT

1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

1,25-Dihydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA är en radioimmunoassay som är baserad på kompetitiv jämvikt och avsedd för kvantitativ analys av 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂-D) i humant serum eller EDTA-plasma. Den används för att påvisa brist på 1,25-(OH)₂-D i samband med njursjukdom. Testresultaten skall användas i kombination med övriga kliniska data och laboratoriedata för att underlätta för läkaren att fatta beslut om enskilda vuxna patienters behandling.

2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

D-vitaminet i kroppen kommer från två källor: det är antingen exogent (och härrör från födan) eller endogent (och härrör från biosyntes reglerad av exponeringen för ultraviolett ljus). I den exogena (näringmässiga) källan ingår livsmedel med naturligt låga halter D-vitamin₂ (t.ex. mjölk, smör, D-vitaminberikade spannmålsprodukter₂), kosttillskott i form av vanliga receptfria vitaminpreparat, samt receptbelagda terapeutiska beredningar med D₂-vitaminer.¹ D-vitamin har i sig ingen aktivitet när det kommer in i blodcirkulationen från födan eller från den fotokemiska processen; den biologiska aktiviteten uppkommer först efter en komplex serie metaboliska steg.²

Man vet nu att den metaboliska aktiveringen av D-vitamin regleras på ett komplext sätt; den påverkas i hög grad av exempelvis kostens kalcium- och fosforhalt, graden av D-vitaminbrist, genetiskt betingade bristtillstånd, halten parathormon, exponering för ultraviolett ljus och njurfunktionen.³ Biosyntesen av de dihydroxylerade formerna av vitamin D₃ börjar med att ultraviolett solljus verkar på 7-dehydrokolesterol så att D-vitamin₃ bildas i huden. När D-vitamin₃ kommer in i cirkulationen tas det snabbt upp av levern, där det metaboliseras till 25-hydroxyvitamin D₃ (25-OH-D₃). Levern hydroxylerar även D-vitamin₂ från födan till 25-hydroxyvitamin D₂ (25-OH-D₂).^{2,4}

Efter hydroxyleringen i levern binds 25-OH-D till D-vitaminbindande protein och transporteras till njuren där fortsatt hydroxylering äger rum. En hydroxylgrupp kopplas på i position 1, så att 1,25-dihydroxyvitamin D (1,25-(OH)₂-D) bildas. 1,25-dihydroxyvitamin D är den mest potenta naturligt förekommande D-vitaminmetabolit man hittills påträffat, och bildningen av den regleras noga genom serumhalterna av kalcium, fosfor och parathormon. Vid kalciumstress är 1,25-(OH)₂-D den viktigaste D-vitaminmetaboliten som bildas i njuren.^{5,6}

Det beror på att den spelar en fundamental roll för den effektiva aktiva absorptionen av kalcium och fosfor, liksom för deras normala metabolism. Följaktligen håller mätning av 1,25-(OH)₂-D snabbt på att bli ett effektivt redskap för forskningen kring sjukdomar och tillstånd som påverkar den normala fosfor- och kalciummetabolismen.^{7,8,9}

3. ANALYSPRINCIP

DiaSorin 1,25-(OH)₂-D-testet består av två steg. Först utförs en förberedande extraktion och en rening av D-vitaminmetaboliter från serum eller EDTA-plasma med hjälp av C₁₈OH-kassetter.¹⁰ Efter extraktionssteget testas det behandlade provet med hjälp av ett kompetitivt RIA-test. baserat på en polyklonal antikropp som är specifik för både 1,25-(OH)₂D₂ och 1,25-(OH)₂D₃. Prov, antikroppar och spårämne inkuberas i 2 timmar 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 centrifugering och dekantering räknas den kvarvarande bundna fraktionen i pelletten i gammarräknare. Värdena beräknas direkt från en kalibreringskurva med kända halter. Den slutliga halten 1,25-(OH)₂D i proverna anges i pg/mL.

4. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

1,25-(OH) ₂ D NSB-BUFFERT	1 flaska à 3 mL
1,25-(OH) ₂ D KALIBRERINGSLÖSNING O	1 flaska à 20 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ KALIBRERINGSLÖSNING 1-5	5 flaskor à 3 mL
1,25-(OH) ₂ D ANTISERUM	1 flaska à 35 mL
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 flaska à 10 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ FÖRBEHANDLINGSLÖSNING	1 flaska à 50 mL
1,25-(OH) ₂ D GAR UTFÄLLNINGSKOMPLEX	2 flaskor à 35 mL
1,25-(OH) ₂ D KONTROLLSERUM	2 flaskor à 3 mL
95 % ETANOL	1 flaska à 7 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.

När man rekonstituerar innehållet i flaskorna måste man blanda försiktigt för att undvika skumbildning. Alla rekonstituerade reagens skall förvaras vid -15°C eller lägre omedelbart efter användning. Reagens från skilda batcher får ej blandas.

4.1 1,25-(OH)₂D NSB-buffert: Reagens färdigt för användning

Kaliumfosfatgelatinbuffert med ProClin® 300 (< 0,2%).

4.2 1,25-(OH)₂D 0 Kalibreringslösning: §§Reagens färdigt för användning

Fosfatbuffert med bovina serumproteiner och ProClin 300 (< 0,2%).

4.3 1,25-(OH)₂D₃ Kalibreringslösningar (1-5): Frystorkade reagens

Fem frystorkade kalibreringslösningar med (1,25-(OH)₂D₃) i halter på 5 - 200 pg/mL som innehåller humant serum och ProClin 300 (<0,2%). Varje kalibreringslösning skall rekonstitueras med 3,0 mL kalibreringslösning noll. De exakta halterna anges på etiketten på varje flaska. Kalibreringslösningarna i satsen har kalibrerats genom UV-mätning. Kalibreringslösningarna i satsen kan betraktas som likvärdiga med patient-prover, när de används med de reagens och metदानvisningar om rekommenderas för detta diagnostiska in vitro-test.

4.4 1,25-(OH)₂D Antiserum: Reagens färdigt för användning

Anti-1,25-(OH)₂D-serum från kanin, spätt med fosfatgelatinbuffert med ProClin 300 (<0,2%).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃ Reagens färdigt för användning

1,25-(OH)₂D₃-analog inmärkt med radioaktivt jod och upplöst i en etylenglykolfosfatbuffert.

4.6 1,25-(OH)₂D₃ Förbehandlingslösning: Reagens färdigt för användning

Kaliumfosfatbuffert.

4.7 1,25-(OH)₂D-kontroller: Nivå 1 (normal), Nivå 2 (förhöjd): Reagens färdigt för användning

En behandlad humanserumpool som innehåller ProClin 300 (<0,2%) och till vilken tillsats skett av lämpliga mängder 1,25-(OH)₂D för att erhålla kontrollhalter inom de angivna gränserna. Kontroll 1 ligger inom normalområdet, medan kontroll 2 har ett förhöjt värde. Koncentrationsområdet för varje kontroll rapporteras på analyscertifikatet och anger gränserna som fastställts av DiaSorin för kontrollvärden som kan erhållas i tillförlitliga analysserier.

4.8 Fällningskomplex av typen anti-kaninserum från get (GAR): Frystorkat reagens

Normalt kaninserum, som förutfällts med anti-kaninserum från get och polyetylenglykol (PEG), späds med BSA-boratbuffert med tillsats av 0,1% natriumazid och andra konserveringsmedel (frystorkat). Rekonstituera flaskans innehåll med 35 mL destillerat eller avjoniserat vatten; blanda grundligt tills suspensionen verkar homogen och låt det sedan stå minst 30 minuter i rumstemperatur. Blanda om då och då.

4.9 95% etanol: Reagens färdigt för användning
95% etanol och 5% vatten.

OBS! C₁₈Även OH-kassetter krävs för denna testprocedur, och måste beställas separat. Ange DiaSorins katalognummer 65101E.

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, förvärvas, ägas och användas av läkare, kliniska laboratorier, sjukhus 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, hepatit-C-virus (HCV), humant immunbristvirus (HIV) eller andra infektiösa agens, skall 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 och bilda högexplosiva metallazider. När reagensen kasseras måste man spola efter med stora mängder vatten för att förhindra att azid ackumuleras. 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)

R20/21/22 - Farligt vid inandning, hudkontakt och förtäring.

R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

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

REAGENS SOM INNEHÅLLER ETANOL

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

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 5,5 μCi (204 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, förvaras, ägas och användas av läkare, kliniska laboratorier eller sjukhus, och får endast användas för kliniska tester in vitro eller laborietester 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.

WARNING! 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.
- 6.2 En förändring av kalibreringskurvans läge eller lutning jämfört med vad som erhålls normalt.
- 6.3 En sänkning av maximal bindning.
- 6.4 En hög ospecifik bindning

7. PROVTAGNING OCH HANTERING AV SERUM OCH PLASMA

Det behövs 500 mikroliter serum eller EDTA-plasma för att utföra extraktionen inför assayen; med en volym på 1,5 ml kan man upprepa analysen samtidigt som man får marginal för pipetteringen.

Satsen kan användas både med humant serum och human plasma. EDTA kan användas som antikoagulanstillägg med denna assay. Fasteprov rekommenderas men är ej ett krav. Blodprovet bör tas med aseptisk teknik genom venpunktion med ett 5 eller 10 mL rör av vacutainertyp. För att få serum låter man blodet koagulera i rumtemperatur (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 prover. 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 -15°C eller lägre. Proverna får ej frysas och tinas flera gånger; ingen signifikant förändring av värdena sågs dock i en studie genomförd av DiaSorin, där proverna genomgick 3 cykler med frysning-upptining. DiaSorin har lagrat prover i upp till 6 månader vid -15°C eller lägre utan någon signifikant förändring av resultaten.

8. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL

- 8.1 C₁₈OH-kassetter (24 kassetter), som beställs separat med DiaSorins katalognummer 65101E.
- 8.2 Engångs borosilikatglasrör, 12 x 75 mm och 13 x 100 mm.
- 8.3 Provrörsställ.
- 8.4 Parafilm eller motsvarande för att täcka över provrören.
- 8.5 Frigolitställ eller motsvarande för dekantering.
- 8.6 Centrifug med plats för 12 x 75 mm-rör och möjlighet att uppnå 1800 x g*.
- 8.7 Gammaräknare som kan räkna ¹²⁵I.
- 8.8 Vortex-blandare.
- 8.9 Pipetteringshjälpmedel:
 - a. Mikropipetter kalibrerade för 75 µL, 300 µL och 500 µL.
 - b. Repeterande dispenserer för 50 µL, 300 µL och 500 µL.
 - c. Mätpipetter för rekonstituering av kalibreringslösningar; 3,0 mL.
- 8.10 Avjoniserat eller destillerat vatten.
- 8.11 Organiska lösningsmedel:

Följande lösningsmedel behövs för att förbereda och extrahera proverna.

Använd endast lösningsmedel av HPLC-kvalitet.

Låt inte något lösningsmedel komma i kontakt med syradiskade glasvaror eller andra sura betingelser.

 - a. Acetonitril.
 - b. Metanol.
 - c. Hexan. (VIKTIGT! halten n-hexan måste vara minst 95%)
 - d. Metylenklorid (får ej innehålla alkohol som konserveringsmedel).
 - e. Isopropanol (2-propanol).
- 8.12 Rekommenderad apparat för C₁₈OH-kassetterna:
 - a. Vac Elut provbehandlingsstation. Behandlar 24 kolonner per körning. Kan beställas från Analytichem International eller DiaSorin. Vid beställning från DiaSorin används DiaSorins katalognummer 11610.

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

8.13 Erforderlig materiel för torkning av prover:

a. Kvävgas.

b. Torkgrenrör med 37°C (±2°C) värmeblock eller vattenbad:

N-EVAP eller MULTI-VAP som kan beställas från Organomation Associates (Berlin, Massachusetts, USA) eller Reacti-Vap II och Reacti-Therm III som kan beställas genom Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois, USA).

9. BEREDNING AV ORGANISKA LÖSNINGSMEDEL FÖR KOLONNEXTRAKTIONEN

OBS! De organiska lösningsmedelsblandningarna skall beredas innan man påbörjar den förberedande extraktionsproceduren.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

Bered lösningsmedelsblandningar enligt beskrivningen i TABELL I; DiaSorin rekommenderar att man bereder 500 mL. Man kan bereda större eller mindre volymer så länge som proportionerna förblir de samma. Volymerna måste dock vara tillräckligt stora för att man skall kunna minimera mätfelet. Mät upp varje lösningsmedel separat för bästa resultat.

FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

Använd destillerat eller avjoniserat vatten i förekommande fall.

TABELL I
Beredning av lösningsmedel

Proportioner	Lösningsmedel	1 L	500 mL
70:30	metanol vatten	700 mL 300 mL	350 mL 150 mL
90:10	hexan metylenklorid	900 mL 100 mL	450 mL 50 mL
99:1	hexan IPA	990 mL 10 mL	495 mL 5 mL
92:8	hexan IPA	920 mL 80 mL	460 mL 40 mL

10. FÖRBEREDANDE EXTRAKTIONSPROCEDUR

- 10.1 Rekonstituera varje frystorkad kalibreringslösning med 3,0 mL kalibreringslösning noll. Blanda kalibreringslösningarna väl och låt dem stå 15 - 20 minuter så att rekonstitueringen blir fullständig. Tina eventuella frysta reagens helt och hållet. Låt alla reagens anta rumstemperatur. Se till att reagensen ej blir varmare än 25°C. Blanda alla reagens väl före användning.
- 10.2 Pipettera över 500 µL av varje kalibreringslösning (0-5), av kontroll och av patientprov till märkta 12 x 75 mm borosilikatglasrör.
- 10.3 Tillsätt 500 µL acetonitril till varje prov; vortexa då och då, minst 3 gånger, under en tidrymd av 10 minuter.
- 10.4 Centrifugera rören vid 760 x g* i 10 minuter vid 20 - 25°C.
- 10.5 Dekantera supernatanterna från proverna till märkta 12 x 75 mm-rör eller (om så önskas) 13 x 100 mm-rör; kassera pelletterna.

* g = (1118 x 10⁻⁸) (radie i cm) (rpm)²

- 10.6** Tillsätt 500 µL förbehandlingslösning till varje rör och vortexa.
OBS! Satsen räcker till maximalt 48 extraktioner, vilket innebär 40 okända prover förutom kalibreringslösningar och kontroller. Således kan 24 prover extraheras genast på VacElut-enheten och de återstående 24 senare. Kolonnextraktionerna skall utföras så snart som möjligt efter det att förbehandlingslösningen tillsatts. När kolonnextraktionen väl har utförts kan dock proverna lagras i 96 timmar vid -15°C eller lägre.
- 10.7** Proverna är nu klara att applicera på C₁₈OH-kassetterna.

11. KOLONNPROCEDUR

- 11.1** I bruksanvisningen till VAC ELUT finns en beskrivning av hur den fungerar. Sätt ihop stationen enligt anvisningarna.
- 11.2** Märk upp ett 13 x 100 mm borosilikatglasrör för varje kalibreringslösning (0-5), kontroll och okänt prov. Sätt i rören i VAC ELUT. Kontrollera att locket på VAC ELUT är i läge "WASTE" och att rören är placerade så att de samlar upp rätt eluat. Placera C₁₈OH-kassetterna på VAC ELUT-locket.
- 11.3** Tillsätt lösningsmedelsblandningarna till angiven kassett enligt tabell II.

VIKTIGT!

Användning av vakuum:

Sätt på vakuum efter varje tillsats av lösningsmedel och låt lösningsmedelsblandningen passera **fullständigt** genom kassetten innan du går vidare med nästa lösningsmedel. Slå på och slå av vakuum vid de angivna stegen i TABELL II (om så önskas kan vakuum slås av mellan varje lösningsmedelstillsats). Vakuomet skall vara inställt på högst 254 mm Hg (10 tum Hg). Eluera varje lösningsmedelsblandning genom "WASTE"-utloppet till lämpliga avfallskärl fram till det sista uppsamlingssteget.

Applicering av prov:

Proverna kan antingen dekanteras direkt på kassetten eller appliceras med pipett. Låt inte kassetterna lufttorka i mer än 5 minuter mellan appliceringarna.

Förbehandling av C₁₈OH-kassetterna:

C₁₈OH-kassetterna skall tvättas med 5 mL hexan-metylenklorid (90:10), 5 mL IPA och 5 mL metanol innan de används första gången. Hexan-metylenkloridblandningen (90:10) kan beredas genom att man mäter upp 900 mL hexan och 100 mL metylenklorid. Placera de nya, oanvända kassetterna på VAC ELUT-apparaten, ställ den i läge "WASTE" och tillsätt 5 mL hexan-metylenklorid (90:10) till varje kolonn, följt av 5 mL IPA och slutligen 5 mL metanol. Låt varje lösningsmedelsblandning passera helt genom kassetterna innan du går vidare med nästa blandning. När man på detta sätt förberett de nya kassetterna behöver man i fortsättningen inte upprepa detta steg, eftersom kassetterna regenereras under extraktionen.

OBS! Om ytterligare prover skall extraheras (fler än 24), regenererar man kassetterna med samma metod som i TABELL II. Kassetterna kan återanvändas upp till 30 gånger.

OBS! Materialet i C₁₈OH-kassetterna hålls på plats av en porös fiberfritt. Kassera kassetter där fibrer i frittan är lösa eller saknas eftersom C₁₈OH-material kan gå förlorat.

TABELL II

Beskrivning och analys av extraktionen	Extraktionssteg	Hantering av elueringsvätska
Förberedelse/regenerering av kolonn Avlägsnar: Interfererande substanser från föregående användning (steg 1)	1. Tillsätt 1 mL metanol, slå på vakuüm. 2. Slå av vakuüm.	Kassera "WASTE"
Applicering av prov	3. Applicera alla prover, slå på vakuüm. från Förberedande extraktionsprocedur (steg 10).	Kassera "WASTE"
Rening/avlägsnande av D-vitaminmetaboliter Avlägsnar: Interfererande polära lipider, salter och pigment (steg 4) 25(OH)D (steg 5) Återstående 25(OH)D och 24,25(OH) ₂ D/25,26(OH) ₂ D (steg 6)	4. Tillsätt 5 mL metanol-vattenblandning (70:30; avjoniserat eller destillerat vatten). 5. Tillsätt 5 mL hexan/metylenklorid (90:10). 6. Tillsätt 5 mL hexan/isopropanol (99:1). 7. Slå av vakuüm.	Kassera "WASTE"
Tillvaratagande av 1,25-(OH)₂D Eluering av renat 1,25-(OH) ₂ D (steg 9)	VIKTIGT! 8. Slå om Vac Elut till läge "Collect." 9. Tillsätt 3 mL hexan/isopropanol (92:8), slå på vakuüm. 10. Slå av vakuüm.	"COLLECT"

12. TORKNING OCH REKONSTITUERING AV ELUATEN

- 12.1** Placera provrören med eluaten i ett värmeblock eller vattenbad vid 37°C (±2°C) för torkning.
- 12.1** Torka eluaten i dragskåp med 2-4 psi kvävgas (torktid 20-30 minuter).
- 12.3** Ta ut rören så snart eluaten har torkat.
- 12.4** Rekonstituera vart och ett av de torkade extrakten med 50 µL 95% etanol; vortexa försiktigt på låg till medelhög hastighet. Tillsätt 125 µL spårämne till varje rör, vortexa igen försiktigt på låg till medelhög hastighet. **OBS!** Vortexstegen är mycket viktiga för att proverna ska rekonstrueras på rätt sätt och för att man skall få bra precision. **FÖRSIKTIGT!** Håll vortexblandaren mot den nedersta delen av röret, så att ingen provvolym går förlorad; det är viktigt att volymen är så stor att det går att pipettera prov till assayen. Märk upp ett extra rör för total aktivitet och ett rör för NSB. Tillsätt 50 µL 95 % etanol och 125 µL spårämne till båda rören. De kommer att användas för att skapa dubbelproverna för TA (total aktivitet) och NSB enligt testschemat.
- 12.5** Utför assayen omedelbart när proverna rekonstruerats. Vid större assayer bör man för bästa resultat rekonstruera 12 - 15 prover i taget och sedan pipettera dem till assayen, innan man rekonstruerar de följande 12 - 15 proverna.

13. TESTPROCEDUR

- 13.1 Gör i ordning märkta 12 x 75 mm engångs borosilikatglasrör för dubbelprover för varje kalibreringslösning (0-5), kontroll och prov enligt testschemat. Pipettera noggrant 75 µL rekonstituerat extrakt av kalibreringslösning, kontroll eller prov till respektive rör.
FÖRSIKTIGT!: Var mycket noggrann vid detta steg, eftersom det bara finns 25 µL extra i varje rör.
- 13.2 Se "Torkning och rekonstituering av eluaten" steg 4. Pipettera 75 µL från röret för TA (total aktivitet) till motsvarande dubbla assayrör. Gör på motsvarande sätt med NSB-rören.
- 13.3 Tillsätt 300 µL NSB-buffert till NSB-rören.
- 13.4 Tillsätt 300 µL primär antikropp till alla rör utom rören för total aktivitet och NSB.
- 13.5 Blanda väl; inkubera 2 timmar (± 15 minuter) vid 20 - 25°C.
OBS! Rekonstituera GAR utfällningskomplex med 35 mL destillerat eller avjoniserat vatten, blanda grundligt tills suspensionen ser homogen ut och låt den sedan stå i minst 30 minuter i rumstemperatur innan den används. Blanda om då och då före och under användning.
- 13.6 Tillsätt 500 µL välblandat GAR utfällningskomplex till alla rör utom totalaktivitetsrören. Inkubera 20 minuter (± 5 minuter) vid 20 - 25°C.
- 13.7 Centrifugera alla rör i 20 minuter vid 20 - 25°C och 1800 x g*, utom totalaktivitetsrören.
- 13.8 Dekanterar supernatanterna, utom från totalaktivitetsrören. Använd ett frigolitställ eller liknande och vänd det upp-och-ner över 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 sugs upp.
- 13.9 Mät radioaktiviteten genom att räkna alla rör 1 minut i en gammarräknare. Rören måste räknas i minst 1 minut (se avsnittet Metodbegränsningar).

14. KOMMENTARER TILL PROCEDURERNA

- 14.1 Tillsätt alla reagens till den nedersta tredjedelen av provröret så att reagensen kan blandas fullständigt.
- 14.2 För att utbytena skall bli goda måste proportionerna mellan lösningsmedlen vara korrekta. Bered tillräckligt stora volymer av blandningarna för att mätfel skall minimeras.
- 14.3 Om ett prov ger ett högre värde än den högsta kalibreringslösningen, skall man späda provet med kalibreringslösning noll före extraktion och därefter testa det på nytt. Resultatet skall sedan multipliceras med motsvarande spädningsfaktor. Exempel: Blanda 500 µL prov med 500 µL kalibreringslösning noll. Kör därefter assay på 500 µL av denna provblandning enligt bipacksedeln.
- 14.4 Ingen drift i assayresultatet iaktogs under den genomsnittliga tid det tar att utföra assay på 100 rör.

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

14.5 För att kontinuerligt bekräfta att ett RIA-test ger konsekventa resultat måste laboratoriet kontrollera ett antal andra faktorer. DiaSorin rekommenderar att man regelbundet kontrollerar följande parametrar för att vara säker på att satsen ger konsekventa resultat.

a. Totalaktivitet

b. Maximal bindning

Medelvärdet för aktiviteten (CPM) i rören för kalibreringslösning noll/CPM-medelvärdet för totalaktivitetsrören.

c. Ospecifik bindning

CPM-medelvärdet för NSB-rören/CPM-medelvärdet för total aktivitetsrören.

d. Kalibreringskurvans lutning

Nivån för 50 % hämning kan följas.

15. KVALITETSKONTROLL

Varje laboratorium bör ta med minst två kontroller (en med normal nivå och en med förhöjd nivå) i varje assaykörning för att kontinuerligt övervaka metodegenskaperna. Kommersiellt tillgängliga kontroller eller de båda referenskontrollerna i satsen kan användas.

Kontrollerna ska behandlas exakt som okända prover och köras som duplikat. Man bör kontinuerligt föra in kontrollvärdena i 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 slumpmässiga och systematiska fel. Resultaten för kontrollerna måste uppfylla laboratoriets kriterier för godkännande innan patientprovresultaten rapporteras.^{12,13,14}

16. 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 prover, även om en viss beräkningsmetod kan passa bättre för vissa assayer än för andra. Den beräkningsmetod som används på DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium är en metod där %B/B₀ avsätts mot logaritmen för koncentrationen med hjälp av ett program för mjuk anpassning till SPLINE-funktioner.

16.1 Beräkning av procent B/B₀

- Beräkna medel-CPM för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov.
- Subtrahera medel-CPM för NSB-rören från alla värden.
- Dividera det korrigerade CPM-värdet för varje kalibreringslösning, kontroll och okänt prov med medelvärdet av de korrigerade CPM-värdena för 0-kalibreringslösningen och multiplicera med 100.

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

16.2 Den uppritade kalibreringskurvan

- Använd ett lin-log-papper över två tiopotenser eller log-log-papper och plotta procent B/B₀ (%) förkalibreringslösningarna på den lodräta axeln (y-axeln) mot kalibreringslösningarnas koncentration på den vågräta axeln (x-axeln).

OBS! Man kan även analysera data med hjälp av automatiska data-reduktionsprogram. DiaSorin använder Multi-Calc (Pharmacia) med en mjuk *LIN-LOG*-anpassning till *SPLINE*-funktioner. Andra datareduktions-metoder måste valideras innan de används rutinmässigt.

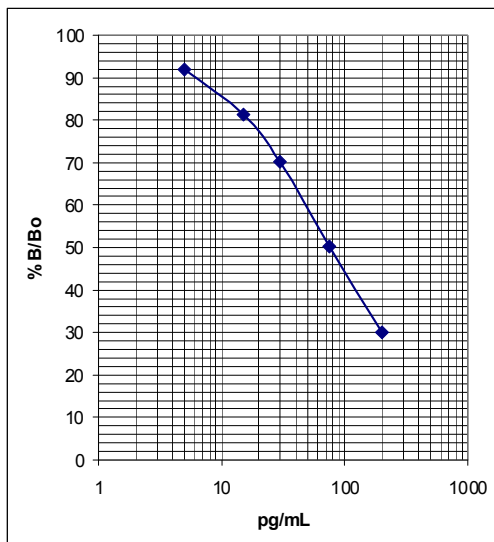
- b. Rita en bästa anpassad linje genom punkterna.
- c. Använd kurvan för att avläsa 1,25-(OH)₂D-halterna i proverna.
- d. Om ett okänt prov har späts, korrigerar man för spädningsfaktorn.
- e. Det rapporterbara området för assayen är 5,0 pg/mL - 200 pg/mL. Eventuella värden som ligger under den lägsta kalibreringslösningen, 5,0 pg/mL, är extrapolerade och kan rapporteras som "mindre än 5 pg/mL".
- f. Beräkna maximal bindning genom att dividera CPM för 0-lösningen med medelvärde för totalaktivetsrören.

I TABELL IV och FIGUR 1 visas ett exempel på typiska data för 1,25-(OH)₂D-RIA; denna information är endast avsedd som exempel och skall inte användas för att beräkna några värden.

TABELL IV
Exempeldata för DiaSorin 1,25-(OH)₂D-RIA

Rör	CPM i dubbelprov	Medel-CPM	Korrigerad CPM	Procent bundet (B/T)	Procent (B/B ₀)	Konc. (pg/mL)
Total aktivitet	40.792 40.578	40.685				
NSB	1.438 1.439	1.439		3,5		
0-kalibrering	18.006 18.119	18.063	16.624	44,4	100,0	
Kalibreringslösningar (pg/mL)						
1 (5,0)	16.710 16.770	16.740	15.302		92,0	
2 (15,0)	14.941 14.916	14.929	13.490		81,2	
3 (30,0)	13.087 13.124	13.106	11.667		70,2	
4 (75,0)	9.820 9.765	9.793	8.354		50,2	
5 (200)	6.412 6.464	6.438	5.000		30,0	
Kontroller						
Nivå 1: normal nivå	13.275 13.530	13.403	11.964		72,0	27,3
Nivå 2: hög nivå:	8.206 8.124	8.165	6.727		40,5	119

Exempel på kalibreringskurva för DiaSorin 1,25-(OH)₂D-RIA



FIGUR 1

DATAREDUKTION

DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium använder en mjuk anpassning till SPLINE-funktioner.

17. METODBEGRÄNSNINGAR

- 17.1 Aktiviteten i rören måste räknas under så lång tid att statistiska fel undviks (till exempel ger en räkning av 2000 CPM ett fel på 5%; 10000 CPM ger ett fel på 1%).
- 17.2 Resultaten från testet skall användas i kombination med övriga kliniska data och laboratoriedata för att underlätta när läkaren fattar beslut om den enskilda patientens behandling.
- 17.3 Prestanda för testet har inte kontrollerats i en pediatrik population.

18. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Referensområde för friska blodgivare

Det är viktigt att varje laboratorium upprättar ett eget referensområde som är representativt för det typiska patientunderlaget vid laboratoriet. Det har dock genomförts en klinisk studie där man under sommar- och höstmånaderna samlade 1,25-(OH)₂D-värden från 123 friska frivilliga i tre städer i amerikanska Mellanvästern. Dessa 123 friska blodgivare utgjorde en rasmässigt blandad grupp med 37 män och 86 kvinnor mellan 21 och 68 år. Medelvärdet för 1,25-(OH)₂D-halten för hela gruppen (n=123) låg på 43,9 pg/mL. Det 95-procentiga referensintervallet, uppskattat med en icke-parametrisk metod (enligt CLSI:s riktlinje C28-A2¹⁵), var 25,1-66,1 pg/mL.

Patienter med terminal njursjukdom

En klinisk prövning genomfördes för att utvärdera 1,25-(OH)₂D-nivåerna hos en vuxen population med diagnosen terminal njursjukdom. Totalt rekryterades och testades 87 frivilliga i denna kategori (49 män, 38 kvinnor, ålder 19-84) från tre städer i amerikanska Mellanvästern. Det observerade området för 1,25-(OH)₂D-värden för denna population (n=87) var 1,6-17,3 pg/mL. Den övre gränsen för det 95-procentiga referensområdet, uppskattat med en icke-parametrisk metod, låg på 14,2 pg/mL.

19. SPECIFIKA PRESTANDA

19.1 Precision

DiaSorin utvärderade precisionen för assayen baserat på principerna i CLSI:s riktlinje (EP5-A).¹⁶ Tre kontroller, baserade på humant serum och med nivåer av 1,25-(OH)₂D fördelade över hela området för assayen, testades under 25 testdagar omfattande mer än 60 driftdagar. Flera olika analytiker och flera olika batchnummer för samtliga komponenter ingick. De kombinerade resultaten utvärderades genom variansanalys (ANOVA) och är sammanfattade i följande tabell.

Prof	N	Medelvärde pg/mL	Inom samma körning		Mellan dagar		Totalt	
			S.D.	% CV	S.D.	% CV	S.D.	% CV
LÅG	25	25,8	1,76	6,8	3,8	14,6	4,0	15,3
MEDEL	25	41,3	3,16	7,7	4,6	11,1	5,1	12,3
HÖGT	25	105,2	11,86	11,3	11,8	11,2	14,4	13,7

19.2 RIKTIGHET: RIKTIGHETEN FÖR ASSAYEN KONTROLLERADES MED ETT LINEARITETSTEST OCH ETT UTBYTESTEST.

Linearitet (parallellitet)

Lineariteten vid spädning utvärderades av DiaSorin enligt rekommendationerna i CLSI's riktlinje EP6-P.¹⁷ Tre pooler av patientsera bereddes genom seriespädning med kalibreringslösning noll och uppdelades i portioner som frystes till -20°C Varje prov och spädning testades upprepade gånger på tre olika testdatum. De förväntade värdena bestämdes som de ospädda värdena för varje pool dividerat med spädningsfaktorn. Data sammanfattas nedan och de sammanslagna resultaten plottades som en linjär regression av Förväntat värde mot Observerat värde.

Prov Nr	Spädning	Förväntat Värde (pg/mL) (N=10)	Medelvärde För Observerat Värde (pg/mL) (N=10)
1	OUTSPÄDD	49,6	49,6
	1:2	24,8	25,3
	1:4	12,4	11,1
	1:8	6,2	4,4
2	OUTSPÄDD	50,2	50,2
	1:2	25,1	24,2
	1:4	12,6	12,2
	1:8	6,3	4,6
3	OUTSPÄDD	62,0	62,0
	1:2	31	31,9
	1:4	15,5	13,4
	1:8	7,8	6,2

UTBYTE

Testets förmåga att ge ett kvantitativt utbyte av all analyt i de kliniska proverna utvärderades genom tillsats av varierande mängder nypreparerat, rent 1,25-(OH)₂-D-antigen till tre patientprovspooler. Tre halter valdes och testades i dubbelprover, och utbytet bestämdes som en procentandel. Medelvärdet för utbytet med denna metod var 101%.

Prov nr	Urspr. konc (pg/mL) 1,0 mL	Tillsatt mängd (pg)	*Förväntat (pg/mL)	Observerat (pg/mL)	% utbyte
1	30,8	50,0	77,7	75,6	97
		62,5	88,9	87,2	98
		75,0	99,8	103	103
2	42,8	50,0	89,2	89,5	100
		62,5	100,3	98,9	99
		75,0	111,0	118	106
3	40,3	50,0	86,8	83,9	97
		62,5	97,9	103	105
		75,0	108,8	118	108

*Vid beräkningarna för förväntad halt tas hänsyn till den spädningsfaktor som den tillsatta volymen ger upphov till.

19.3 Analytisk känslighet

Känsligheten hos assayen, definierat som den lägsta koncentration som kan särskiljas från noll vid 2 standardavvikelse under medel-CPM för 0-kalibreringslösningen (n = 20), har visat sig ligga på $\leq 2,0$ pg/mL.

19.4 Analytisk specificitet

Data för korsreaktiviteten för det antiserum som används i satsen uttrycks som kvoten mellan koncentrationen av 1,25-OH- D_3 och koncentrationen av det korsreagerande ämnet vid 50 % hämning av maximal bindning.

Analyt	Konc. Vid 50% B/Bo	% korsreaktivitet
24,25 D_3	76.420 pg/mL	<0,5
25,26 D_3	24.330 pg/mL	<0,5
25 D_3	>>>1 mg/mL	<0,5

19.5 Interfererande ämnen

En studie av potentiella interfererande ämnen genomfördes för att fastställa om höga halter av vanliga endogena substanser kan påverka assayresultaten negativt. Utvärderingen följde CLSI:s riktlinjer (EP7-P).¹⁸ Tre prover baserade på humant serum och med låga, medelhöga eller höga halter av 1,25-(OH) $_2$ - D_3 testades antingen med tillsats av det testade ämnet eller som kontroller med tillsats av samma volym av den buffert som det testade ämnet var löst i. Varje prov extraherades två gånger, vilket gav fyrdubbla assayprover. Resultaten nedan visar att det inte föreligger någon interferens från något av de testade ämnena, vilket fastställdes genom statistisk analys med ANOVA (95% konfidensintervall), eller genom att medelvärdet för proverna med tillsats avvek från kontrollerna med mer än ± 2 standardavvikelse för kalibreringslösningarna.

Bilirubin

Prov	Medelvärde för kontroll (pg/mL)	2 SD för kontrollen	Medelvärde med bilirubintillsats (pg/mL)	Interferens enl. ANOVA
Lågt	19,9	18,5-21,3	19,5	0,54
Medel	31,7	27,7-35,7	29,9	0,22
Högt	79,7	63,5-95,9	83,2	0,45

Kolesterol

Prov	Medelvärde för kontroll (pg/mL)	2 SD för kontrollen	Medelvärde med kolesteroltillsats (pg/mL)	Interferens enl. ANOVA
Lågt	19,9	18,5-21,3	19,4	0,64
Medel	31,7	27,7-35,7	29,7	0,15
Högt	79,7	63,5-95,9	75,2	0,40

Triglycerider

Prov	Medelvärde för kontroll (pg/mL)	2 SD för kontrollen	Medelvärde med triglycerid tillsats (pg/mL)	Interferens enl. ANOVA
Lågt	14,7	12,9-16,5	15,1	0,88
Medel	30,4	22,4-38,4	33,4	0,25
Högt	92,6	69,5-116,9	95,4	0,68

Hemoglobin

Prov	Medelvärde för kontroll (pg/mL)	2 SD för kontrollen	Medelvärde med hemoglobintillsats (pg/mL)	Interferens enl. ANOVA
Lågt	21,5	17,5-25,5	20,8	0,53
Medel	38,6	35,4-41,8	40,0	0,43
Högt	112,7	101,4-124,0	120,6	0,17

Urea

Prov	Medelvärde för kontroll (pg/mL)	2 SD för kontrollen	Medelvärde med ureatillsats (pg/mL)	Interferens enl. ANOVA
Lågt	25,1	20,9-29,3	26,6	0,39
Medel	36,2	23,8-48,6	35,9	0,96
Högt	120,1	97,4-142,8	118,6	0,82

FÖR REFERENSER HÄNVISAS TILL SISTA SIDAN

LATHUND FÖR TESTET

1. Kalibreringslösningar, kontroller och okända prover rekonstitueras alla med 95 % etanol och spårämne efter torksteget i kolonnproceduren.
2. Pipettera reagens enligt följande schema:

Rör/Reagens	Totalaktivitet	NSB	CAL 0-5	Kontroller och okända prover
Rekonstituerade kalibreringslösningar	-	-	75 µL	-
Rekonstituerade kontroller och okända prover	-	-	-	75 µL
95 % etanol och spårämne**	75 µL	75 µL	-	-
NSB-buffert	-	300 µL	-	-
1,25-(OH) ₂ -D-antiserum	-	-	300 µL	300 µL

OBS! Man gör i ordning rören för total aktivitet och NSB genom att blanda 50 µL 95% etanol och 125 µL spårämne, och pipettera 75 µL av denna blandning till rör för dubbelprover.

3. Blanda väl; inkubera 2 timmar (+/- 15 minuter) vid 20-25°C.
4. Pipettera 500 µL GAR utfällningsreagens till alla rör utom dem för total aktivitet.
5. Blanda väl; inkubera i 20 minuter (+/-5 minuter) vid 20-25°C.
6. Centrifugera vid 1800 x g* i 20 minuter vid 20-25°C.
7. Dekantera supernatanterna.
8. Räkna varje rör i gammarräknare i 1 minut.

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

SOUPRAVA ¹²⁵I RIA KE STANOVENÍ 1,25-dihydroxyvitamínu D

1. POUŽITÍ

PRO DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO

Test ¹²⁵I RIA ke stanovení 1,25-dihydroxyvitamínu D je kompetitivní rovnovážná radioimunoanalýza určená ke kvantitativnímu stanovení 1,25-dihydroxyvitamínu D (1,25-(OH)₂-D) v lidském séru nebo v EDTA plazmě, jejímž cílem je zhodnocení deficience 1,25-(OH)₂-D, spojené s onemocněním ledvin. Při rozhodování o léčbě dospělých pacientů je nutné, aby kliničtí lékaři využívali výsledky testů společně s dalšími klinickými a laboratorními údaji.

2. SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Vitamín D je získáván se dvěma zdroji: exogenního (strava) a endogenního (biosyntéza regulovaná expozicí ultrafialovému záření). Exogenní, neboli nutriční zdroje zahrnují potraviny obsahující přirozeně nízký obsah vitamínu D₂ (např. mléko, máslo, cereálie obohacené vitamínem D₂), potravinové doplňky ve formě pohořelých dostupných volně prodejných vitamínů a lékové přípravky s obsahem vitamínů D₂.¹ Vitamín D není ze své podstaty aktivní, když vstoupí do oběhu, a to ať stravou, či fotochemickou cestou. Biologickou aktivitu získává po složité řadě metabolických kroků.²

V současné době je známo, že metabolická aktivace vitamínu D je složité řízený proces, kde do hry vstupuje velký počet do značné míry variabilních proměnných, mezi něž patří obsah vápníku a fosforu ve stravě, závažnost deficience vitamínu D, genetické predispozice, hladina parathormonu, expozice ultrafialovému záření a stupeň funkčnosti ledvin.³ Biosyntéza hydroxylovaných forem vitamínu D₃ začíná působením ultrafialového slunečního záření na 7-dehydrocholesterol za vytváření vitamínu D₃ v pokožce. Jakmile vitamín D₃ vstoupí do oběhu, je rychle metabolizován v játrech na 25-hydroxyvitamín D₃ (25-OH-D₃). V játrech se také hydroxyluje vitamín D₂ ze stravy na 25-hydroxyvitamín D₂ (25-OH-D₂).^{2,4}

Po hydroxylaci v játrech se 25-OH-D transportuje spolu s bílkovinou, která váže vitamín D, do ledvin, kde dochází k další hydroxylaci. Adicí hydroxylové skupiny na pozici 1 se tvoří 1,25-dihydroxyvitamín D (1,25-(OH)₂-D). 1,25-dihydroxyvitamín D je neúčinnější přirozeně se vyskytující metabolit vitamínu D, který byl dosud objeven, a jeho produkce je přesně regulována koncentrací vápníku, fosforu a parathormonu v séru. V době kalciového stresu je 1,25-(OH)₂-D nejdůležitějším metabolitem vitamínu D, produkovaným v ledvinách.^{5,6}

Je to způsobeno jeho důležitou úlohou při účinném vstřebávání vápníku a fosforu i při jejich normálním metabolismu. Z toho vyplývá, že měření 1,25-(OH)₂-D se rychle stává účinným nástrojem výzkumu onemocnění a poruch ovlivňujících normální metabolismus fosforu a vápníku.^{7,8,9}

3. PRINCIP ANALÝZY

Test DiaSorin 1,25-(OH)₂ sestává z dvoustupňového postupu. Test zahrnuje předběžnou extrakci a následnou purifikaci metabolitů vitamínu D ze séra nebo plazmy EDTA pomocí patron C₁₈OH.¹⁰ Po extrakci se připravený vzorek analyzuje pomocí kompetitivní RIA. Metoda RIA je založena na polyklonálních protilátkách specifických pro 1,25-(OH)₂D₂ i pro 1,25-(OH)₂D₃. Vzorek, protilátka a izotopový indikátor se inkubují 2 hodiny při 20-25 °C. Separace fází se provádí po 20 minutách inkubace při 20-25 °C precipitační složkou – druhou protilátkou. Po centrifugaci a dekantaci se změří vázaná frakce zbývající v tableti pomocí detektoru gama záření. Hodnoty se vypočítají přímo z kalibrační křivky známých koncentrací. Konečná koncentrace 1,25-(OH)₂D ve vzorcích séra a EDTA plazmy je vyjádřena v pg/ml.

4. REAGENS DODANÉ V SOUPRAVĚ

PUFR 1,25-(OH) ₂ D NSB	1 lahvička po 3 ml
KALIBRÁTOR 1,25-(OH) ₂ D 0	1 lahvička po 20 ml
KALIBRÁTOR 1,25-(OH) ₂ D ₃ 1-5	5 lahviček po 3 ml
ANTISÉRUM 1,25-(OH) ₂ D	1 lahvička po 35 ml
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 lahvička po 10 ml
PŘÍPRAVNÝ ROZTOK 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 lahvička po 50 ml
PRECIPITAČNÍ SLOŽKA 1,25-(OH) ₂ D GAR	2 lahvičky po 35 ml
KONTROLNÍ SÉRUM 1,25-(OH) ₂ D	2 lahvičky po 3 ml
95% ETANOL	1 lahvička po 7 ml
Počet testů	100

UCHOVÁVÁNÍ: Po přijetí je nutno soupravu uchovávat při teplotě 2-8 °C. Po otevření skladujte jednotlivé reagensy při 2-8 °C až do doby expirace, uvedené na označení. Reagens nelze použít po uplynutí data expirace. Datum expirace soupravy je uvedeno na vnějším označení a odpovídá datu expirace izotopového indikátoru. Při rekonstituci obsahu lahviček míchejte šetrně, aby nedocházelo k napěnění. Rekonstituovaná reagensy skladujte při teplotě -15 °C nebo nižší až do doby bezprostředně před použitím. Reagensy z různých šarží se nesmí navzájem kombinovat.

4.1 Pufr 1,25-(OH)₂D NSB: Reagens připravené k použití.
Želatinový pufr s fosforečnanem draselným, obsahující ProClin® 300 (< 0,2 %).

4.2 Kalibrátor 1,25-(OH)₂D 0: Reagens připravené k použití.
Fosfátový pufr obsahující proteiny z hovězího séra a ProClin® 300 (< 0,2 %).

4.3 Kalibrátory 1,25-(OH)₂D₃ (1-5): Lyofilizované reagensy.
Pět lyofilizovaných kalibrátorů 1,25-(OH)₂D₃ v koncentracích od 5 do 200 pg/ml, obsahujících lidské sérum a ProClin® 300 (<0,2 %). Rekonstituujte každý kalibrátor za použití 3,0 ml kalibrátoru nuly. Přesná koncentrace je vytištěna na štítcích lahviček. Kalibrátory soupravy jsou kalibrovány pomocí UV kvantifikace. Kalibrátory soupravy demonstrují komutativnost patientských vzorků při použití reagensu a operačních postupů v těchto diagnostických testech in vitro podle uvedeného doporučení.

4.4 Antisérum 1,25-(OH)₂D: Reagens připravené k použití.
Sérum s králičími protilátkami proti 1,25-(OH)₂D, ředěné fosfátovým želatinovým puffrem obsahujícím ProClin® 300 (< 0,2 %).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃: Reagens připravené k použití.
Analog 1,25-(OH)₂D₃ značený radioaktivním jódem, rozpuštěný ve fosfátovém puffru s etylénglykolem.

4.6 Přípravný roztok 1,25-(OH)₂D₃: Reagens připravené k použití.
Pufr s fosforečnanem draselným.

4.7 Kontrolní vzorky 1,25-(OH)₂D: proužek 1 (normální), proužek 2 (zvýšený):
Reagens připravené k použití. Zpracované sérum ze směsi jednotek, obsahující ProClin® 300 (<0,2 %), s přidavkem příslušného množství 1,25-(OH)₂D k získání kontrolních koncentrací v rámci specifikovaných rozsahů. Kontrolní vzorek 1 je v normálním rozsahu, kontrolní vzorek 2 je ve zvýšeném rozsahu. Rozmezí koncentrací každého kontrolního vzorku je uvedeno na osvědčení o analýze a představuje limity stanovené společností DiaSorin pro hodnoty kontrolních vzorků, které lze získat pomocí spolehlivých stanovení.

4.8 Precipitační komplex (kozí protikráličí protilátky – GAR) Lyofilizované reagens.

Normální králičí sérum s přípravnou precipitací pomocí kozího protikráličího antiséra a polyetylglykolu (PEG) je rozpuštěno v BSA-boritanovém pufru s přidávkou 0,1 % azidu sodného a dalších konzervačních látek (lyofilizované). Obsah lahvičky rekonstruuje 35 ml destilované nebo deionizované vody, důkladně promíchejte, až se suspenze viditelně zhomogenizuje, a potom nechejte stát minimálně 30 minut při pokojové teplotě; občas promíchejte.

4.9 95% Ethanol: Reagens připravené k použití.

95 % etanol a 5 % voda.

POZNÁMKA: Tento postup vyžaduje také použití patron $C_{18}OH$. Tyto patrony se musí objednat zvlášť pod objednacím číslem DiaSorin 65101E.

5. VAROVÁNÍ A ZVLÁŠTNÍ OPATŘENÍ

PRO DIAGNOSTICKÉ ÚČELY IN VITRO

Není určeno k vnitřnímu ani vnějšímu použití u lidských pacientů ani u zvířat.

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

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

REAGENS OBSAHUJÍCÍ AZID SODNÝ

POZOR: Některé reagensy v této soupravě obsahují azid sodný. Azid sodný může reagovat s olověným a měděným potrubím za vzniku vysoce výbušných azidů kovů. Při likvidaci propláchněte odpadní potrubí velkým množstvím vody, aby nedocházelo k hromadění azidu. Další informace najdete v příručce pro řízení bezpečnosti „Dekontaminace laboratorních odpadních potrubí k odstranění solí azidů“ (Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts) č. CDC-22 vydané Střediskem pro kontrolu a prevenci, Atlanta, GA, USA; 1976.

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

R20/21/22 – Zdraví škodlivý při vdechování, styku s kůží a při požití.

R32 – Uvolňuje vysoce toxický plyn při styku s kyselinami.

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

REAGENS S OBSAHEM ALKOHOLU

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

R11 – Vysoce hořlavý.

S16 – Chraňte před otevřeným ohněm. Zákaz kouření.

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

REAGENS OBSAHUJÍCÍ JÓD-125

Tato souprava obsahuje radioaktivní materiál v dávce nepřevyšující 5,5 μCi (204 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 přijímat, vlastnit a používat pouze lékaři, veterinární lékaři v rámci veterinární praxe, klinické laboratoře nebo nemocnice, a to výhradně pro účely klinických nebo laboratorních testů in vitro, které nezahrnují vnitřní ani vnější podání tohoto materiálu ani radiace z něj vycházející lidským pacientům ani zvířatům. Přijetí, pořízení, vlastnění, použití a transport tohoto materiálu podléhá předpisům a všeobecné licenci komise pro jadernou kontrolu (Nuclear Regulatory Commission) USA nebo státu, se kterým tato komise uzavřela dohodu o uplatňování regulačních předpisů.

1. Skladování radioaktivního materiálu se musí omezovat pouze na určený prostor.
2. Přístup k radioaktivnímu materiálu může 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 a potom omýt alkalickým detergentem nebo roztokem k radiologické dekontaminaci. Veškeré použité sklo se před mytím s jiným laboratorním sklem musí úplně umýt vodou.

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 produkt obsahuje chemikálie, které jsou ve státě Kalifornie (USA) známy jako rakovinotvorné.

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. INDIKACE MOŽNÉ DETERIORACE REAGENS V SOUPRAVĚ

- 6.1 Přítomnost pevných neobvyklých částic ve kterémkoli z reagens.
- 6.2 Změna strmosti nebo posun kalibrační křivky oproti normálním (běžným) výsledkům.
- 6.3 Pokles maximální vazby.
- 6.4 Vysoce nespecifická vazba.

7. ODBĚR A PŘÍPRAVA SÉRA A PLAZMY

Při použití soupravy pro stanovení 1,25-dihydroxyvitamínu D je zapotřebí 500 μl séra nebo EDTA plazmy k provedení extrakce; objem 1,5 ml umožní opakovanou analýzu a také bude postačovat k adekvátnímu pipetování.

S touto soupravou lze použít lidské sérum nebo plazmu. S tímto testem lze použít antikoagulant 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.

Pro separaci séra nechejte krev vysrážet při pokojové teplotě (15-25 °C). Centrifugujte 15 minut přibližně při 760 x g* pro získání séra bez produktů hemolýzy. Pro 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 -15 °C nebo nižší. Vzorky se nesmí opakovaně zmrazovat a rozmrazovat. Nicméně studie provedená firmou Diasorin ukázala, že po 3 cyklech zmrazení a rozmrazení vzorky nevykazují žádné podstatné změny. Testy skladování vzorků, provedené firmou Diasorin, neukázaly žádné podstatné změny po skladování po dobu 6 měsíců při teplotě -15 °C nebo nižší.

8. POTŘEBNÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- 8.1 Patrony C₁₈OH (24 kusů) se musí objednat zvlášť pod objednacím číslem DiaSorin 65101E
- 8.2 Zkumavky z borosilikátového skla, na jedno použití, 12 x 75 mm a 13 x 100 mm
- 8.3 Stojan na zkumavky
- 8.4 Fólie Parafilm (nebo ekvivalent) k zakrytí zkumavek
- 8.5 Držák z pěnového plastu (nebo ekvivalent) k dekantaci
- 8.6 Odstředivka dimenzovaná na zkumavky 12 x 15 mm a dosahující 1800 x g*.
- 8.7 Detektor gama záření citlivý na ¹²⁵I
- 8.8 Třepačka „vortex“
- 8.9 Pipetovací zařízení:
 - a. mikropipetory kalibrované na 75 µl, 300 µl a 500 µl;
 - b. dispensory schopné opakovaně dávkovat 50 µl, 300 µl a 500 µl;
 - c. volumetrické pipety k rekonstituci kalibrátorů, 3,0 ml;
- 8.10 Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- 8.11 Organická rozpouštědla:

K přípravě a extrakci vzorků budou zapotřebí následující rozpouštědla.

Používejte pouze rozpouštědla v kvalitě pro HPLC.

Žádné z organických rozpouštědel nesmí přijít do styku se sklem mytým v kyselině nebo s kyselým prostředím.

 - a. Acetonitril.
 - b. Metanol.
 - c. Hexan. (DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ: Obsah n-hexanu musí být vyšší než 95 %.)
 - d. Metylen chlorid (**nesmí** obsahovat alkohol jako konzervační látku).
 - e. Izopropanol (2-propanol).
- 8.12 Doporučené zařízení pro patrony C₁₈OH:
 - a. Stanice pro zpracování vzorků Vac Elut. Zpracovává 24 kolon najednou. K dispozici u firem Analytichem International nebo DiaSorin. Při objednání u firmy DiaSorin použijte objednací číslo 11610.
- 8.13 Materiál potřebný k sušení vzorků:
 - a. Plynný dusík.
 - b. Sušicí trubice s vyhřívacím blokem nebo vodní lázní o teplotě 37 °C (±2 °C): systém N-EVAP nebo MULTI-VAP – k dispozici u Organomation Associates (Berlin, MA) nebo Reacti-Vap II a Reacti-Therm III – k dispozici u Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

* g = (1118 x 10⁻⁸) (poloměr v cm) (ot/min)²

9. PŘÍPRAVA ORGANICKÝCH ROZPOUŠTĚDEL PRO KOLONOVOU EXTRAKCI

POZNÁMKA: Směsi organických rozpouštědel se musí připravit před začátkem postupu předběžné extrakce.

UPOZORNĚNÍ:

Směsi rozpouštědel připravte podle popisu v TABULCE I; DiaSorin doporučuje připravit objem 500 ml. Je možno připravit i větší nebo menší objemy, pokud zůstanou konzistentní proporce. Nicméně objemy musí být dostatečně velké, aby se minimalizovala chyba měření. Nejlepších výsledků dosáhnete při nezávislém měření pro každé rozpouštědlo.

UPOZORNĚNÍ:

Podle potřeby použijte destilovanou nebo deionizovanou vodu.

TABULKA I
Příprava rozpouštědla

Směs rozpouštědel	Materiál	1 l	500 ml
70:30	Metanol	700 ml	350 ml
	Voda	300 ml	150 ml
90:10	Hexan	900 ml	450 ml
	Metylechlorid	100 ml	50 ml
99:1	Hexan	990 ml	495 ml
	IPA	10 ml	5 ml
92:8	Hexan	920 ml	460 ml
	IPA	80 ml	40 ml

10. POSTUP PŘEDBĚŽNÉ EXTRAKCE

- 10.1** Rekonstituujte každý lyofilizovaný kalibrátor za použití 3,0 ml kalibrátoru nuly. Kalibrátory dobře promíchejte a nechte stát po dobu 15-20 minut, aby se zajistila úplná rekonstituce. Zmrzlá reagens nechte úplně roztát. Všechna reagens nechejte temperovat na pokojovou teplotu. Zabraňte zahřátí reagens na teplotu více než 25 °C. Před použitím všechna reagens dobře promíchejte.
- 10.2** Napičtejte 500 µl každého kalibrátoru (0-5), kontrolního vzorku a patientského vzorku do označených zkumavek z borosilikátového skla o velikosti 12 x 75 mm.
- 10.3** Ke každému vzorku přidejte 500 µl acetonitrilu, přerušovaně promíchejte na třepačce „vortex“ – nejméně 3x po dobu 10 minut.
- 10.4** Zkumavky centrifugujte při 760 x g* po dobu 10 minut při teplotě 20-25 °C.
- 10.5** Supernatant slijte do označených zkumavek 12 x 75 mm nebo 13 x 100 mm (podle preference); tablety zlikvidujte.

* g = (1118 x 10⁻⁸) (poloměr v cm) (ot/min)²

- 10.6 Do každé zkumavky přidejte 500 µl přípravného roztoku a promíchejte na třepačce „vortex“.

POZNÁMKA: Tato souprava je určena na 48 extrakcí včetně kalibrátorů a kontrolních vzorků plus 40 neznámých vzorků. To znamená, že 24 vzorků lze extrahovat na VacELut okamžitě; zbývající skupina 24 vzorků se může extrahovat následně. Kolonová extrakce se má provést co nejdříve po přidání přípravného roztoku. Vzorky extrahované na koloně je možno skladovat 96 hodin při teplotě -15°C nebo nižší.

- 10.7 Vzorky jsou nyní připraveny k aplikaci na patrony C₁₈OH.

11. POSTUP KOLONOVÉ EXTRAKCE

- 11.1 Vysvětlení funkce stanice VAC ELUT najdete v návodu k použití tohoto zařízení. Sestavte stanici podle popisu uvedeného v návodu.
- 11.2 Označte zkumavky z borosilikátového skla 13 x 100 mm pro každý kalibrátor (0-5) a pro kontrolní a neznámý vzorek. Zkumavky umístěte do stanice VAC ELUT. Ujistěte se, že víko stanice VAC ELUT je v poloze „WASTE“ a zkumavky jsou umístěny tak, aby se v nich shromažďovaly příslušné eluáty. Patrony C₁₈OH umístěte do víka stanice VAC ELUT.
- 11.3 Do příslušné patrony přidejte směs rozpouštědel podle specifikace v TABULCE II.

DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ:

Použití vakua:

Po přidání každého rozpouštědla zapněte vakuum a nechejte směs rozpouštědel **úplně** protéci přes patronu; pak teprve pokračujte přidáním dalšího rozpouštědla. Zapněte a vypněte vakuum v krocích doporučených v TABULCE II (podle preferencí je možno vakuum vypnout před každým přidáním rozpouštědla). Vakuum je nutno nastavit na hodnotu 254 mm Hg (10 palců Hg) nebo nižší. Každou směs rozpouštědel eluujte přes výstupní port „WASTE“ a do příslušné odpadní nádoby, až do doby, kdy nastane krok finálního odběru.

Aplikace vzorku:

Vzorek lze na patronu buď přímo nalít, nebo nakápnout pipetou.

Mezi aplikacemi nenechte patrony schnout na vzduchu déle než 5 minut.

Příprava patrony C₁₈OH:

Patrony C₁₈OH je nutno před prvním použitím promýt 5 ml roztoku 90:10 hexanu a metylenchloridu, 5 ml IPA a 5 ml metanolu. Rozpouštědlový roztok 90:10 hexan/metylenchlorid je možno připravit smícháním 900 ml hexanu a 100 ml metylenchloridu. Novou, nepoužitou patronu vložte do přístroje VAC ELUT, nastavte pozici „WASTE“ a přidejte 5 ml roztoku 90:10 hexanu/metylenchloridu a pak 5 ml IPA do každé kolony a potom 5 ml metanolu. Každou směs rozpouštědel nechejte úplně projít přes patrony, a pak teprve pokračujte s další směsí. Po této počáteční přípravě nebude nutné tento krok opakovat, jelikož patrony budou regenerovány během procesu extrakce.

POZNÁMKA: Mají-li se extrahovat další vzorky (více než 24), regenerujte patrony za použití metody specifikované v TABULCE II. Patrony lze použít opakovaně (maximální 30x).

POZNÁMKA: Materiál patrony C₁₈OH je přidržován na místě pomocí frity z porézních vláken. Patrony s uvolněnými nebo chybějícími fritami zlikvidujte, protože může chybět materiál C₁₈OH.

TABULKA II

Popis a analýza extrakce	Kroky extrakce	Manipulace s eluentem
<p>Příprava/regenerace kolony. Odstraňuje: interferující látky z předchozího použití (krok 1)</p>	<p>1. Přidjete 1 ml metanolu; zapněte vakuum.</p> <p>2. Vypněte vakuum.</p>	Zlikvidujte „WASTE“
<p>Aplikace vzorku</p>	<p>3. Aplikujte všechny vzorky, zapněte vakuum. Z kroku 10 postupu předběžné extrakce.</p>	Zlikvidujte „WASTE“
<p>Purifikace/odstranění metabolitů vitamínu D</p> <p>Odstraňuje: interferující polární lipidy, soli a pigmenty (krok 4)</p> <p>25(OH)D (krok 5)</p> <p>Zbývající 25(OH)D a 24,25(OH)₂D/25,26(OH)₂D (krok 6)</p>	<p>4. Přidjete 5 ml roztoku 70:30 metanolu a deionizované nebo destilované vody.</p> <p>5. Přidjete 5 ml roztoku hexanu a metylenchloridu 90:10.</p> <p>6. Přidjete 5 ml roztoku hexanu a izopropanolu 99:1.</p> <p>7. Vypněte vakuum.</p>	Zlikvidujte „WASTE“
<p>Odběr 1,25-(OH)₂D</p> <p>Eluce purifikovaného 1,25-(OH)₂D (krok 9)</p>	<p>DŮLEŽITÉ UPOZORNĚNÍ!</p> <p>8. Přidjete Vac Elut do polohy „Collect“.</p> <p>9. Přidjete 3 ml roztoku hexanu a izopropanolu 92:8. Zapněte vakuum.</p> <p>10. Vypněte vakuum.</p>	„COLLECT“

12. SUŠENÍ A REKONSTITUCE ELUÁTŮ

- 12.1** Zkumavky obsahující eluáty uložte do vyhřívacího bloku nebo vodní lázně a sušte při 37 °C (±2 °C).
- 12.2** Eluáty sušte v digestoři pod ochrannou atmosférou dusíku při tlaku 2-4 psi (doba sušení 20-30 minut).
- 12.3** Okamžitě po vysušení eluátu zkumavky vytáhněte.
- 12.4** Každý z vysušených extraktů rekonstituujte 50 µl 95% etanolu; jemně promíchejte na třepačce „vortex“ při nízké nebo střední rychlosti. Do stejných zkumavek obsahujících 50 µl 95 % etanolu přidejte 125 µl izotopového indikátoru a opět jemně promíchejte na třepačce „vortex“ při nízké nebo střední rychlosti. **POZNÁMKA:** Kroky promíchávání na třepačce „vortex“ jsou velmi důležité, protože zajišťují správnou rekonstituci vzorku, což je důležité pro dosažení dobré přesnosti. **UPOZORNĚNÍ:** Víř udržujte v dolní části zkumavky, aby nedocházelo ke ztrátě objemu vzorku a aby byl zajištěn dostatečný objem k pipetování v průběhu testu. Označte jednu další zkumavku pro celkový výsledek (Total Count – TC) a jednu zkumavku pro NSB. Do obou zkumavek přidejte 50 µl 95 % etanolu a 125 µl izotopového indikátoru. Použijí se k vytvoření duplicitních zkumavek TC a NSB pro sestavení testu.

- 12.5 Test provedte **okamžitě** po rekonstituci vzorků. Nejlepších výsledků u větších testů dosáhnete při rekonstitování 12-15 vzorků najednou a jejich napipetování do testu předtím, než se provede rekonstituce dalších 12-15 vzorků.

13. POSTUP STANOVENÍ

- 13.1 Vytvořte sadu označených zkumavek na jedno použití z borosilikátového skla 12 x 75 mm, a to pro každý kalibrátor (0-5) a pro kontrolní a neznámý vzorek podle schématu testu. Opatrně přidejte 75 µl rekonstituovaného extraktu kalibrátoru, kontrolního vzorku a vzorku do duplicitních testovacích zkumavek.
UPOZORNĚNÍ: Tento krok se musí provést opatrně, protože v každé zkumavce je pouze 25 µl navíc.
- 13.2 Viz krok číslo 4, „Sušení a rekonstituce eluátů“. Přidejte 75 µl ze zkumavky TC do duplicitních testovacích zkumavek. Opakujte tento krok také pro duplicitní testovací zkumavky NSB.
- 13.3 Do zkumavek NSB přidejte 300 µl pufru NSB.
- 13.4 Přidejte 300 µl primární protilátky do všech zkumavek kromě zkumavek TC a NSB.
- 13.5 Dobře promíchejte a inkubujte 2 hodiny (± 15 minut) při 20-25 °C.
POZNÁMKA: Rekonstituujte precipitační složku GAR přidáním 35 ml destilované nebo deionizované vody, důkladně promíchejte, až se suspenze viditelně zhomogenizuje, a potom nechejte stát minimálně 30 minut při pokojové teplotě; před použitím a během použití občas promíchejte.
- 13.6 Přidejte 500 µl dobře promíchané precipitační složky GAR do všech zkumavek kromě zkumavek TC. Inkubujte 20 minut (± 5 minut) při 20-25 °C.
- 13.7 Všechny zkumavky kromě zkumavek TC centrifugujte 20 minut při 20-25 °C a při 1800 x g*.
- 13.8 Slijte všechny supernatanty (kromě zkumavek TC) 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.
- 13.9 Změřte radioaktivitu všech zkumavek po dobu 1 minuty pomocí detektoru gama záření. Měření detektorem musí trvat minimálně 1 minutu (viz odstavec Omezení postupu).

14. POZNÁMKY K POSTUPU

- 14.1 Poměrný díl reagens přidávejte do dolní třetiny testovací zkumavky, aby se reagens dokonale promísila.
- 14.2 Správný podíl rozpouštědla má zásadní důležitost pro dobrou výtěžnost. Objemy připravte dostatečně velké, aby se minimalizovala chyba měření.
- 14.3 Pokud je naměřená hodnota některého vzorku vyšší než nejvyšší kalibrátor, musí se analyzovat znovu a před extrakcí se musí zředit kalibrátorem ze soupravy. Výsledek se musí vynásobit příslušným dilučním faktorem. Příklad: Smíchejte 500 µl vzorku s 500 µl kalibrátoru nuly, potom testujte 500 µl této směsi podle příbalové informace produktu.
- 14.4 Po průměrnou dobu provedení 100 testů nebyl pozorován žádný posun hodnot testu.

* $g = (1118 \times 10^{-8})$ (poloměr v cm) (ot/min)²

14.5 V zájmu kompletnosti monitorování konzistence funkce testu RIA musí laboratoř sledovat a kontrolovat ještě další faktory. Firma DiaSorin navrhuje pravidelné kontroly následujících parametrů k zajištění konzistentní funkce soupravy.

a. Celkové výsledky (TC)

b. Maximální vazba

Průměrný počet částic za minutu (CPM) zkumavek s nulovým kalibrátorem / průměrná hodnota CPM zkumavek TC.

c. Nespecifická vazba

Průměrný počet částic za minutu (CPM) zkumavek NSB / průměrná hodnota CPM zkumavek TC.

d. Strmost kalibrační křivky

Je možno sledovat 50% potlačení.

15. ŘÍZENÍ JAKOSTI

K monitorování funkce testu musí každá laboratoř při každém testu použít nejméně dva kontrolní vzorky (jeden kontrolní vzorek s normálním rozsahem a jeden kontrolní vzorek se zvýšeným rozsahem). Lze použít komerčně dostupné kontrolní vzorky nebo dva referenční vzorky dodané se soupravou.

S kontrolními vzorky je nutno zacházet jako s neznámými vzorky a musí se testovat duplicitně. Laboratoř musí pořizovat a uchovávat grafy řízení kvality, které dokumentují funkci kontrolních vzorků. Přijatelné limity funkčnosti je nutno určit pro každou individuální laboratoř 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.^{12,13,14}

16. 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 kontrolní laboratoře firmy DiaSorin je metoda závislosti %B/B₀ na logaritmickém průběhu koncentrace, založená na aproximačním programu Spline Smoothed Curve.

16.1 Výpočet procenta B/B₀

- Vypočítejte průměrnou hodnotu CPM pro každý kalibrační, kontrolní a neznámý vzorek.
- Odečtete průměrnou hodnotu CPM od hodnot pro zkumavky NSB pro všechna měření.
- Průměrnou korigovanou hodnotu CPM pro každý kalibrátor, kontrolní vzorek nebo neznámý vzorek podělte průměrnou korigovanou hodnotou CPM nulového kalibrátoru a vynásobte 100.

$$\frac{\text{Průměr CPM (kalibrátor nebo neznámý vzorek)} - \text{průměr CPM (NSB)}}{\text{Průměr CPM (kalibrátor 0) - průměr CPM (NSB)}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

16.2 Použití grafu kalibrační křivky

- Za použití 2 fázového papíru „log/logit“ nebo semilogaritmického papíru zakreslete procentuální B/B₀ (%) pro kalibrátory 1,25 (OH)2D na osu Y a koncentraci kalibrátoru na osu X.

POZNÁMKA: K analýze dat lze také použít programy na automatickou redukci dat. Firma DiaSorin používá systém Multi-Calc (Pharmacia) s programem LIN-LOG smooth-SPLINE fit. Další metody redukce dat se musí před začleněním do normálního použití validovat.

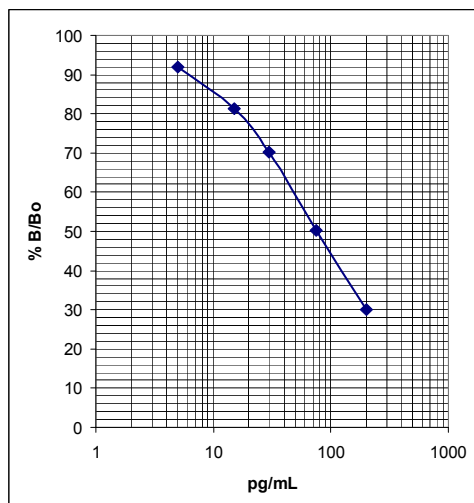
- b. Body spojte optimální křivkou.
- c. Interpolujte koncentrace 1,25-(OH)₂D ve vzorcích z grafu kalibrátorů.
- d. Pokud byl některý z neznámých vzorků zředěn, proveďte korekci podle příslušného dilučního faktoru.
- e. Rozsah detekce tohoto testu je 5,0 pg/ml až 200 pg/ml. Jakákoli hodnota nižší, než je nejnižší hodnota kalibrátoru 5,0 pg/ml, je extrapolovaná hodnota a může se hlásit jako „méně než 5 pg/ml“.
- f. Vypočítejte maximální vazbu dělením CPM nulového kalibrátoru průměrným celkovým výsledkem získaným pro zkumavky TC.

Typická data vzorku pro 1,25-(OH)₂D RIA ukazuje TABULKA IV a OBRÁZEK 1; tyto informace jsou pouze referenční a nesmí se používat pro výpočet žádného výsledku.

TABULKA IV
Vzorová data testu DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA

Zkumavka	Duplicitní CPM	Průměrný CPM	Korigovaný CPM	Procento navázaných (B/T)	Procent (B/B ₀)	Konc. (pg/ml)
Celkový výsledek	40792 40578	40685				
NSB	1438 1439	1439		3,5		
Kalibrátor 0	18006 18119	18063	16624	44,4	100,0	
Kalibrátory (pg/ml)						
1 (5,0)	16710 16770	16740	15302		92,0	
2 (15,0)	14941 14916	14929	13490		81,2	
3 (30,0)	13087 13124	13106	11667		70,2	
4 (75,0)	9820 9765	9793	8354		50,2	
5 (200)	6412 6464	6438	5000		30,0	
Kontrolní vzorky						
Proužek 1: normální rozsah	13275 13530	13403	11964		72,0	27,3
Proužek 2: zvýšený rozsah	8206 8124	8165	6727		40,5	119

Vzorová kalibrační křivka testu DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA



OBRÁZEK 1

REDUKCE DAT

Laboratoř kontroly kvality firmy DiaSorin používá program pro aproximaci a vyhlazení křivky.

17. OMEZENÍ POSTUPU

- 17.1 Doba detekce musí být dostatečně dlouhá, aby se zamezilo zanesení chyby v důsledku neúčinnosti detektoru (např. při akumulaci 2000 CPM bude chyba 5 %, při 10000 CPM bude chyba 1 %).
- 17.2 Při rozhodování o léčbě jednotlivých pacientů je nutné, aby kliničtí lékaři využívali výsledky testů společně s dalšími klinickými a laboratorními údaji.
- 17.3 Výkonnostní charakteristika tohoto testu nebyla stanovena pro pediatrické pacienty.

18. PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY

Referenční interval pro normální dárce

Je důležité, aby každá laboratoř stanovila svůj vlastní referenční interval, který je reprezentativní pro její typickou populaci. Nicméně v rámci klinické studie prováděné na třech pracovištích během letních a podzimních měsíců byly u 123 zjevně zdravých dobrovolníků ze tří měst na americkém Středozápadě zjišťovány hodnoty 1,25-(OH)₂D. Skupinu těchto 123 zdravých dárců tvořily rasově různorodé množiny 37 mužů a 86 žen ve věku od 21 do 68 let. Střední hodnota 1,25-(OH)₂D celého vzorku (n=123) byla 43,9 pg/ml. 95% referenční interval odhadnutý neparametrickou metodou (podle směrnice CLSI C28-A2¹⁵) byl 25,1-66,1 pg/ml.

Pacienti s chronickým selháním ledvin

Byla provedena klinická studie k vyhodnocení hladiny 1,25-(OH)₂D u dospělých pacientů, u nichž bylo diagnostikováno chronické selhání ledvin. Byl sestaven a testován vzorek 87 dobrovolníků s tímto onemocněním (49 mužů, 38 žen, ve věku od 19 do 84 let) z amerického Středozápadu. Zjištěný rozsah hodnot 1,25-(OH)₂D tohoto vzorku (n=87) byl 1,6-17,3 pg/ml. 95% horní referenční limit odhadovaný neparametrickou metodou je 14,2 pg/ml.

19. SPECIFICKÉ CHARAKTERISTIKY ÚČINNOSTI

19.1 Přesnost

Přesnost testu hodnotila firma DiaSorin na základě principů stanovených ve směrnici CLSI EP5-A.¹⁶ Byly testovány tři kontrolní hladiny vzorků lidského séra s koncentracemi 1,25-(OH)₂-D rozloženými v rozsahu testu po 25 testovacích dnů, což znamenalo více než 60 pracovních dnů. Do studie bylo zahrnuto více laboratorních pracovníků a více dávek všech komponent. Kombinované výsledky byly vyhodnoceny variantní analýzou (ANOVA) a jsou uvedeny v následující tabulce.

Vzorek	N	Střední hodnota pg/ml	V rámci testu		Mezi dny		Celkem	
			S.D.	%CV	S.D.	%CV	S.D.	%CV
Nízká	25	25,8	1,76	6,8	3,8	14,6	4,0	15,3
Střední	25	41,3	3,16	7,7	4,6	11,1	5,1	12,3
Vysoká	25	105,2	11,86	11,3	11,8	11,2	14,4	13,7

19.2 Spolehlivost: Spolehlivost stanovení byla ověřena pomocí testu linearity a testu výtěžnosti.

Linearita (paralelnost)

Firma DiaSorin hodnotila linearitu ředění podle doporučení směrnice CLSI EP6-P.¹⁷ Byly připraveny tři směsi jednotek séra pacientů sériovým ředěním pomocí nulového kalibrátoru; poměrné díly pak byly jednotlivě zmrazeny na -20 °C. Jednotlivé vzorky a ředění byly analyzovány ve více replikátech ve třech různých termínech provedení testu. Byly určeny předpokládané hodnoty podle neředěných vzorků směsi jednotek, jejichž hodnoty byly vynásobeny dilučním faktorem. Získaná data jsou souhrnně uvedena níže a sloučené výsledky jsou zakresleny jako lineární regrese předpokládaných versus naměřených hodnot.

Vzorek č.	Ředění	Předpokládaná hodnota (pg/ml) (N=10)	Střední naměřená hodnota (pg/ml) (N=10)
1	NEŘEDĚNÉ	49,6	49,6
	1:2	24,8	25,3
	1:4	12,4	11,1
	1:8	6,2	4,4
2	NEŘEDĚNÉ	50,2	50,2
	1:2	25,1	24,2
	1:4	12,6	12,2
	1:8	6,3	4,6
3	NEŘEDĚNÉ	62,0	62,0
	1:2	31	31,9
	1:4	15,5	13,4
	1:8	7,8	6,2

Výtěžnost

Byla hodnocena míra kvantitativní výtěžnosti testu, tj. schopnost získání veškeré analyzované látky přítomné v klinickém vzorku, a to přidáním různých množství čerstvě připraveného čistého antigenu proti 1,25-(OH)₂-D do třech směsí jednotek. Byly zvoleny a duplicitně analyzovány tři koncentrace a byla stanovena procentuální výtěžnost. Průměrné procento výtěžnosti stanovené touto metodou bylo 101 %.

Vzorek č.	Poč. konc.(pg/ml) 1,0 ml	Přidané množství (pg)	*Předpokl. (pg/ml)	Naměřené (pg/ml)	% Výtěžnost
1	30,8	50,0	77,7	75,6	97
		62,5	88,9	87,2	98
		75,0	99,8	103	103
2	42,8	50,0	89,2	89,5	100
		62,5	100,3	98,9	99
		75,0	111,0	118	106
3	40,3	50,0	86,8	83,9	97
		62,5	97,9	103	105
		75,0	108,8	118	108

*Výpočet předpokládané koncentrace zahrnuje diluční faktor zavedený přidaným roztokem.

19.3 Analytická citlivost

Bylo zjištěno, že citlivost tohoto testu, definovaná jako nejnižší množství odlišitelné od nuly při dvojnásobku odchylky kalibrátoru pod střední hodnotu cpm kalibrátoru nuly (n=20), je ≤2,0 pg/ml.

19.4 Analytická specifita

Údaje o zkřížené reaktivitě antiséra použitého v této soupravě jsou vyjádřeny jako poměr koncentrace 1,25-(OH)₂D₃ ke koncentraci zkříženě reagující látky při 50% potlačení maximální vazby.

Analyzovaná látka	Konc. při 50% B/Bo	Zkřížená reaktivita %
24,25 D ₃	76420 pg/ml	<0,5
25,26 D ₃	24330 pg/ml	<0,5
25 D ₃	>>>1 mg/ml	<0,5

19.5 Interferující látky

Byla provedena studie interference ke zjištění, zda zvýšené úrovně obecných endogenních látek mohou negativně ovlivnit výsledky testu. Toto hodnocení bylo konzistentní se směrnici CLSI (EP7-P).¹⁸ Byly testovány tři vzorky lidského séra, obsahující nízkou, střední a vysokou hladinu 1,25-(OH)₂-D₃, a to buď s přidáním testované látky, nebo jako kontrolní vzorky, do nichž byl přidán identický objem vehikula testované látky. Každý vzorek by extrahován dvakrát a byly vytvořeny čtyři replikáty. Níže uvedené výsledky demonstrují, že žádná z testovaných látek nezpůsobuje u testovaných kontrolních vzorků interferenci podle statistického testování ANOVA (95% interval spolehlivosti) ani podle střední hodnoty vzorků s přidanou látkou převyšujících ± 2 odchylky rozsahu kalibrátoru.

Bilirubin

Vzorek č.	Stř. hodn. kontrol. vz. (pg/ml)	Rozsah 2 SD kontr. vz.	Stř. h. bilirubin (pg/ml)	Interference ANOVA
Nízká	19,9	18,5-21,3	19,5	0,54
Střední	31,7	27,7-35,7	29,9	0,22
Vysoká	79,7	63,5-95,9	83,2	0,45

Cholesterol

Vzorek č.	Stř. hodn. kontrol. vz. (pg/ml)	Rozsah 2 SD kontr. vz.	Stř. h. cholesterol (pg/ml)	Interference ANOVA
Nízká	19,9	18,5-21,3	19,4	0,64
Střední	31,7	27,7-35,7	29,7	0,15
Vysoká	79,7	63,5-95,9	75,2	0,40

Triglyceridy

Vzorek č.	Stř. hodn. kontrol. vz. (pg/ml)	Rozsah 2 SD kontr. vz.	Stř. h. triglyceridy (pg/ml)	Interference ANOVA
Nízká	14,7	12,9-16,5	15,1	0,88
Střední	30,4	22,4-38,4	33,4	0,25
Vysoká	92,6	69,5-116,9	95,4	0,68

Hemoglobin

Vzorek č.	Stř. hodn. kontrol. vz. (pg/ml)	Rozsah 2 SD kontr. vz.	Stř. h. hemoglobin (pg/ml)	Interference ANOVA
Nízká	21,5	17,5-25,5	20,8	0,53
Střední	38,6	35,4-41,8	40,0	0,43
Vysoká	112,7	101,4-124,0	120,6	0,17

Močovina

Vzorek č.	Stř. hodn. kontrol. vz. (pg/ml)	Rozsah 2 SD kontr. vz.	Stř. h. močovina (pg/ml)	Interference ANOVA
Nízká	25,1	20,9-29,3	26,6	0,39
Střední	36,2	23,8-48,6	35,9	0,96
Vysoká	120,1	97,4-142,8	118,6	0,82

SEZNAM LITERATURY VIZ POSLEDNÍ STRANA

SCHÉMA ANALÝZY

1. Kalibrátory, kontrolní vzorky a neznámé vzorky se po vysušení na koloně rekonstituují 95% etanolem a izotopovým indikátorem.
3. Reagens dávkuje podle následujícího schématu:

Zkumavky/reagens	Celkové výsledky	NSB	Kal. 0-5	Kontrolní a neznámé vzorky
Rekonstituované kalibrátory	-	-	75 µl	-
Rekonstituované kontrolní a neznámé vzorky	-	-	-	75 µl
95% etanol a izotopový indikátor**	75 µl	75 µl	-	-
Pufr NSB	-	300 µl	-	-
Antisérum 1,25-(OH) ₂ -D	-	-	300 µl	300 µl

POZNÁMKA: Zkumavky TC a NSB se vytvoří přidáním 50 µl 95% etanolu se 125 µl izotopového indikátoru a napipetováním 75 µl této směsi do duplicitních testovacích zkumavek.

3. Dobře promíchejte a inkubujte 2 hodiny (±15 minut) při 20-25 °C.
4. Přidejte 500 µl precipitační složky GAR do všech zkumavek kromě zkumavek TC.
5. Dobře promíchejte a inkubujte 20 minut (± 5 minut) při 20-25 °C.
6. Centrifugujte při 1800 x g* po dobu 20 minut při teplotě 20-25 °C.
7. Slijte supernatanty.
8. Každou zkumavku změřte detektorem gama záření po dobu 1 minuty.

$$*g = (1118 \times 10^{-8})(\text{poloměr v cm})(\text{ot/min})^2$$

1,25-DIHYDROKSYVITAMIN D ¹²⁵I RIA-Kit

1. BRUKSOMRÅDE

FOR BRUK TIL IN VITRO-DIAGNOSTIKK.

1,25-dihydroksyvitamin D ¹²⁵I RIA er en radioimmunoanalyse basert på kompetitiv likevekt og beregnet på den kvantitative determinasjonen av 1,25-dihydroksyvitamin D (1,25-(OH)₂-D) i humant serum eller EDTA-plasma. Den skal brukes til å vurdere 1,25-(OH)₂-D-mangel relatert til nyresykdom. Analyseresultater skal brukes i sammenheng med øvrige kliniske data og laboratoriedata for å hjelpe klinikerer med å ta beslutninger om individuell pasientstyring i voksne pasientpopulasjoner.

2. SAMMENDRAG OG FORKLARING

D-vitaminet kommer fra 2 kilder: eksogent (fra føden) og endogent (biosyntese, regulert av eksponering for ultrafiolett lys). Den eksogene eller næringsmessige kilden omfatter matvarer med naturlig lave nivåer D-vitamin₂ (f.eks. melk, smør, frokostblanding tilsatt D-vitamin₂), kosttilskudd i form av reseptfrie vitaminer samt reseptbelagte medikamenter med D₂-vitaminer.¹ D-vitamin har i seg selv ingen aktivitet når det kommer inn i blodsirkulasjonen fra føden eller den fotokjemiske prosessen. Biologisk aktivitet oppnås først etter en kompleks serie metabolske trinn.²

Man vet nå at den metabolske aktiveringen av D-vitamin reguleres på en komplisert måte, og i høy grad påvirkes av variabler som kalsium- og fosfor i kosten, graden D-vitaminmangel, genetisk betingede mangler, konsentrasjonen av parathormon, eksponering for ultrafiolett lys og nyrefunksjonen.³ Biosyntesen av de dihydroksylerte formene av D-vitamin₃ begynner med at ultrafiolett sollys virker på 7-dehydrokolesterol slik at D-vitamin₃ dannes i huden. Når D-vitamin₃ kommer inn i sirkulasjonen tas det raskt opp av leveren, der det metaboliseres til 25-hydroksyvitamin D₃ (25-OH-D₃). Leveren vil også hydrolykere D-vitamin₂ fra føden til 25-hydroksyvitamin D₂ (25-OH-D₂).^{2,4}

Etter hydroksyleringen i leveren bindes 25-OH-D til D-vitaminbindende proteiner og transporters til nyren, der ytterligere hydrolyksing finner sted. Tillegget av et hydroksyl på posisjon 1 danner 25-dihydroksyvitamin D (1,25-(OH)₂-D). 1,25-dihydroksyvitamin D er den mest potente naturlig forekommende D-vitaminmetabolitten som det kjennes til så langt, og produksjonen av dette reguleres nøye gjennom serumkonsentrasjonene av kalsium, fosfor og parathormon. Ved kalsiumbelastning er 1,25-(OH)₂-D den viktigste D-vitaminmetabolitten som dannes i nyren.^{5,6}

Dette kommer av at den spiller en fundamental rolle i den effektive aktive absorpsjonen av kalsium og fosfor, så vel som i deres normale metabolisme. Målingen av 1,25-(OH)₂-D er derfor raskt i ferd med å bli et effektivt redskap i forskningen av sykdommer og forhold som påvirker den normale metabolismen av fosfor og kalsium.^{7,8,9}

3. ANALYSEPRINSIPPER

DiaSorin 1,25-(OH)₂-D-analysen består av to trinn. Først utføres en forberedende ekstraksjon og påfølgende rengjøring av D-vitaminmetabolitter fra serum eller EDTA-plasma ved hjelp av C₁₈-OH-kassetter.¹⁰ Etter ekstraksjonen, analyseres den behandlede prøven ved hjelp av en kompetitiv RIA-prosedyre. RIA-metoden er basert på et polyklonalt antistoff som er spesifikt for både 1,25-(OH)₂-D₂ og 1,25-(OH)₂-D₃. Prøven, antistoffet og sporstoffet inkuberes i 2 timer ved 20-25°C. Faseseparasjon oppnås ved å inkubere i 20 minutter ved 20-25°C i tilstedeværelsen av et utfellingskompleks med et sekundært antistoff. Etter sentrifugering og dekantering, telles den gjenværende bundne fraksjonen i pelletten i en gammateller. Verdiene beregnes direkte fra en kalibratorkurve med kjente konsentrasjoner. Sluttkonsentrasjonen av 1,25-(OH)₂-D i serum- og EDTA-plasmaprøvene uttrykkes som pg/mL.

4. REAGENSER SOM FØLGER MED KITET

1,25-(OH) ₂ D NSB-BUFFER	1 flaske/3 mL
1,25-(OH) ₂ D KALIBRATOR O	1 flaske/20 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ KALIBRATOR 1-5	5 flasker/3 mL
1,25-(OH) ₂ D ANTISERUM	1 flaske/35 mL
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 flaske/10 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ FORBEHANDLINGSLØSNING	1 flaske/50 mL
1,25-(OH) ₂ D GAR-UTFELLINGSKOMPLEKS	2 flasker/35 mL
1,25-(OH) ₂ D KONTROLLSERUM	2 flasker/3 mL
95 % ETANOL	1 flaske/7 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.

Når innholdet i flaskene rekonstitueres, må du blande forsiktig for å unngå skumdannelse. Alle rekonstituerte reagenser må oppbevares ved -15°C eller lavere umiddelbart etter bruk. Reagenser fra ulike partier må ikke blandes.

4.1 1,25-(OH)₂D NSB-buffer: Reagens klar til bruk

Kaliumfosfatgelatinbuffer med ProClin® 300 (< 0,2 %).

4.2 1,25-(OH)₂D 0-kalibrator: Reagens klar til bruk

Fosfatbuffer med bovine serumproteiner og ProClin 300 (< 0,2 %).

4.3 1,25-(OH)₂D₃ Kalibratorene (1-5): Lyofiliserte reagenser

Fem lyofiliserte kalibratorene med (1,25-(OH)₂D₃) ved konsentrasjoner på 5 -200 pg/mL som inneholder humant serum og ProClin 300 (<0,2 %). Rekonstituer hver kalibrator med 3,0 mL av kalibrator null. Eksakte konsentrasjoner er angitt på flaskeetikettene. Kalibratorene i kitet har blitt kalibrert ved hjelp av UV-kvantifisering. Kit-kalibratorene kan betraktes som likeverdige med pasientprøver når de brukes med reagensene og operasjonsprosedyren som er anbefalt for denne diagnostiske in vitro-testen.

4.4 1,25-(OH)₂D Antiserum: Reagens klar til bruk

Anti-1,25-(OH)₂D-serum fra kanin, fortynnet med fosfatgelatinbuffer med ProClin 300 (< 0,2 %).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃ Reagens klar til bruk

Radio-jodert 1,25-(OH)₂D₃-analog fortynnet med etylenglykolfosfatbuffer.

4.6 1,25-(OH)₂D₃ Forbehandlingsløsning: Reagens klar til bruk

Kaliumfosfatbuffer.

4.7 1,25-(OH)₂D-kontroller: Nivå 1 (normalt), Nivå 2 (forhøyet): Reagens klar til bruk En behandlet serumpool som inneholder ProClin 300 (< 0,2 %), tilsatt egnede mengder 1,25-(OH)₂D for å oppnå kontrollkonsentrasjoner innenfor de angitte områdene. Kontroll 1 ligger innenfor normalområdet og kontroll 2 ligger innenfor et forhøyet område. Konsentrasjonsområdene for hver kontroll er angitt på analysesertifikatet og viser grensene som er fastslått av DiaSorin for kontrollverdier som kan oppnås i pålitelige analysekjøringer.

4.8 Utfellingskompleks av typen anti-kanin serum fra geit (GAR): Lyofilisert reagens

Normalt kanin serum, forhåndsutfelt med anti-kanin serum fra geit og polyetylen glykol (PEG), fortynnes med BSA-boratbuffer med 0,1 % natriumazid og andre konserveringsmidler tilsatt (lyofilisert). Rekonstituer flaskens innhold med 35 mL destillert eller avionisert vann. Bland grundig til suspensjonen virker homogen og la den deretter stå i minst 30 minutter ved romtemperatur. Bland nå og da.

4.9 95 % etanol. Reagens klar til bruk
95 % etanol og 5 % vann.

MERK: C₁₈OH-kassetter kreves også for denne prosedyren. Disse kassetene må bestilles separat. Angi DiaSorins katalognummer 65101E.

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, erverves, eies og brukes av leger, kliniske laboratorier, sykehus 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, hepatitt C-virus (HCV), Humant immunsvikt virus (HIV) eller andre smittestoffer 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 forebygge oppbygging av azid. Hvis du vil ha mer informasjon, kan du se "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," i Manual Guide-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)

R20/21/22 – Skadelig ved innånding, hudkontakt og svelging.

R32 – Kontakt med syrer frigjør svært giftig gass.

S28 – Etter kontakt med hud, må du straks vaske med rikelig med vann.

REAGENSER SOM INNEHOLDER ETANOL

EU-risikosestninger for farlige stoffer (rådsdirektiv 1999/45/EC)

R11 – Svært brannfarlig

S16 – Hold på avstand fra tennekilder — Ingen røyking.

S43 – Ved brannslukking, bruk pulver eller karbondioksid

REAGENSER SOM INNEHOLDER JOD-125

Dette kitet inneholder radioaktivt materiale som ikke overstiger 5,5 μCi (204 kBq) jod-125. Passende forholdsregler og god laboratoriepraksis skal brukes i oppbevaringen, håndteringen og avhendingen 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 angitt 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.
- 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 AV SERUM OG PLASMA

1,25-dihydroksyvitamin D-kitet krever 500 μL serum eller EDTA-plasma for å utføre analyseekstraksjonen. Et volum på 1,5 mL vil gjøre det mulig å gjenta analysen samtidig som det gir tilstrekkelig pipetteringsvolum.

Kitet kan brukes både med humant serum og human plasma. Antikoagulasen EDTA kan brukes med denne analysen. En fastprøve anbefales men er ikke et krav. Blod skal tas aseptisk ved hjelp av venepunksjon i et 5 eller 10 mL evakuert glassrør.

For serum, må du la blodet levre seg ved romtemperatur (15-25°C). Sentrifuger i 15 minutter ved ca. 760 $\times g^*$ 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.

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

Serum- eller plasmaprøver må oppbevares ved -15°C eller lavere. Prøver må ikke fryses og tines flere ganger. En studie gjennomført av DiaSorin påviste imidlertid ingen signifikant endring i verdier som følge av at prøvene gjennomgikk 3 sykluser med frysing-opptining. DiaSorin har oppbevart prøver i opptil 6 måneder ved -15°C eller lavere uten at dette har ført til en signifikant forandring av resultatene.

8. UTSTYR OG MATERIALE SOM KREVES, MEN IKKE FØLGER MED

- 8.1 C₁₈OH-kassetter (24 kassetter) bestilt separat med DiaSorins katalognummer 65101E.
- 8.2 Engangs borosilikatrør av glass, 12 x 75 mm og 13 x 100 mm.
- 8.3 Prøverørstativ.
- 8.4 Parafilm eller tilsvarende for å dekke over prøverørene.
- 8.5 Skumstativ for dekantering eller tilsvarende.
- 8.6 Sentrifuge med plass til 12 x 75 mm rør og mulighet til å oppnå 1800 x g*.
- 8.7 Gammateller som kan telle ¹²⁵I.
- 8.8 Rotasjonsblander.
- 8.9 Pipetteringsinnretninger:
 - a. Mikropipetter kalibrerte for 75 µL, 300 µL og 500 µL.
 - b. Repeterende dispensere for 50 µL, 300 µL og 500 µL.
 - c. Volumetriske pipetter for rekonstituering av kalibratorer, 3,0 mL.
- 8.10 Avionisert eller destillert vann.
- 8.11 Organiske løsningsmidler:

Følgende løsningsmidler behøves for preparering og ekstraksjon av prøvene.

Bruk kun løsningsmidler av HPLC-kvalitet.

La ikke noe av det organiske løsningsmidlet komme i kontakt med syrevasket glasstøy eller andre sure betingelser.

 - a. Acetonitril.
 - b. Metanol.
 - c. Heksan. (VIKTIG: n-heksan i prosent må være minst 95 %)
 - d. Metylenklorid (må **ikke** inneholde alkohol som konserveringsmiddel).
 - e. Isopropanol (2-propanol).
- 8.12 Anbefalt apparat C₁₈OH-kassettenes:
 - a. Vac Elut prøvebehandlingsstasjon. Behandler 24 kolonner per analyse. Kan bestilles fra Analytichem International eller DiaSorin. Hvis du vil bestille fra DiaSorin, bruker du DiaSorins katalognummer 11610.
- 8.13 Nødvendig materiale for tørkning av prøver:
 - a. Nitrogengass.
 - b. Tørkegrenrør med 37°C (±2°C) varmeblokk eller vannbad:

N-EVAP eller MULTI-VAP som kan bestilles fra Organomation Associates (Berlin, Massachusetts, USA) eller Reacti-Vap II og Reacti-Therm III som kan bestilles gjennom Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois, USA).

* g = (1118 x 10⁻⁸) (radius i cm) (rpm)²

9. PREPARERING AV ORGANISKE LØSNINGSMIDLER FOR KOLONNEEKSTRAKSJONEN

MERK: De organiske løsningsmiddelblandingene skal prepareres før den forberedende ekstraksjonsprosedyren påbegynnes.

FORHOLDSREGLER:

Preparer løsningsmiddelblandinger som beskrevet i TABELL I. DiaSorin anbefaler et preparert volum på 500 mL. Større eller mindre volum kan prepareres så lenge som proporsjonene forblir de samme. Volumene skal imidlertid være store nok til å minimere målingsfeil. Mål opp hvert løsningsmiddel separat for beste resultat.

FORHOLDSREGLER:

Bruk destillert eller avionisert vann der det er relevant.

TABELL I
Preparering av løsningsmiddel

Proporsjoner	Løsningsmiddel	1 l	500 mL
70:30	metanol	700 mL	350 mL
	vann	300 mL	150 mL
90:10	heksan	900 mL	450 mL
	metylenklorid	100 mL	50 mL
99:1	heksan	990 mL	495 mL
	IPA	10 mL	5 mL
92:8	heksan	920 mL	460 mL
	IPA	80 mL	40 mL

10. FORBEREDENDE EKSTRAKSJONSPROSEDYRE

- 10.1** Rekonstituer hver lyofiliserte kalibrator med 3,0 mL av kalibrator null. Bland kalibratorene godt og la dem stå i 15-20 minutter slik at rekonstitueringen blir fullstendig. Tin eventuelle frysede reagenser fullstendig. La alle reagenser anta romtemperatur. Se til at reagensene ikke blir varmere enn 25°C. Bland alle reagenser godt før bruk.
- 10.2** Pipetter 500 µL av hver kalibrator (0-5), kontroll og pasientprøve til merkede 12 x 75 mm borosilikatrør av glass.
- 10.3** Tilsett 500 µL acetonitril til hver prøve og roter nå og da, minst 3 ganger, i løpet av en tidsperiode på 10 minutter.
- 10.4** Sentrifuger rørene ved 760 x g* i 10 minutter ved 20-25°C.
- 10.5** Dekanter supernatantene fra prøvene til merkede 12 x 75 mm eller 13 x 100 mm (hvis ønsket) prøverør. Avhend pelletene.
- 10.6** Tilsett 500 µl forbehandlingsløsning til hvert rør og roter.
MERK: Kitet er beregnet på å rekke til 48 ekstraksjoner inkludert kalibratorene og kontrollene samt 40 ukjente prøver. Dette betyr at 24 prøver kan ekstraheres på VacElut-enheten umiddelbart og de resterende 24 prøvene senere. Kolonneekstraksjonene skal utføres så snart som mulig etter at forbehandlingsløsningen er tilsatt. Så snart en kolonne er ekstrahert, kan imidlertid prøver oppbevares i 96 timer ved -15 °C eller lavere.
- 10.7** Prøvene er nå klare til å appliseres på C₁₈OH-kassetene.

* g = (1118 x 10⁻⁸) (radius i cm) (rpm)²

11. KOLONNEPROSEDYRE

- 11.1 En beskrivelse av hvordan VAC ELUT fungerer kan finnes i bruksanvisningen dens. Sett sammen stasjonen i henhold til anvisningene.
- 11.2 Merk et 13 x 100 mm borosilikatrør av glass for hver kalibrator (0-5), kontroll og ukjente prøve. Sett rørene i VAC ELUT. Kontroller at lokket på VAC ELUT er i posisjonen "WASTE" (avfall) og at rørene er plasserte slik at de samler opp riktig eluat. Plasser C₁₈OH-kassetten på VAC ELUT-lokket.
- 11.3 Tilsett løsningsmiddelblandingen til den angitte kassetten som beskrevet i TABELL II.

VIKTIG:

Bruk av vakuuum:

Sett på vakuuum etter hver tilsetning av løsningsmiddel og la løsningsmiddelblandingen passere **fullstendig** gjennom kassetten før du går videre til neste løsningsmiddel. Slå på og av vakuuum ved de anbefalte trinnene i TABELL II (hvis ønsket, kan vakuuum slås av mellom hver tilsetning av løsningsmiddel). Vakuuemet skal være innstilt på 254 mm Hg (10 tommer) eller lavere. Eluer hver løsningsmiddelblanding gjennom "WASTE" (avfall)-utløpet til de egnede avfallsbeholderne fram til det endelige oppsamlingstrinnet.

Applisering av prøve:

Prøvene kan enten dekanteres direkte på kassetten eller appliseres med pipette. La ikke kassetten lufttørke i mer enn 5 minutter mellom appliseringene.

Forbehandling av C₁₈OH-kassetter:

C₁₈OH-kassetten skal vaskes med 5 mL heksanmetylenklorid (90:10), 5 mL IPA og 5 mL metanol før de brukes for første gang. Heksanmetylenkloridblandingen (90:10) kan prepareres ved å måle 900 mL heksan og 100 mL metylenklorid. Plasser de nye, ubrukte kassetten på VAC ELUT-apparatet, still den i "WASTE" (avfall)-posisjon og tilsett 5 mL heksanmetylenklorid (90:10) etterfulgt av 5 mL IPA til hver kolonne og deretter 5 mL metanol. La hver løsningsblanding passere helt gjennom kassetten før du går videre til neste blanding. Etter denne innledende prepareringen, vil det ikke være nødvendig å gjenta dette trinnet siden kassetten vil regenereres under ekstraksjonen.

MERK: Hvis flere prøver skal ekstraheres (mer enn 24), regenererer du kassetten ved hjelp av den samme metoden som beskrives i TABELL II. Kassetten kan gjenbrukes opptil 30 ganger.

MERK: Materialet i C₁₈OH-kassetten holdes på plass av en porøs fiberfritte. Avhend kassetter med løse eller manglende fritter, siden C₁₈OH-materialet kan gå tapt.

TABELL II

Beskrivelse og analyse av ekstraksjonen	Ekstraksjonstrinn	Håndtering av elueringsvæske
Preparering/regenerasjon av kolonne Fjerner: Interfererende substanser fra foregående bruk (trinn 1)	1. Tilsett 1 mL metanol, slå på vakuum. 2. Slå av vakuum.	Avhend "WASTE"
Applisering av prøve	3. Appliser alle prøver, slå på vakuum. Fra Forberedende ekstraksjonsprosedyre (trinn 10).	Avhend "WASTE"
Rensing/fjerning av D-vitaminmetabolitter Fjerner: Interfererende polare lipider, salter og pigmenter (trinn 4) 25(OH)D (trinn 5) Gjenværende 25(OH)D og 24,25(OH) ₂ D/25,26(OH) ₂ D (trinn 6)	4. Tilsett 5 mL metanol-vannblanding (70:30, avionisert eller destillert) 5. Tilsett 5 mL heksan/metylklorid (90:10). 6. Tilsett 5 mL heksan/isopropanol (99:1). 7. Slå av vakuum.	Avhend "WASTE"
Innsamling av 1,25-(OH)₂D Buering av renset 1,25-(OH) ₂ D (trinn 9)	VIKTIG! 8. Sett Vac Elut til "Collect:" 9. Tilsett 3 mL heksan/isopropanol (92:8), slå på vakuum. 10. Slå av vakuum.	"COLLECT"

12. TØRKNING OG REKONSTITUERING AV ELUATER

- 12.1** Plasser prøverørene med eluatene i en varmeblokk eller et vannbad ved 37°C (±2°C) for tørkning.
- 12.2** Tørk eluatene under et avtrekksskap ved 2-4 psi nitrogengass (tørketid 20-30 minutter).
- 12.3** Ta ut rørene så snart eluatet har tørket.
- 12.4** Rekonstituer hvert av de tørkede ekstraktene med 50 µL 95 % etanol og roter forsiktig ved lav til mellomhøy hastighet. Tilsett 125 µL sporstoff til de samme rørene og roter forsiktig igjen ved lav til mellomstor hastighet. **MERK:** Roteringsstrinnene er svært viktige for å sikre at prøvene rekonstitueres på riktig måte og for å få god presisjon. **FORSIKTIG:** Hold rotasjonsblandingen mot den nederste delen av røret for å unngå at prøvevolum går tapt. Dette vil sørge for at det er nok pipetteringsvolum for analysen. Merk opp ett ekstra rør for totaltelling og ett rør for NSB. Tilsett 50 µL 95 % etanol og 125 µL sporemne til begge rørene. Disse vil brukes til å skape de doble rørene for TC (totaltelling) og NSB for analyseoppsettet.
- 12.5** Utfør analysen **umiddelbart** etter at prøvene er rekonstituerte. Ved større analyser oppnås best resultat ved å rekonstituere 12-15 prøver om gangen og deretter pipettere dem til analysen før de neste 12-15 prøvene rekonstitueres.

13. ANALYSEPROSEDYRE

- 13.1 Still opp merkede 12 x 75 mm engangs borosilikatrør av glass i duplikat for hver kalibrator (0-5), kontroll og prøve i henhold til analyseskjemaet. Tilsett forsiktig 75 µL rekonstituert ekstrakt av kalibrator, kontroll og prøve til de duplikate analyserørene.
FORSIKTIG: Dette trinnet må utføres med omhu siden det kun finnes 25 µL ekstra i hvert rør.
- 13.2 Se trinn 4, "Tørkning og rekonstituering av eluater". Tilsett 75 µL fra røret for TC (totaltelling) til duplikate analyserør. Gjenta dette trinnet for de duplikate NSB-analyserørene.
- 13.3 Tilsett 300 µL NSB-buffer til NSB-rørene.
- 13.4 Tilsett 300 µL primært antistoff til alle rørene med unntak av totaltellinger og NSB-rør.
- 13.5 Bland godt, inkuber i 2 minutter (± 15 minutter) ved 20-25°C.
MERK: Rekonstituer GAR-utfellingskomplekset med 35 mL destillert eller avionisert vann. Bland grundig til suspensjonen virker homogen og la den deretter stå i minst 30 minutter ved romtemperatur. Bland nå og da før og under bruk.
- 13.6 Tilsett 500 µL godt blandet GAR-utfellingskompleks til alle rør med unntak av totaltellingsrørene. Inkuber i 20 minutter (± 5 minutter) ved 20-25°C.
- 13.7 Sentrifuger samtlige rør i 20 minutter ved 20-25°C og 1800 x g*, med unntak av totaltellingsrørene.
- 13.8 Dekanter supernatantene, med unntak av totaltellingsrørene, med en rørstativholder av skum eller tilsvarende 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.
- 13.9 Mål radioaktiviteten ved å telle alle rør i 1 minutt i en gammateller. Rørene må telles i minst 1 minutt (se avsnittet Prosedyrebegrensninger).

14. PROSEDYREKOMMENTARER

- 14.1 Tilsett hver reagensaliquot til den nederste tredjedelen av prøverøret slik at reagensene blandes fullstendig.
- 14.2 Korrekte proporsjoner av løsningsmidler er avgjørende for god gjenvinning. Løsningene må prepareres i store nok volum til å minimere målingsfeil.
- 14.3 Hvis en prøve gir en høyere verdi enn den høyeste kalibratoren, skal den analyseres på nytt ved å fortynne den med kit-kalibratoren null før ekstraksjon. Resultater skal multipliseres med den passende fortynningsfaktoren. For eksempel kan 500 µL av prøven blandes med 500 µL av kalibrator null, og deretter analyseres 500 µL av denne prøveblandingen i henhold til pakningsvedlegget.
- 14.4 Ingen analyseavvik ble observert i den gjennomsnittlige tiden det tar å utføre analyse på 100 rør.

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

14.5 For å fullstendig bekrefte at en RIA-analyse gir konsekvente resultater, kan laboratoriet kontrollere en rekke andre faktorer. DiaSorin anbefaler regelmessig kontroll av følgende parametre for å forsikre konsekvent kit-funksjon.

a. Totaltelling

b. Maksimal binding

Gjennomsnittlige tellinger per minutt (CPM) for rør med 0-kalibrator/CPM-gjennomsnitt for totaltellingsrør.

c. Uspesifikk binding

CPM-gjennomsnitt for NSB-rør/CPM-gjennomsnitt for totaltellingsrør.

d. Kalibratorkurvens helling

50 % suppresjon kan måles.

15. KVALITETSKONTROLL

Hvert laboratorium bør ta med minst to kontroller (en for normalt nivå og en for forhøyet nivå) i hver analyse for å kontrollere kitets egenskaper. Kommersiell tilgjengelige kontroller eller de to referansekontrollene som følger med kitet kan benyttes.

De brukte kontrollene skal behandles som ukjente prøver og analyseres i duplikat. Diagrammer for kvalitetskontroll bør føres av laboratoriet for å følge med på kontrollenes funksjon. Akseptable utførelsesgrenser skal bestemmes av hvert enkelt laboratorium for hvert kontrollnivå ved hjelp av statistiske metoder beregnet på å detektere både tilfeldige og systematiske feil. Kontrollresultater må overholde laboratoriets kriterier for godkjenning før resultatene fra pasientprøvene rapporteres.^{12,13,14}

16. BEREGNING AV RESULTATER

Det finnes mange metoder for å beregne resultatene fra RIA-analyser. 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 som benyttes ved DiaSorins laboratorier for kvalitetskontroll er en beregningsmetode basert på %B/B₀ kontra logaritmisk konsentrasjon ved hjelp av et program for myk tilpasning til Spline-funksjoner.

16.1 Beregning av B/B₀ i prosent

- Beregn CPM-gjennomsnitt for hver kalibrator, kontroll og ukjente prøve.
- Subtraher CPM-gjennomsnittet for NSB-rørene fra alle verdiene.
- Del den korrigerede CPM-verdien for hver kalibrator, kontroll eller ukjente prøve med den korrigerede CPM-verdien for 0-kalibratoren og multipliser med 100.

$$\frac{\text{gj.sn. CPM (kalibrator eller ukjent prøve)} - \text{gj.sn. CPM (NSB)}}{\text{gj.sn. CPM (0-kalibrator)} - \text{gj.sn. CPM (NSB)}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

16.2 Bruk av kalibratorkurve-diagram

- Bruk et dobbeltlogaritmisk kurvepapir eller semilogaritmisk kurvepapir på 2 sykluser og plott B/B₀ (%) i prosent for 1,25 (OH)₂D-kalibratoren på den vertikale akse (Y-aksen) mot kalibratorkonsentrasjonen på den horisontale akse (X-aksen).

MERK: Automatiske datareduksjonsprogrammer kan også brukes til å analysere data. DiaSorin benytter Multi-Calc (Pharmacia) med en myk LIN-LOG-tilpasning til SPLINE-funksjoner. Andre datareduksjonsmetoder må valideres før de tas i bruk regelmessig.

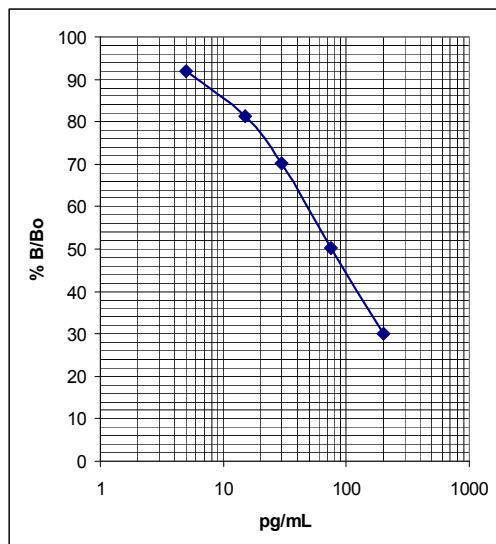
- b. Tegn den best tilpassede linjen mellom punktene.
- c. Interpoler 1,25-(OH)₂D-nivåene i prøvene fra kalibrordiagrammet.
- d. Hvis en ukjent prøve har blitt fortynnet, må du korrigere for den egnede fortynningsfaktoren.
- e. Det rapporterbare området for analysen er 5,0 pg/mL til 200 pg/mL. Eventuelle verdier som ligger under den laveste kalibratoren, 5,0 pg/mL, er ekstrapolerte og kan rapporteres som "mindre enn 5 pg/mL".
- f. Beregn maksimal binding ved å dele CPM for 0-kalibratoren med de gjennomsnittlige totaltellingene fra totaltellingsrørene.

Typiske prøvedata for 1,25-(OH)₂D-RIA vises i TABELL IV og FIGUR 1. Denne informasjonen er kun for referanse og skal ikke brukes til å beregne noen verdier.

TABELL IV
Eksempeldata for DiaSorin 1,25-(OH)₂D-RIA

Rør	Duplikat CPM	Gj.sn. CPM	Korrigert CPM	Prosent bundet (B/T)	Prosent (B/B ₀)	Kons. (pg/mL)
Totaltelling	40.792 40.578	40.685				
NSB	1.438 1.439	1.439		3,5		
0-kalibrator	18.006 18.119	18.063	16.624	44,4	100,0	
Kalibratorer (pg/mL)						
1 (5,0)	16.710 16.770	16.740	15.302		92,0	
2 (15,0)	14.941 14.916	14.929	13.490		81,2	
3 (30,0)	13.087 13.124	13.106	11.667		70,2	
4 (75,0)	9.820 9.765	9.793	8.354		50,2	
5 (200)	6.412 6.464	6.438	5.000		30,0	
Kontroller						
Nivå 1: normalt nivå	13.275 13.530	13.403	11.964		72,0	27,3
Nivå 2: høyt område:	8.206 8.124	8.165	6.727		40,5	119

Eksempel på kalibratorkurve for DiaSorin 1,25-(OH)₂D-RIA



FIGUR 1:

DATAREDUKSJON

DiaSorins laboratorium for kvalitetskontroll bruker en myk tilpasning til SPLINE-funksjoner.

17. PROSEDYRENS BEGRENSNINGER

- 17.1 Tellingstidene må være lange nok til å unngå statistiske feil grunnet ineffektiv telling (for eksempel gir en mengde på 2000 CPM en feil på 5 %, mens 10 000 CPM gir en feil på 1 %).
- 17.2 Analyseresultater skal brukes i sammenheng med øvrige kliniske data og laboratoriedata for å hjelpe klinikeren med å ta beslutninger om individuell pasientstyring.
- 17.3 Utførelsesegenskapene for denne analysen har ikke blitt etablert i en pediatrik populasjon.

18. FORVENTEDE VERDIER

Referanseintervall for friske blodgivere

Det er viktig at hvert laboratorium etablerer sitt eget referanseintervall som er representativt for dets typiske pasientpopulasjon. Det har imidlertid blitt samlet inn 1,25-(OH)₂D-verdier fra 123 tilsynelatende friske frivillige fra tre midtvestlige amerikanske byer i en klinisk studie utført ved tre steder i løpet av sommer- og høstmånedene. Disse 123 friske blodgiverne besto av en rasemessig blandet gruppe på 37 menn og 86 kvinner mellom 21 og 68 år. Den gjennomsnittlige 1,25-(OH)₂D-verdien for hele prøven (n=123) var 43,9 pg/mL. Referanseintervallet på 95 % beregnet ved hjelp av en ikke-parametrisk metode (i henhold til NCCLS' retningslinje C28-A2¹⁵) var 25,1-66,1 pg/mL.

Pasienter med terminal nyresykdom

En klinisk studie ble gjennomført for å evaluere 1,25-(OH)₂D-nivåene i en voksen populasjon med diagnosen terminal nyresykdom. Prøver fra 87 slike frivillige (49 menn og 38 kvinner mellom 19 og 84 år) fra tre midtvestlige amerikanske byer ble samlet inn og analysert. Det observerte området 1,25-(OH)₂D-verdier for denne prøven (n=87) var 1,6-17,3 pg/mL. Den øvre referansegrensen på 95 % beregnet av den ikke-parametriske prosedyren er 14,2 pg/mL.

19. SPESIFIKKE UTFØRELSESEGENSKAPER

19.1 Presisjon

DiaSorin vurderte presisjonen for analysen basert på prinsippene i CLSI' retningslinje (EP5-A).¹⁶ Tre kontrollnivåer basert på humant serum med 1,25-(OH)₂D-konsentrasjoner fordelt over hele analyseområdet ble analysert i løpet av 25 analysedager, i en periode på over 60 driftsdager. Flere teknikere samt flere ulike partinumre for alle komponentene inngikk. De kombinerte resultatene ble evaluert ved hjelp av variansanalyse (ANOVA) og oppsummeres i følgende tabell.

Prøve	N	Innen-serie			Mellom dager		Total	
		Gj.sn. pg/mL	S.D.	%CV	S.D.	%CV	S.D.	%CV
LAV	25	25,8	1,76	6,8	3,8	14,6	4,0	15,3
MIDDELS	25	41,3	3,16	7,7	4,6	11,1	5,1	12,3
HØY	25	105,2	11,86	11,3	11,8	11,2	14,4	13,7

19.2 Sikkerhet: Analysens sikkerhet har blitt kontrollert ved hjelp av en linearitetstest og en gjenvinningstest.

Linearitet (parallelitet)

Lineariteten ved fortynning ble evaluert av DiaSorin i henhold til anbefalingene i CLSI' retningslinje EP6-P.¹⁷ Tre pooler av pasientsera ble preparert gjennom seriell fortynning med kalibrator null og oppdelt i porsjoner fryste ved -20°C. Hver prøve og fortynning ble analysert gjentatte ganger på tre ulike datoer. De forventede verdiene ble bestemt ved de ufortynnede verdiene for hver prøvepool multiplisert med fortynningsfaktoren. Data oppsummeres nedenfor og de sammenlagte resultatene plottes som en lineær regresjon av forventet kontra observert verdi.

Prøvenr.	Fortynning	Forventet verdi (pg/mL) (N=10)	Gj.sn. observert verdi (pg/mL) (N=10)
1	UFORTYNNET	49,6	49,6
	1:2	24,8	25,3
	1:4	12,4	11,1
	1:8	6,2	4,4
2	UFORTYNNET	50,2	50,2
	1:2	25,1	24,2
	1:4	12,6	12,2
	1:8	6,3	4,6
3	UFORTYNNET	62,0	62,0
	1:2	31	31,9
	1:4	15,5	13,4
	1:8	7,8	6,2

Gjenvinning

Analysens evne til å kvantitativt gjenvinne all analytten i de kliniske prøvene ble evaluert ved å tilsette ulike mengder nypreparert rent 1,25-(OH)₂-D-antigen til tre pasientprøvepools. Tre konsentrasjoner ble valgt og analysert i duplikat, og gjenvinningen ble bestemt i prosent. Gjennomsnittlig %-gjenvinning med denne metoden var 101 %.

Prøvenr.	Oppr. kons. (pg/mL) 1,0 mL	Tilsatt mengde (pg)	*Forventet (pg/mL)	Observert (pg/mL)	% gjenvinning
1	30,8	50,0	77,7	75,6	97
		62,5	88,9	87,2	98
		75,0	99,8	103	103
2	42,8	50,0	89,2	89,5	100
		62,5	100,3	98,9	99
		75,0	111,0	118	106
3	40,3	50,0	86,8	83,9	97
		62,5	97,9	103	105
		75,0	108,8	118	108

*Forventet beregning av konsentrasjon inkluderer fortynningsfaktoren som ble introdusert med den tilsatte løsningen.

19.3 Analytisk sensitivitet

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 være ≤ 2,0 ng/mL.

19.4 Analytisk spesifisitet

Data vedrørende kryssreaktivitet av antiserum som brukes i dette kitet uttrykkes som forholdet mellom 1,25-(OH)₂D₃-konsentrasjon og den kryssreagerende substanskonsentrasjonen ved 50 % hemming av maksimal binding.

Analytt	Kons. ved 50 % B/Bo	% kryssreaktivitet
24,25 D ₃	76.420 pg/ml	<0,5
25,26 D ₃	24.330 pg/ml	<0,5
25 D ₃	>>>1 mg/ml	<0,5

19.5 Interfererende stoffer

En interferensstudie ble gjennomført for å determinere hvorvidt forhøyede nivåer av vanlige endogene stoffer kan ha en negativ innvirkning på analyseresultatene. Evalueringen var konsekvent med CLSI' retningslinjer (EP7-P).¹⁸ Tre prøver basert på humant serum med lave, medium eller høye nivåer 1,25-(OH)₂-D₃ ble enten testet med tilsetninger av prøvestoffet eller som kontroller tilsatt identiske mengder av prøvestoffets buffer. Hver prøve ble ekstrahert to ganger, hvilket ga fire doble analyser. Resultene presentert nedenfor viser at det ikke fantes noen interferens fra noen av de testede stoffene, hvilket ble determinert av statistisk analyse med ANOVA (95 % konfidensintervall), eller ved at gjennomsnittsverdien til de tilsatte prøvene avvok fra kontrollene med mer enn ± 2 standardavvik for kalibratorene.

Bilirubin

Prøvenr.	Gj.sn. for kontroll (pg/mL)	2 SD-område for kontroll	Gj.sn. for bilirubin (pg/mL)	Interferens ANOVA
Lav	19,9	18,5-21,3	19,5	0,54
Middels	31,7	27,7-35,7	29,9	0,22
Høy	79,7	63,5-95,9	83,2	0,45

Kolesterol

Prøvenr.	Gj.sn. for kontroll (pg/mL)	2 SD-område for kontroll	Gj.sn. for kolesterol (pg/mL)	Interferens ANOVA
Lav	19,9	18,5-21,3	19,4	0,64
Middels	31,7	27,7-35,7	29,7	0,15
Høy	79,7	63,5-95,9	75,2	0,40

Triglyserid

Prøvenr.	Gj.sn. for kontroll (pg/mL)	2 SD-område for kontroll	Gj.sn. for triglyserid (pg/mL)	Interferens ANOVA
Lav	14,7	12,9-16,5	15,1	0,88
Middels	30,4	22,4-38,4	33,4	0,25
Høy	92,6	69,5-116,9	95,4	0,68

Hemoglobin

Prøvenr.	Gj.sn. for kontroll (pg/mL)	2 SD-område for kontroll	Gj.sn. for hemoglobin (pg/mL)	Interferens ANOVA
Lav	21,5	17,5-25,5	20,8	0,53
Middels	38,6	35,4-41,8	40,0	0,43
Høy	112,7	101,4-124,0	120,6	0,17

Urea

Prøvenr.	Gj.sn. for kontroll (pg/mL)	2 SD-område for kontroll	Gj.sn. for urea (pg/mL)	Interferens ANOVA
Lav	25,1	20,9-29,3	26,6	0,39
Middels	36,2	23,8-48,6	35,9	0,96
Høy	120,1	97,4-142,8	118,6	0,82

SE DEN SISTE SIDEN FOR REFERANSER

ANALYSESKJEMA

1. Kalibratorer, kontroller og ukjente prøver rekonstrueres alle med 95 % etanol og sporstoff etter tørkettrinnet i kolonneprosedyren.
2. Pipetter reagens i henhold til følgende skjema:

Rør/reagenser	Totaltelling	NSB	Kal. 0-5	Kontroller og ukjente prøver
Rekonstituerte kalibratorer	-	-	75 µL	-
Rekonstituerte kontroller og ukjente prøver	-	-	-	75 µL
95 % etanol og sporstoff**	75 µL	75 µL	-	-
NSB-buffer	-	300 µL	-	-
1,25-(OH) ₂ -D-antiserum	-	-	300 µL	300 µL

MERK: Rørene for totaltelling og NSB dannes ved å tilsette 50 µL 95 % etanol med 125 µL sporstoff og pipettere 75 µL av denne blandingen til duplikate analyserør.

3. Bland godt og inkuber i 2 minutter (+/-15 minutter) ved 20-25°C.
4. Pipetter 500 µL GAR-utfellingsreagens til alle brønner, med unntak av totalreagensrørene.
5. Bland godt og inkuber i 20 minutter (+/-5 minutter) ved 20-25°C.
6. Sentrifuger med 1800 x g* i 20 minutter ved 20-25°C.
7. Dekanter supernatantene.
8. Tell hvert rør i en gammateller i minst 1 minutt.

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

ΚΙΤ 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D ¹²⁵I RIA

1. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ.

Το kit 1,25-Dihydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA είναι μια μέθοδος ραδιοανοσοπροσδιορισμού ανταγωνιστικής ισορροπίας που προορίζεται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 1,25- διυδροξυβιταμίνης D (1,25-(OH)₂-D) σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα EDTA με σκοπό την αξιολόγηση της ανεπάρκειας 1,25-(OH)₂-D που σχετίζεται με νεφρική νόσο. 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 κατά τη διαχείριση μεμονωμένων ασθενών σε έναν πληθυσμό ενηλίκων.

2. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Η βιταμίνη D προέρχεται από 2 πηγές: εξωγενείς (διατροφικές) και ενδογενείς (βιοσύνθεση, που ρυθμίζεται από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία). Οι εξωγενείς ή διατροφικές πηγές περιλαμβάνουν τροφές που περιέχουν φυσικά χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D₂ (π.χ. γάλα, βούτυρο, δημητριακά με συμπλήρωση βιταμίνης D₂), διατροφικά συμπληρώματα που διατίθενται χωρίς ιατρική συνταγή, και θεραπευτικά παρασκευάσματα βιταμινών D₂.¹ Η βιταμίνη D δεν είναι εγγενώς ενεργή όταν εισέρχεται στην κυκλοφορία του αίματος, μέσω είτε της διατροφικής είτε της φωτοχημικής οδού. Η βιολογική δραστηριότητα επιτυγχάνεται μετά από μια περίπλοκη σειρά βημάτων του μεταβολισμού.²

Είναι πλέον γνωστό ότι η ενεργοποίηση της βιταμίνης D μέσω του μεταβολισμού αποτελεί μια περίτεχνα ελεγχόμενη διαδικασία, που υπόκειται σε εκτενείς μεταβολές από μεταβλητές που συμπεριλαμβάνουν το ασβέστιο και το φώσφορο των τροφών, το βαθμό της ανεπάρκειας της βιταμίνης D, τις γενετικές ανεπάρκειες, τις συγκεντρώσεις της παραθυρεοειδούς ορμόνης, την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και την έκταση της νεφρικής λειτουργίας.³ Η βιοσύνθεση των διυδροξυλιωμένων μορφών της βιταμίνης D₃ ξεκινά με τη δράση του ηλιακού υπεριώδους φωτός επί της 7-αφυδροχοληστερόλης για το σχηματισμό της βιταμίνης D₃ στο δέρμα. Μόλις η βιταμίνη D₃ εισέλθει στην κυκλοφορία, απορροφάται γρήγορα από το ήπαρ όπου μεταβολίζεται σε 25-υδροξυβιταμίνη D₃ (25-OH-D₃). Το ήπαρ υδροξυλιώνει επίσης τη βιταμίνη D₂ των τροφών σε 25-υδροξυβιταμίνη D₂ (25-OH-D₂).^{2,4}

Μετά από τη ηπατική υδροξυλίωση, η 25-OH-D μεταφέρεται σε συνδυασμό με τη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D στους νεφρούς όπου λαμβάνει χώρα περαιτέρω υδροξυλίωση. Η προσθήκη ενός υδροξυλίου στη θέση 1 δίνει 1,25-διυδροξυβιταμίνη D (1,25-(OH)₂-D). Η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D είναι ο ισχυρότερος φυσικά προκύπτων μεταβολίτης της βιταμίνης D που έχει ανακαλυφθεί έως τώρα, και η παραγωγή της ρυθμίζεται αυστηρά μέσω των συγκεντρώσεων ασβεστίου, φώσφορου και παραθυρεοειδούς ορμόνης στον ορό. Σε περιόδους έλλειψης ασβεστίου, η 1,25-(OH)₂-D είναι ο σημαντικότερος μεταβολίτης της βιταμίνης D που παράγεται από τους νεφρούς.^{5,6}

Μετά από τη ηπατική υδροξυλίωση, η 25-OH-D μεταφέρεται σε συνδυασμό με τη δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D στους νεφρούς όπου λαμβάνει χώρα περαιτέρω υδροξυλίωση. Η προσθήκη ενός υδροξυλίου στη θέση 1 δίνει 1,25-διυδροξυβιταμίνη D (1,25-(OH)₂-D). Η 1,25-διυδροξυβιταμίνη D είναι ο ισχυρότερος φυσικά προκύπτων μεταβολίτης της βιταμίνης D που έχει ανακαλυφθεί έως τώρα, και η παραγωγή της ρυθμίζεται αυστηρά μέσω των συγκεντρώσεων ασβεστίου, φώσφορου και παραθυρεοειδούς ορμόνης στον ορό. Σε περιόδους έλλειψης ασβεστίου, η 1,25-(OH)₂-D είναι ο σημαντικότερος μεταβολίτης της βιταμίνης D που παράγεται από τους νεφρούς.^{5,6}

Αυτό οφείλεται στον ουσιαστικό ρόλο που παίζει στην αποδοτική, ενεργό απορρόφηση του ασβεστίου και του φώσφορου, όπως και στο φυσιολογικό μεταβολισμό τους. Επομένως, η μέτρηση της 1,25-(OH)₂-D καθίσταται ταχέως ένα αποτελεσματικό εργαλείο διερεύνησης των νόσων και παθήσεων που επηρεάζουν το φυσιολογικό μεταβολισμό του φωσφόρου και του ασβεστίου.^{7,8,9}

3. ΑΡΧΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

Ο προσδιορισμός 1,25-(OH)₂-D της DiaSorin αποτελείται από μια διαδικασία δύο βημάτων. Ο προσδιορισμός εμπεριέχει μια προκαταρκτική εκχύλιση και παρεπόμενη κάθαρση των μεταβολιτών της βιταμίνης D από τον ορό ή το πλάσμα EDTA με χρήση των φυσίγγων C₁₈OH.¹⁰ Μετά την εκχύλιση, το επεξεργασμένο δείγμα προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας μια διαδικασία ανταγωνιστικού ραδιοανοσοπροσδιορισμού (RIA). Η μέθοδος RIA βασίζεται σε ένα πολυκλωνικό αντίσωμα που είναι ειδικό και για την 1,25-(OH)₂ D₂ και για την 1,25-(OH)₂D₃. Το δείγμα, το αντίσωμα και ο ιχνηθέτης υπόκεινται σε επώαση για 2 ώρες 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 από τη φυγοκέντρηση και τη μετάγγιση, το δεσμευμένο κλάσμα που παραμένει στο σβώλο μετρείται σε μετρητή γάμμα. Οι τιμές υπολογίζονται απευθείας από μια καμπύλη βαθμονομητή γνωστών συγκεντρώσεων. Η τελική συγκέντρωση της 1,25-(OH)₂D στα δείγματα ορού και πλάσματος EDTA εκφράζεται σε pg/mL.

4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΜΕ ΤΟ ΚΙΤ

1,25-(OH) ₂ D ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ NSB	1 φιαλίδιο / 3 mL
1,25-(OH) ₂ D ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ 0	1 φιαλίδιο / 20 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΗΣ 1-5	5 φιαλίδια / 3 mL
1,25-(OH) ₂ D ΑΝΤΙΟΡΟΣ	1 φιάλη / 35 mL
¹²⁵ I 1,25-(OH) ₂ D ₃	1 φιαλίδιο / 10 mL
1,25-(OH) ₂ D ₃ ΔΙΑΛΥΜΑ ΠΡΟΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	1 φιάλη / 50 mL
1,25-(OH) ₂ D GAR ΣΥΜΠΛΟΚΟ ΚΑΘΙΖΗΣΗΣ	2 φιαλίδια / 35 mL
1,25-(OH) ₂ D ΟΡΟΣ ΥΛΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ	2 φιαλίδια / 3 mL
95% ΑΙΘΑΝΟΛΗ	1 φιαλίδιο / 7 mL
Αριθμός Εξετάσεων	100

ΦΥΛΑΞΗ: Με την παραλαβή, το κιτ πρέπει να φυλάγεται 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 σε περίπτωση που παρέλθει η ημερομηνία λήξης στην ετικέτα. Η ημερομηνία λήξης του κιτ αναγράφεται στην εξωτερική ετικέτα και αντιστοιχεί στην ημερομηνία λήξης του ιχνηθέτη.

Κατά την ανασύσταση του περιεχομένου των φιαλιδίων, αναμίξτε απαλά για να αποφευχθεί ο σχηματισμός αφρού. Φυλάξτε όλα τα ανασυσταθέντα αντιδραστήρια στους -15°C ή χαμηλότερα αμέσως μετά τη χρήση τους. Δεν ενδείκνυται η ανάμιξη αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

4.1 1,25-(OH)₂D Ρυθμιστικό διάλυμα NSB: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση

Ρυθμιστικό διάλυμα ζελατίνης φωσφορικού καλίου που περιέχει ProClin® 300 (< 0,2%).

4.2 1,25-(OH)₂D Βαθμονομητής 0: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει πρωτεΐνες βόειου ορού και ProClin 300 (< 0,2%).

4.3 1,25-(OH)₂D₃ Βαθμονομητές (1-5): Λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο

Πέντε λυοφιλοποιημένοι (1,25-(OH)₂D₃) βαθμονομητές σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 5 - 200 pg/mL και περιέχουν ανθρώπινο ορό και ProClin 300 (<0,2%). Ανασυστήστε κάθε βαθμονομητή με 3,0 mL μηδενικού βαθμονομητή. Οι ακριβείς συγκεντρώσεις αναφέρονται στις ετικέτες των φιαλιδίων. Οι βαθμονομητές των κιτ βαθμονομούνται με χρήση ποσοτικού προσδιορισμού υπερωδών. Ο χειρισμός των βαθμονομητών μπορεί να είναι ίδιος με αυτόν των δειγμάτων ασθενών όταν χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια και η λειτουργική διαδικασία της παρούσας διαγνωστικής δοκιμής in vitro, όπως συνιστάται.

4.4 1,25-(OH)₂D Αντιορός: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση

Αντι-1,25-(OH)₂D ορού κουνελιού αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-ζελατίνης που περιέχει ProClin 300 (<0,2%).

4.5 ¹²⁵I 1,25-(OH)₂D₃ Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση

Ραδιοϊωδιωμένο ανάλογο 1,25-(OH)₂D₃ αραιωμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικής αιθυλενογλυκόλης.

4.6 1,25-(OH)₂D₃ Διάλυμα προεπεξεργασίας: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση

Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού καλίου.

4.7 1,25-(OH)₂D Υλικά ελέγχου: Επίπεδο 1 (Φυσιολογικό), Επίπεδο 2 (Αυξημένο):

Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση Μίγμα επεξεργασμένου ανθρώπινου ορού, που περιέχει ProClin 300 (<0,2%), εμπλουτισμένο με τις κατάλληλες ποσότητες 1,25-(OH)₂D για τη λήψη συγκεντρώσεων υλικών ελέγχου εντός προσδιορισμένων περιοχών τιμών. Το Υλικό ελέγχου 1 βρίσκεται εντός του φυσιολογικού εύρους και το Υλικό ελέγχου 2 βρίσκεται εντός αυξημένων περιοχών τιμών. Το εύρος των συγκεντρώσεων κάθε ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και δείχνει τα όρια που έχουν καθοριστεί από την DiaSorin για τιμές ελέγχων που μπορούν να επιτευχθούν σε αξιόπιστους κύκλους εξετάσεων.

4.8 Σύμπλοκο καθίζησης αίγας αντι-κουνελιού (GAR): Λυοφιλοποιημένο αντιδραστήριο Φυσιολογικός ορός κουνελιού, που έχει υποστεί εκ των προτέρων καθίζηση με ορό αίγας αντι-κουνελιού και πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), αραιώνεται σε ρυθμιστικό διάλυμα BSA-βορικών με προσθήκη νατραζιδίου 0,1% και άλλων συντηρητικών (λυοφιλιωμένα). Ανασυστήστε το φιαλίδιο με 35 mL απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού. Αναμίξτε καλά έως ότου το εναιώρημα εμφανιστεί ομοιογενές και έπειτα αφήστε το ακίνητο για τουλάχιστον 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου ανακινώντας το περιστασιακά.

4.9 95% Αιθανόλη: Αντιδραστήριο έτοιμο για χρήση

95% αιθανόλη και 5% νερό.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Απαιτούνται επίσης φύσιγγες C₁₈OH για τη διαδικασία αυτή. Οι φύσιγγες αυτές πρέπει να παραγγελθούν ξεχωριστά με Αρ. κατ. DiaSorin 65101E.

5. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

ΓΙΑ IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ.

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, ή 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 δότης ορού/πλάσματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή αυτού του προϊόντος έχει εξεταστεί 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. Παρότι 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 εξέταση.

Επειδή καμία γνωστή μέθοδος δοκιμής δεν μπορεί να προσφέρει πλήρη 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", 4^η 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, εκπλύνετε με άφθονη ποσότητα νερού για να εμποδίσετε τη συσσώρευση αζιδίων. Για περισσότερες πληροφορίες, ανατρέξτε στην ενότητα "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts" (Απορρύπανση των Εργαστηριακών Εγκαταστάσεων για Απομάκρυνση Αλάτων Αζιδίων), στο Εγχειρίδιο Οδηγό-Διαχείριση Ασφάλειας (Manual Guide-Safety Management) Αρ. CDC-22 που εκδίδεται από τα Κέντρα για τον Έλεγχο των Ασθενειών και την Πρόληψη (Centers for Disease Control and Prevention), Ατλάντα, GA, Η.Π.Α. 1976.

Φράσεις κινδύνου για επικίνδυνες ουσίες των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)

R20/21/22 - Βλαβερό κατά την εισπνοή, σε επαφή με το δέρμα και σε περίπτωση κατάποσης.

R32 - Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται πολύ τοξικά αέρια.

S28 - Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλύνετε αμέσως με άφθονο νερό.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΕΡΙΕΧΟΥΝ ΑΙΘΑΝΟΛΗ

Φράσεις κινδύνου για επικίνδυνες ουσίες των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων (Οδηγία Επιτροπής 1999/45/ΕΕ)

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 5,5 μCi (204 kBq) ιώδιο-125. 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) ή της πολιτείας με την 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 για 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 γυάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών γυάλινων 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 έχει γνωστοποιηθεί στην 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 kit.

6. ΕΝΔΕΙΞΕΙΣ ΠΙΘΑΝΗΣ ΦΘΟΡΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ KIT

- 6.1 Παρουσία ασυνήθιστων στερεών σωματιδίων σε οποιοδήποτε αντιδραστήριο.
- 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 ΤΟΥ ΟΡΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Το kit 1,25-διϋδροξυβιταμίνης D χρειάζεται 500 μ L είτε ορού είτε πλάσματος EDTA για να διεξαχθεί η εκχύλιση του προσδιορισμού. Όγκος 1,5 mL επιτρέπει την επανάληψη της ανάλυσης και παρέχει επίσης επαρκή όγκο για διανομή με πιπέτα.

Με το kit αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ανθρώπινος ορός ή πλάσμα. Με τον προσδιορισμό αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιπηκτικά EDTA. Συνιστάται δείγμα από άτομα που δεν έχουν φάει, αλλά δεν απαιτείται. Η δειγματοληψία θα πρέπει να γίνεται άσηπτα με φλεβοπαρακέντηση σε κενό υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα 5 ή 10 mL.

Για τον ορό, 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. 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 -15°C ή χαμηλότερα. Τα δείγματα δε θα πρέπει να καταψύχονται και να αποψύχονται επανειλημμένως. Ωστόσο, μια μελέτη που έγινε από την DiaSorin δεν έδειξε σημαντική αλλαγή στις τιμές μετά από 3 κύκλους ψύξης - απόψυξης των δειγμάτων. Δείγματα αποθηκεύτηκαν στη DiaSorin επί 6 μήνες στους -15°C ή χαμηλότερα χωρίς σημαντική αλλαγή στα αποτελέσματα.

8. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ, ΟΜΩΣ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

- 8.1 Οι φύσιγγες C₁₈OH (24 φύσιγγες) παραγγέλλονται ξεχωριστά με Αρ. κατ. DiaSorin 65101E.
- 8.2 Αναλώσιμα σωληνάρια από βοριοπυριτικό γυαλί, 12 x 75 mm και 13 x 100 mm.
- 8.3 Βάσεις δοκιμαστικών σωληνίων.

* g = (1118 x 10⁻⁸) (ακτίνα σε εκατοστά) (rpm)²

- 8.4 Parafilm ή ισοδύναμο για την κάλυψη των δοκιμαστικών σωλήνων.
- 8.5 Αφρώδης βάση για μετάγγιση ή αντίστοιχο υλικό.
- 8.6 Φυγοκεντρητής με χωρητικότητα σωλήνων 12 x 75 mm και επίτευξη 1800 x g*.
- 8.7 Μετρητής γάμμα με δυνατότητα μέτρησης ¹²⁵I.
- 8.8 Όργανο περιδίνησης (vortex).
- 8.9 Συσκευές πιπέτας:
- Μικροπιπέτες βαθμονομημένες να χορηγούν 75 μL, 300 μL και 500 μL.
 - Διανομείς επαναλαμβανόμενης χορήγησης, ικανοί να διανέμουν 50 μL, 300 μL, και 500 μL.
 - Ογκομετρικές πιπέτες για την ανασύσταση των βαθμονομητών, 3,0 mL.
- 8.10 Απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό.
- 8.11 Οργανικοί διαλύτες:
Θα χρειαστούν οι παρακάτω διαλύτες για την παρασκευή και εκχύλιση των δειγμάτων.
- Χρησιμοποιείτε μόνο διαλύτες βαθμού HPLC.**
Μην εκθέτετε οποιονδήποτε από τους οργανικούς διαλύτες σε υάλινα δοχεία πλυμένα με οξέα ή τυχόν άλλες όξινες συνθήκες.
- Ακετονιτρίλιο.
 - Μεθανόλη.
 - Εξάνιο. (ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ: το ποσοστό του n-εξανίου πρέπει να είναι μεγαλύτερο από 95%)
 - Χλωριούχο μεθυλένιο (**δεν** πρέπει να περιέχει αλκοόλη ως συντηρητικό).
 - Ισοπροπανόλη (2-προπανόλη).
- 8.12 Συνιστώμενη συσκευή για τις φύσιγγες C₁₈OH:
- Σταθμός επεξεργασίας δειγμάτων Vac Elut. Επεξεργάζεται 24 στήλες ανά κύκλο. Διατίθεται από την Analytichem International ή την DiaSorin. Για παραγγελία από την DiaSorin, χρησιμοποιήστε Αρ. κατ. DiaSorin 11610.
- 8.13 Υλικά που χρειάζονται για ξήρανση των δειγμάτων:
- Αέριο άζωτο.
 - Πολλαπλό ξήρανσης με τμήμα θέρμανσης 37°C (±2°C) ή υδατόλουτρο: τα N-EVAP ή MULTI-VAP διατίθενται μέσω της Organomation Associates (Βερολίνο, MA) ή τα Reacti-Var II και Reacti-Therm III διατίθενται μέσω της Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

* g = (1118 x 10⁻⁸) (ακτίνα σε εκατοστά) (rpm)²

9. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΗΛΗΣ

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Τα μίγματα οργανικών διαλυτών πρέπει να παρασκευάζονται πριν την έναρξη της Προκαταρκτικής διαδικασίας εκχύλισης.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

Παρασκευάστε τα μίγματα διαλυτών όπως περιγράφεται στον ΠΙΝΑΚΑ I. Η DiaSorin συνιστά παρασκευάσμα όγκου 500 mL. Μπορούν να παρασκευάζονται μεγαλύτεροι ή μικρότεροι όγκοι υπό τον όρο ότι οι αναλογίες παραμένουν σταθερές. Ωστόσο, οι όγκοι πρέπει να είναι αρκετά μεγάλοι ώστε να ελαχιστοποιείται το σφάλμα μέτρησης. Μετράτε κάθε διαλύτη ξεχωριστά για καλύτερα αποτελέσματα.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

Χρησιμοποιήστε απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό όπου εφαρμόζεται.

ΠΙΝΑΚΑΣ I
Παρασκευή διαλυτών

Μίγμα διαλυτών	Υλικά	1 L	500 mL
70:30	μεθανόλη	700 mL	350 mL
	νερό	300 mL	150 mL
90:10	εξάνιο	900 mL	450 mL
	χλωριούχο μεθυλένιο	100 mL	50 mL
99:1	εξάνιο	990 mL	495 mL
	IPA	10 mL	5 mL
92:8	εξάνιο	920 mL	460 mL
	IPA	80 mL	40 mL

10. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

- 10.1** Ανασυστήστε κάθε λυοφιλωμένο βαθμονομητή με 3,0 mL μηδενικού βαθμονομητή. Αναμίξτε καλά τους βαθμονομητές και αφήστε τους ακίνητους επί 15-20 λεπτά ώστε να διασφαλιστεί πλήρης ανασύσταση. Αποψύξτε εντελώς τυχόν κατεψυγμένα αντιδραστήρια. Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Η θερμοκρασία των αντιδραστηρίων δεν θα πρέπει να υπερβεί τους 25°C. Αναμίξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια πριν τη χρήση.
- 10.2** Διανείμετε με πιπέτα 500 µL κάθε βαθμονομητή (0-5), υλικό ελέγχου και δείγμα ασθενή σε σημασμένους δοκιμαστικούς σωλήνες από βοριοπιρρικό ύαλο 12 x 75 mm.
- 10.3** Προσθέστε 500 µL ακετονιτρίλιο σε κάθε δείγμα. Περιδινήστε με διακοπές, τουλάχιστον 3 φορές, σε χρονική διάρκεια 10 λεπτών.
- 10.4** Φυγοκεντρήστε τους σωλήνες στις 760 x g* για 10 λεπτά στους 20 έως 25°C.
- 10.5** Μεταγγίστε τα υπερκείμενα των δειγμάτων σε σημασμένους δοκιμαστικούς σωλήνες 12 x 75 mm ή 13 x 100 mm (αν προτιμάτε). Απορρίψτε τους σβώλους.

* g = (1118 x 10⁻⁸) (ακτίνα σε εκατοστά) (rpm)²

- 10.6** Προσθέστε 500 µL Διαλύματος προεπεξεργασίας σε κάθε σωλήνα και περιδινήστε.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το κιτ αυτό είναι σχεδιασμένο να χωράει έως 48 εκχυλίσεις μεταξύ των οποίων βαθμονομητές και υλικά ελέγχου συν 40 άγνωστα δείγματα. Αυτό σημαίνει ότι μπορεί να γίνει αμέσως εκχύλιση 24 δειγμάτων στη συσκευή VacElut και κατόπιν μπορεί να γίνει εκχύλιση του υπολειπόμενου συνόλου των 24 δειγμάτων.

Οι εκχυλίσεις στήλης πρέπει να γίνονται όσο το δυνατόν συντομότερα μετά την προσθήκη διαλύματος προεπεξεργασίας. Ωστόσο, μόλις γίνει εκχύλιση της στήλης, τα δείγματα μπορούν να αποθηκευτούν επί 96 ώρες στους -15°C ή χαμηλότερα.

- 10.7** Τα δείγματα είναι πλέον έτοιμα προς εφαρμογή στις φύσιγγες C₁₈OH.

11. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΤΗΛΗΣ

- 11.1** Για επεξήγηση της συσκευής VAC ELUT, ανατρέξτε στον Οδηγό χρήστη VAC ELUT. Συναρμολογήστε το σταθμό σύμφωνα με τις οδηγίες.
- 11.2** Σημάνετε με ετικέτα ένα σωλήνα από βοριοπυριτικό ύαλο 13 x 100 mm για κάθε βαθμονομητή (0-5), υλικό ελέγχου και άγνωστο δείγμα. Τοποθετήστε τους σωλήνες αυτούς στη συσκευή VAC ELUT. Βεβαιωθείτε ότι το καπάκι του VAC ELUT βρίσκεται στη θέση "ΑΠΟΒΛΗΤΑ" και ότι οι σωλήνες είναι τοποθετημένοι έτσι ώστε να συλλέγουν τα επιθυμητά προϊόντα έκλουσης. Τοποθετήστε τις φύσιγγες C₁₈OH στο κάλυμμα του VAC ELUT.
- 11.3** Προσθέστε τα μίγματα διαλυτών στην καθορισμένη φύσιγγα όπως περιγράφεται στον ΠΙΝΑΚΑ II.

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ:

Χρήση κενού:

Ενεργοποιήστε το κενό μετά από την προσθήκη κάθε διαλύτη και αφήστε το μίγμα του διαλύτη να διέλθει **εντελώς** μέσω της φύσιγγας πριν προχωρήσετε στον επόμενο διαλύτη. Ενεργοποιήστε και απενεργοποιήστε το κενό κατά τα συνιστώμενα βήματα στον ΠΙΝΑΚΑ II (αν προτιμάτε, το κενό μπορεί να απενεργοποιείται μεταξύ κάθε προσθήκης διαλύτη). Το κενό πρέπει να ρυθμιστεί στις 10 ίντσες (254 mm Hg) ή χαμηλότερα. Εκλούστε κάθε μίγμα διαλύτη μέσω της εξόδου "ΑΠΟΒΛΗΤΑ" και μέσα στα κατάλληλα δοχεία αποβλήτων μέχρι το βήμα τελικής συλλογής.

Εφαρμογή δείγματος:

Τα δείγματα μπορούν είτε να μεταγγιστούν απευθείας στη φύσιγγα είτε να εφαρμοστούν με πιπέτα.

Μη αφήσετε τις φύσιγγες να στεγνώσουν στον αέρα για περισσότερα από 5 λεπτά μεταξύ εφαρμογών.

Προεπεξεργασία φυσιγγών C₁₈OH:

Οι φύσιγγες C₁₈OH πρέπει να πλένονται με 5 mL σε αναλογία 90:10 (εξάνιο: χλωριούχο μεθυλένιο), 5 mL IPA και 5 mL μεθανόλη πριν από την πρώτη χρήση. Το μίγμα του διαλύτη 90:10 (εξάνιο: χλωριούχο μεθυλένιο) μπορεί να παρασκευαστεί με την μέτρηση 900 mL εξάνιου και 100 mL χλωριούχου μεθυλενίου. Τοποθετήστε τις καινούριες, αχρησιμοποίητες φύσιγγες στη συσκευή VAC ELUT, ρυθμίστε στη θέση "ΑΠΟΒΛΗΤΑ", και προσθέστε 5 mL 90:10 (εξάνιο: χλωριούχο μεθυλένιο) και στη συνέχεια 5 mL IPA σε κάθε στήλη και κατόπιν 5 mL μεθανόλη. Αφήστε κάθε μίγμα διαλύτη να διέλθει εντελώς από τις φύσιγγες πριν προχωρήσετε στο επόμενο μίγμα. Μετά από την αρχική αυτή παρασκευή, δεν θα είναι απαραίτητο να επαναλάβετε το βήμα αυτό αφού η φύσιγγα ανανεώνεται κατά τη διαδικασία εξαγωγής.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Αν πρόκειται να εκχυλιστούν πρόσθετα δείγματα (άνω των 24), ανανεώστε τις φύσιγγες με χρήση της ίδιας μεθόδου που αναφέρεται στον ΠΙΝΑΚΑ II. Οι φύσιγγες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και πάλι έως 30 φορές.

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Το υλικό της φύσιγγας C₁₈OH συγκρατείται στη θέση του με χρήση πορώδους κεραμικής ίνας. Απορρίψτε φύσιγγες με μετατοπισμένες ή ελλειπείς κεραμικές ίνες διότι ενδέχεται να απωλεσθεί το υλικό C₁₈OH.

ΠΙΝΑΚΑΣ II

Περιγραφή και ανάλυση εκχύλισης	Βήματα εκχύλισης	Χειρισμός εκλούοντος μέσου
Η προετοιμασία/ανανέωση στήλης αφαιρεί: Παρεμβαλλόμενες ουσίες από προηγούμενη χρήση (βήμα 1)	1. Προσθέστε 1 mL μεθανόλης, ενεργοποιήστε το κενό. 2. Απενεργοποιήστε το κενό.	Απορρίψτε “ΑΠΟΒΛΗΤΑ”
Εφαρμογή δείγματος	3. Εφαρμόστε όλα τα δείγματα, ενεργοποιήστε το κενό, από την Προκαταρκτική διαδικασία εκχύλισης (βήμα 10).	Απορρίψτε “ΑΠΟΒΛΗΤΑ”
Κάθαρση/Αφαίρεση μεταβολιτών βιταμίνης D Αφαιρεί: Παρεμβαλλόμενα πολικά λιπίδια, άλατα, και χρωστικές (βήμα 4). 25(OH)D (βήμα 5) Υπολειπόμενη 25(OH)D και 24,25(OH) ₂ D/25,26(OH) ₂ D (βήμα 6)	4. Προσθέστε 5 mL 70:30 μεθανόλη/νερό (απεσταγμένο ή απιονισμένο). 5. Προσθέστε 5 mL 90:10 εξάνιο/χλωριούχο μεθυλένιο. 6. Προσθέστε 5 mL 99:1 εξάνιο/ισοπροπανόλη. 7. Απενεργοποιήστε το κενό.	Απορρίψτε “ΑΠΟΒΛΗΤΑ”
Συλλογή 1,25-(OH)₂D Έκλουση κεκαθαρμένης 1,25-(OH) ₂ D (βήμα 9)	ΣΗΜΑΝΤΙΚΟ! 8. Αλλάξτε τη ρύθμιση του Vac Elut σε “Συλλογή.” 9. Προσθέστε 3 mL 92:8 εξάνιο/ισοπροπανόλη, ενεργοποιήστε το κενό. 10. Απενεργοποιήστε το κενό.	“ΣΥΛΛΟΓΗ”

12. ΞΗΡΑΝΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΣΥΣΤΑΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΕΚΛΟΥΣΗΣ

- 12.1 Τοποθετήστε τους σωλήνες των δειγμάτων που περιέχουν τα προϊόντα έκλουσης σε τμήμα θέρμανσης ή υδατόλουτρο στους 37°C (±2°C) για ξήρανση.
- 12.2 Στεγνώστε τα προϊόντα έκλουσης κάτω από απορροφητήρα με χρήση 2-4 psi αέριου αζώτου (χρόνος ξήρανσης 20-30 λεπτά).
- 12.3 Αφαιρέστε αμέσως τους σωλήνες αφού στεγνώσει το προϊόν έκλουσης.
- 12.4 Ανασυστήστε καθένα από τα στεγνά εκχυλίσματα με 50 μL αιθανόλης 95%. Περιδινήστε μαλακά σε χαμηλή έως μέτρια ταχύτητα. Προσθέστε 125 μL ιχνηθέτη στους ίδιους σωλήνες που περιέχουν τα 50 μL της αιθανόλης 95%, περιδινήστε και πάλι μαλακά σε χαμηλή έως μέτρια ταχύτητα. **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Τα βήματα περιδίνησης είναι πολύ σημαντικά για να διασφαλιστεί ότι το δείγμα έχει ανασυσταθεί σωστά και για να υπάρξει υψηλή ακρίβεια. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Διατηρήστε την περιδίνηση στο χαμηλότερο τμήμα του σωλήνα ώστε να εμποδιστεί η απώλεια του όγκου του δείγματος διασφαλίζοντας έτσι επαρκή όγκο διανομής με πιπέτα για τον προσδιορισμό. Σημάνετε με επικέτα έναν πρόσθετο σωλήνα για τη Συνολική μέτρηση και ένα σωλήνα για NSB. Προσθέστε 50 μL αιθανόλης 95% και 125 μL ιχνηθέτη και στους δύο σωλήνες. Αυτοί θα χρησιμοποιηθούν για δημιουργία εφεδρικών σωλήνων TC (Συνολική μέτρηση) και NSB για τη ρύθμιση του προσδιορισμού.
- 12.5 Εκτελέστε τον προσδιορισμό αμέσως μετά από την ανασύσταση των δειγμάτων. Για καλύτερα αποτελέσματα κατά την εκτέλεση μεγαλύτερων προσδιορισμών, ανασυστήστε 12 - 15 δείγματα κάθε φορά και εν συνεχεία διανεμίστε με πιπέτα στον προσδιορισμό πριν ανασυστήσετε τα επόμενα 12 - 15 δείγματα.

13. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

- 13.1 Τακτοποιήστε τους σημασμένους, αναλώσιμους σωλήνες από βοριοπιριτικό γυαλί 12 x 75 mm εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή (0-5), υλικό ελέγχου και δείγμα σύμφωνα με το σχέδιο του προσδιορισμού. Προσθέστε προσεκτικά 75 μL του ανασυσταθέντος βαθμονομητή, υλικού ελέγχου και των εκχυλισμάτων δείγματος στους διπλούς σωλήνες προσδιορισμού. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Το βήμα αυτό πρέπει να εκτελείται προσεκτικά διότι υπάρχει περίσσεια μόνο 25 μL σε κάθε σωλήνα.
- 13.2 Ανατρέξτε στο “Ξήρανση και ανασύσταση προϊόντων έκλουσης”, αριθμός βήματος 4. Προσθέστε 75 μL από το σωλήνα TC (Συνολική μέτρηση) στους διπλούς σωλήνες προσδιορισμού. Επαναλάβετε το βήμα αυτό και για τους διπλούς σωλήνες προσδιορισμού NSB.
- 13.3 Προσθέστε 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος NSB στους σωλήνες NSB.
- 13.4 Προσθέστε 300 μL πρωτοταγούς αντισώματος σε όλους τους σωλήνες εκτός από τους σωλήνες Συνολικής μέτρησης και NSB.
- 13.5 Αναμίξτε καλά. Επώαστε επί 2 ώρες (±15 λεπτά) στους 20-25°C. **ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Εκτελέστε ανασύσταση του Σύμπλοκου καθίζησης GAR με 35 mL απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό. Αναμίξτε εντελώς έως ότου το εναιώρημα να εμφανιστεί ομοιογενές και έπειτα αφήστε το ακίνητο για τουλάχιστον 30 λεπτά πριν από τη χρήση σε θερμοκρασία δωματίου ανακινώντας το περιστασιακά πριν και κατά τη διάρκεια της χρήσης.
- 13.6 Προσθέστε 500 μL καλά αναμεμιγμένου Σύμπλοκου καθίζησης GAR σε όλους τους σωλήνες εκτός από τους σωλήνες Συνολικής μέτρησης. Επώαστε επί 20 λεπτά (±5 λεπτά) στους 20-25°C.

- 13.7 Φυγοκεντρήστε όλους τους σωλήνες για 20 λεπτά στους 20 έως 25°C στα 1800 x g*, εκτός από τους σωλήνες Συνολικής μέτρησης.
- 13.8 Μεταγγίστε τα υπερκείμενα, εκτός από αυτά των σωλήνων Συνολικής μέτρησης, χρησιμοποιώντας μια αφρώδη βάση δοκιμαστικών σωλήνων, ή αντίστοιχο, 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.
- 13.9 Μετρήστε τη ραδιενέργεια με μέτρηση όλων των σωλήνων επί 1 λεπτό σε μετρητή γάμμα. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες θα πρέπει να μετρηθούν για 1 λεπτό ή περισσότερο (βλ. παράγραφο Περιορισμοί της διαδικασίας).

14. ΔΙΑΔΙΚΑΣΤΙΚΑ ΣΧΟΛΙΑ

- 14.1 Προσθέστε κάθε κλάσμα αντιδραστηρίου στο χαμηλότερο τρίτο του δοκιμαστικού σωλήνα προκειμένου να εξασφαλιστεί η πλήρης ανάμιξη των αντιδραστηρίων.
- 14.2 Οι σωστές αναλογίες των διαλυτών είναι κρίσιμης σημασίας για καλή ανάκτηση. Παρασκευάστε διαλύματα σε όγκους αρκετά μεγάλους ώστε να ελαχιστοποιείται το σφάλμα μέτρησης.
- 14.3 Αν οποιοδήποτε δείγμα είναι μεγαλύτερο από το βαθμονομητή με την υψηλότερη τιμή, πρέπει να αραιωθεί με το μηδενικό βαθμονομητή του kit και να γίνει ξανά ο προσδιορισμός του πριν από την εκχύλιση. Τα αποτελέσματα πρέπει να πολλαπλασιαστούν με τον κατάλληλο παράγοντα αραιώσης. Για παράδειγμα, αναμίξτε 500 μL του δείγματος με 500 μL του μηδενικού βαθμονομητή, και κατόπιν εκτελέστε τον προσδιορισμό 500 μL του δείγματος αυτού σύμφωνα με το ένθετο του προϊόντος.
- 14.4 Δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση προσδιορισμού στο μέσο χρόνο που χρειάζεται για να εκτελεστεί προσδιορισμός 100 σωλήνων.
- 14.5 Για να παρακολουθεί πλήρως ένα εργαστήριο τη συνεπή απόδοση ενός ραδιοανοσοπροσδιορισμού (RIA), υπάρχουν πρόσθετοι παράγοντες που ενδέχεται να ελέγχονται. Η DiaSorin προτείνει τακτικό έλεγχο των παρακάτω παραμέτρων για να εξασφαλιστεί η συνεπής απόδοση του kit.
 - α. **Συνολικές μετρήσεις**
 - β. **Μέγιστη δέσμευση**
Μέση τιμή μετρήσεων ανά λεπτό (CPM) των δοκιμαστικών σωλήνων βαθμονομητή 0 /Μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών μετρήσεων.
 - γ. **Μη ειδική δέσμευση**
Μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων NSB/Μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων συνολικών μετρήσεων.
 - δ. **Κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης**
Μπορεί να γίνει παρακολούθηση της καταστολής 50%.

* g = (1118 x 10⁻⁸) (ακτίνα σε εκατοστά) (rpm)²

15. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Κάθε εργαστήριο πρέπει να περιλαμβάνει τουλάχιστον δυο υλικά ελέγχου (ένα υλικό ελέγχου φυσιολογικού εύρους και ένα αυξημένου εύρους) σε κάθε προσδιορισμό ώστε να παρακολουθείται η απόδοση του κιτ. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν εμπορικά διαθέσιμοι υλικά ελέγχου ή 2 υλικά ελέγχου αναφοράς που παρέχονται με το κιτ.

Ο χειρισμός των υλικών ελέγχου θα πρέπει να γίνεται ως εάν ήταν άγνωστα δείγματα και ο προσδιορισμός τους θα πρέπει να γίνεται δύο φορές. Θα πρέπει να τηρούνται πίνακες ποιοτικού ελέγχου από το εργαστήριο για να παρακολουθείται η απόδοση των υλικών ελέγχου. 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 των υλικών ελέγχου θα πρέπει να ικανοποιούν τα κριτήρια του εργαστηρίου για αποδεκτικότητα πριν από την αναφορά των αποτελεσμάτων της δοκιμής των ασθενών.^{12,13,14}

16. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον υπολογισμό αποτελεσμάτων ραδιοανοσοπροσδιορισμών. Κάθε μία βασίζεται στη λήψη καμπύλης βαθμονόμησης με το σχεδιασμό του βαθμού δέσμευσης συναρτήσεως των δηλωμένων συγκεντρώσεων βαθμονομητών. Το γράφημα αυτό μπορεί να σχεδιαστεί σε γραμμική ή λογαριθμική κλίμακα. Κάθε μία από αυτές τις μεθόδους δίδει ουσιαστικά τις ίδιες τιμές για υλικά ελέγχου 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 της DiaSorin είναι %B/B₀ έναντι της μεθόδου υπολογισμού λογαριθμημένης συγκέντρωσης με βάση προσαρμογή καμπύλης smooth spline.

16.1 Υπολογισμός ποσοστού B/B₀

- α. Υπολογίστε τον μέσο CPM για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου και άγνωστο δείγμα.
- β. Αφαιρέστε τη μέση τιμή CPM των δοκιμαστικών σωλήνων NSB από όλες τις μετρήσεις.
- γ. Διαιρέστε το μέσο διορθωμένο CPM για κάθε βαθμονομητή, υλικό ελέγχου ή άγνωστο δείγμα με το μέσο διορθωμένο CPM του βαθμονομητή 0 και πολλαπλασιάστε με 100.

$$\frac{\text{μέση τιμή CPM (Βαθμονομητής ή Άγνωστο δείγμα)} - \text{μέση τιμή CPM (NSB)}}{\text{μέση τιμή CPM (Βαθμονομητής 0)} - \text{μέση τιμή CPM (NSB)}} \times 100 = B/B_0 (\%)$$

16.2 Χρήση Σχεδίου καμπύλης βαθμονομητή

- α. Με χρήση χαρτιού log-logit ή ημιλογαριθμικού γραφήματος 2 κύκλων, σχεδιάστε το ποσοστιαίο B/B₀ (%) για τους βαθμονομητές 1,25 (OH)2D στην τεταγμένη (άξονας ψ) έναντι της συγκέντρωσης βαθμονομητή στην τετμημένη (άξονας χ).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Για την ανάλυση των δεδομένων, μπορείτε επίσης να χρησιμοποιήσετε προγράμματα αυτοματοποιημένης αναγωγής δεδομένων. Η DiaSorin χρησιμοποιεί Multi-Calc (Pharmacia) με πρόγραμμα προσαρμογής LIN-LOG smooth-SPLINE. Άλλες μέθοδοι αναγωγής δεδομένων πρέπει να εγκριθούν πριν ενσωματωθούν για κανονική χρήση.

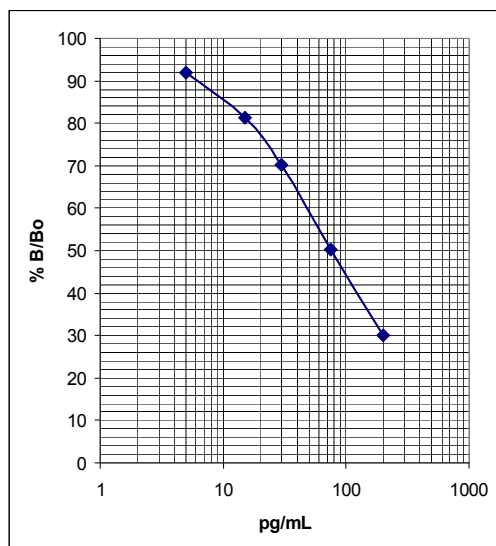
- β. Σχεδιάστε την καμπύλη που προσαρμόζεται καλύτερα στα σημεία.
- γ. Παρεμβάλετε τα επίπεδα της 1,25-(OH)₂D στα δείγματα από την καταγραφή των βαθμονομητών.
- δ. Αν αραιωθεί ένα άγνωστο δείγμα, διορθώστε για να συμπεριλάβετε τον κατάλληλο συντελεστή αραιώσης.
- ε. Το αναφερόμενο εύρος του προσδιορισμού είναι 5,0 pg/mL έως 200 pg/mL. Οποιαδήποτε τιμή που είναι μικρότερη από το χαμηλότερο βαθμονομητή, 5,0 pg/mL, είναι μια παρεμβαλλόμενη τιμή και μπορεί να αναφερθεί ως "μικρότερο του 5 pg/mL".
- στ. Υπολογίστε τη μέγιστη δέσμευση διαιρώντας το CPM του βαθμονομητή 0 με τη μέση τιμή συνολικών μετρήσεων που λήφθηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών μετρήσεων.

Στον ΠΙΝΑΚΑ IV και στο ΣΧΗΜΑ 1 παρουσιάζονται τυπικά δεδομένα δείγματος για την ανάλυση 1,25-(OH)₂D RIA. Οι πληροφορίες αυτές δίδονται μόνο για αναφορά και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό καμίας τιμής.

ΠΙΝΑΚΑΣ IV
Δεδομένα δείγματος DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA

Σωλήνας	Διπλό CPM	Μέσος όρος CPM	Διορθωμένο CPM	Ποσοστιαίο Δεσμευμένο (B/T)	Ποσοστιαίο (B/B0)	Συγκέντρωση (pg/mL)
Συνολική μέτρηση	40.792	40.685				
	40.578					
NSB	1.438	1.439		3,5		
	1.439					
Βαθμονομητής 0	18.006	18.063	16.624	44,4	100,0	
	18.119					
Βαθμονομητές (pg/mL)						
1 (5,0)	16.710	16.740	15.302		92,0	
	16.770					
2 (15,0)	14.941	14.929	13.490		81,2	
	14.916					
3 (30,0)	13.087	13.106	11.667		70,2	
	13.124					
4 (75,0)	9.820	9.793	8.354		50,2	
	9.765					
5 (200)	6.412	6.438	5.000		30,0	
	6.464					
Υλικά ελέγχου						
Επίπεδο 1:	13.275	13.403	11.964		72,0	27,3
φυσιολογικό εύρος	13.530					
Επίπεδο 2:	8.206	8.165	6.727		40,5	119
υψηλό εύρος:	8.124					

Καμπύλη βαθμονόμησης δείγματος DiaSorin 1,25-(OH)₂D RIA



ΣΧΗΜΑ 1

ΑΝΑΓΩΓΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Το εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου της DiaSorin χρησιμοποιεί προσαρμογή καμπύλης smooth spline.

17. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

- 17.1 Οι χρόνοι μέτρησης θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλοι για να εμποδίζεται το σφάλμα εξαπτίας ανεπάρκειας του μετρητή (για παράδειγμα, η συσσώρευση 2.000 CPM θα αποδώσει σφάλμα 5%, ενώ 10.000 CPM θα αποδώσουν σφάλμα 1%).
- 17.2 Τα αποτελέσματα της ανάλυσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται από κοινού με άλλα κλινικά και εργαστηριακά δεδομένα για να βοηθήσουν τον κλινικό ιατρό στη λήψη αποφάσεων που αφορούν τη διαχείριση μεμονωμένων ασθενών.
- 17.3 Τα χαρακτηριστικά απόδοσης του προσδιορισμού αυτού δεν έχουν καθιερωθεί σε παιδιατρικό πληθυσμό.

18. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

Διάστημα αναφοράς για φυσιολογικούς δότες

Είναι σημαντικό κάθε εργαστήριο να υπολογίσει το δικό του διάστημα αναφοράς το οποίο είναι αντιπροσωπευτικό του συνήθους πληθυσμού του. Ωστόσο, οι τιμές 1,25-(OH)₂D συλλέγησαν από 123 φαινομενικά υγιείς εθελοντές από τρεις πόλεις των μεσοδυτικών Η.Π.Α. σε κλινική δοκιμή που έγινε σε τρία κέντρα στη διάρκεια των θερινών και φθινοπωρινών μηνών. Αυτοί οι 123 υγιείς δότες ήταν μια ομάδα φυλετικά διαφορετικών ατόμων, εκ των οποίων 37 άνδρες και 86 γυναίκες, με ηλικιακό εύρος 21-68 έτη. Η μέση τιμή 1,25-(OH)₂D για το σύνολο του δείγματος (n=123) ήταν 43,9 pg/mL. Το διάστημα αναφοράς 95%, που υπολογίστηκε με μη παραμετρική μέθοδο (σύμφωνα με τις οδηγίες C28-A2¹⁵), ήταν 25,1-66,1 pg/mL.

Ασθενείς με νεφρική νόσο τελικού σταδίου

Διεξήχθη μια κλινική δοκιμή για την αξιολόγηση των επιπέδων 1,25-(OH)₂D που θα υπήρχαν σε πληθυσμό ενηλίκων με διάγνωση νεφρικής νόσου τελικού σταδίου. Ένα σύνολο 87 εθελοντών τέτοιου είδους (49 άνδρες, 38 γυναίκες, ηλικιακό εύρος 19-84) από τρεις μεσοδυτικές πόλεις των Η.Π.Α. συγκεντρώθηκαν και υπεβλήθησαν σε προσδιορισμό. Το παρατηρούμενο εύρος τιμών 1,25-(OH)₂D για το δείγμα αυτό (n=87) ήταν 1,6-17,3 pg/mL. Το ανώτερο όριο αναφοράς 95% που υπολογίστηκε με τη μη παραμετρική διαδικασία είναι 14,2 pg/mL.

19. ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

19.1 Ακρίβεια

Η ακρίβεια του προσδιορισμού υπολογίστηκε από την DiaSorin με βάση τις αρχές της Οδηγίας CLSI (EP5-A).¹⁶ Τρία επίπεδα ελέγχου με βάση ανθρωπινό ορό με συγκεντρώσεις 1,25-(OH)₂D κατανεμημένα σε όλο το εύρος του προσδιορισμού υπεβλήθησαν στον προσδιορισμό για διάρκεια 25 ημερών προσδιορισμού, καλύπτοντας περισσότερες από 60 ημέρες λειτουργίας. Συμπεριελήφθησαν πολλοί τεχνικοί καθώς και οι αριθμοί πολλών παρτίδων για όλα τα συστατικά μέρη. Τα συνδυασμένα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA) και συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα.

Δείγμα	N	Μέσος pg/ml	Ακρίβεια Εντός της Ανάλυσης		Μεταξύ ημερών		Σύνολο	
			T.A.	%CV	T.A.	%CV	T.A.	%CV
ΧΑΜΗΛΗ	25	25,8	1,76	6,8	3,8	14,6	4,0	15,3
ΜΕΣΑΙΑ	25	41,3	3,16	7,7	4,6	11,1	5,1	12,3
ΥΨΗΛΗ	25	105,2	11,86	11,3	11,8	11,2	14,4	13,7

19.2 Αληθινότητα: Η αληθινότητα προσδιορισμού ελέγχθηκε με τη δοκιμή γραμμικότητας και τη δοκιμή ανάκτησης.

Γραμμικότητα (Παραλληλισμός)

Η γραμμικότητα της αραίωσης εκτιμήθηκε από την DiaSorin σύμφωνα με τις συστάσεις της Οδηγίας CLSI, EP6-P.¹⁷ Προετοιμάστηκαν τρία μίγματα δειγμάτων ορού ασθενών με διαδοχική αραίωση με μηδενικό βαθμονομητή και δόσεις που καταψύχθηκαν μεμονωμένα στους -20°C. Κάθε δείγμα και αραίωση υποβλήθηκε σε προσδιορισμό πολλών αντιγράφων σε τρεις διαφορετικές ημερομηνίες προσδιορισμού. Οι αναμενόμενες τιμές καθορίστηκαν από τις μη αραιωμένες τιμές κάθε μίγματος δείγματος πολλαπλασιασμένες με τον παράγοντα αραίωσης.

Τα δεδομένα συνοψίζονται παρακάτω και τα σύνθετα αποτελέσματα σχεδιάζονται ως γραμμική παλινδρόμηση των Αναμενόμενων έναντι των Παρατηρούμενων τιμών.

Δείγμα #	Αραίωση	Αναμενόμενη τιμή (pg/mL) (N=10)	Μέση παρατηρούμενη τιμή (pg/mL) (N=10)
1	MH ΑΡΑΙΩΜΕΝΟ	49,6	49,6
	1:2	24,8	25,3
	1:4	12,4	11,1
	1:8	6,2	4,4
2	MH ΑΡΑΙΩΜΕΝΟ	50,2	50,2
	1:2	25,1	24,2
	1:4	12,6	12,2
	1:8	6,3	4,6
3	MH ΑΡΑΙΩΜΕΝΟ	62,0	62,0
	1:2	31	31,9
	1:4	15,5	13,4
	1:8	7,8	6,2

Ανάκτηση

Η ικανότητα του προσδιορισμού να ανακτήσει ποσοτικά όλη την αναλυόμενη ουσία που είναι παρούσα στα κλινικά δείγματα αξιολογήθηκε με την προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων πρόσφατα παρασκευασθέντος, καθαρού αντιγόνου 1,25-(OH)₂-D σε τρία μίγματα δειγμάτων ασθενή. Επιλέγησαν τρεις συγκεντρώσεις και υπεβλήθησαν σε προσδιορισμό εις διπλούν, και καθορίστηκε η ποσοστιαία ανάκτηση. Η μέση ποσοστιαία ανάκτηση με τη μέθοδο αυτή ήταν 101%.

Αρ. δείγματος	Αρχ. Συγκ. (pg/mL) 1,0 mL	Ποσότητα αιχμής (pg)	*Αναμενόμενη (pg/mL)	Παρατηρούμενη (pg/mL)	% Ανάκτησης
1	30,8	50,0	77,7	75,6	97
		62,5	88,9	87,2	98
		75,0	99,8	103	103
2	42,8	50,0	89,2	89,5	100
		62,5	100,3	98,9	99
		75,0	111,0	118	106
3	40,3	50,0	86,8	83,9	97
		62,5	97,9	103	105
		75,0	108,8	118	108

*Ο υπολογισμός αναμενόμενης συγκεντρωσης περιλαμβάνει τον παράγοντα αραίωσης που εισήχθη στο διάλυμα πρόσθετου.

19.3 Αναλυτική ευαισθησία

Έχει αποδειχτεί ότι η ευαισθησία του προσδιορισμού αυτού, όταν ορίζεται ως η χαμηλότερη ποσότητα που διαφοροποιείται από το μηδέν σε 2 αποκλίσεις του βαθμονομητή κάτω από τη μέση τιμή crp του μηδενικού βαθμονομητή (n = 20), είναι $\leq 2,0$ pg/mL.

19.4 Αναλυτική ειδικότητα

Τα δεδομένα της διασταυρούμενης αντιδραστικότητας του αντιπορού που χρησιμοποιείται στο kit αυτό εκφράζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης $1,25-(OH)_2D_3$ προς τη συγκέντρωση της ουσίας με διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε 50% αναστολή της μέγιστης δέσμευσης.

Αναλυόμενη ουσία	Συγκ. Στο 50% B/Bo	% Διασταυρούμενης αντιδραστικότητας
24,25 D ₃	76.420 pg/mL	<0,5
25,26 D ₃	24.330 pg/mL	<0,5
25 D ₃	>>>1 mg/mL	<0,5

19.5 Παρεμβαλλόμενες Ουσίες

Διεξήχθη μελέτη παρεμβολής για να καθοριστεί αν αυξημένα επίπεδα κοινών ενδογενών ουσιών θα μπορούσαν να έχουν αρνητική επίδραση στα αποτελέσματα του προσδιορισμού. Η αξιολόγηση έγινε σύμφωνα με τις Οδηγίες CLSI (EP7-P).¹⁸ Τρία ανθρώπινα δείγματα με βάση όρο που περιείχαν χαμηλά, μέτρια ή υψηλά επίπεδα $1,25-(OH)_2D_3$ δοκιμάστηκαν είτε με προσθήκες της ουσίας υπό δοκιμή είτε ως υλικά ελέγχου με εμπλουτισμό με πανομοιότυπους όγκους του μέσου της ουσίας υπό δοκιμή. Έγινε εκχύλιση κάθε δείγματος δυο φορές με παραγωγή τεσσάρων πανομοιότυπων. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω αποδεικνύουν ότι δεν υπήρξε καμία παρεμβολή από οποιαδήποτε από τις ουσίες υπό δοκιμή, όπως καθορίστηκαν με στατιστική δοκιμή με ANOVA (διάστημα εμπιστοσύνης 95%), ή με τη μέση τιμή των εμπλουτισμένων δειγμάτων που υπερβαίνουν τα εύρη απόκλισης βαθμονομητή ± 2 που βρέθηκαν για τα υλικά ελέγχου.

Χολερυθρίνη

Αρ. δείγματος	Μέσος όρος υλικού ελέγχου (pg/mL)	Εύρος T.A. Υλικού ελέγχου 2	Μέσος όρος χολερυθρίνης (pg/mL)	Παρεμβολή ANOVA
Χαμηλή	19,9	18,5-21,3	19,5	0,54
Μεσαία	31,7	27,7-35,7	29,9	0,22
Υψηλή	79,7	63,5-95,9	83,2	0,45

Χοληστερόλη

Αρ. δείγματος	Μέσος όρος υλικού ελέγχου (pg/mL)	Εύρος T.A. Υλικού ελέγχου 2	Μέσος όρος χοληστερόλης (pg/mL)	Παρεμβολή ANOVA
Χαμηλή	19,9	18,5-21,3	19,4	0,64
Μεσαία	31,7	27,7-35,7	29,7	0,15
Υψηλή	79,7	63,5-95,9	75,2	0,40

Τριγλυκερίδια

Αρ. δείγματος	Μέσος όρος υλικού ελέγχου (pg/mL)	Εύρος Τ.Α. Υλικού ελέγχου 2	Μέσος όρος τριγλυκεριδίων (pg/ml)	Παρεμβολή ANOVA
Χαμηλή	14,7	12,9-16,5	15,1	0,88
Μεσαία	30,4	22,4-38,4	33,4	0,25
Υψηλή	92,6	69,5-116,9	95,4	0,68

Αιμοσφαιρίνη

Αρ. δείγματος	Μέσος όρος υλικού ελέγχου (pg/mL)	Εύρος Τ.Α. Υλικού ελέγχου 2	Μέσος όρος αιμοσφαιρίνης (pg/mL)	Παρεμβολή ANOVA
Χαμηλή	21,5	17,5-25,5	20,8	0,53
Μεσαία	38,6	35,4-41,8	40,0	0,43
Υψηλή	112,7	101,4-124,0	120,6	0,17

Ουρία

Αρ. δείγματος	Μέσος όρος υλικού ελέγχου (pg/mL)	Εύρος Τ.Α. Υλικού ελέγχου 2	Μέσος όρος ουρίας (pg/ml)	Παρεμβολή ANOVA
Χαμηλή	25,1	20,9-29,3	26,6	0,39
Μεσαία	36,2	23,8-48,6	35,9	0,96
Υψηλή	120,1	97,4-142,8	118,6	0,82

ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ, ΑΝΑΤΡΕΞΤΕ ΣΤΗΝ ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΣΕΛΙΔΑ

ΣΧΕΔΙΟ ΤΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

1. Οι βαθμονομητές, τα υλικά ελέγχου και τα άγνωστα δείγματα ανασυστήνονται όλα με αιθανόλη 95% και ιχνηθέτη μετά από το βήμα ξήρανσης της διαδικασίας στήλης.
2. Κατανέμετε τα αντιδραστήρια σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:

Σωλήνες/Αντιδραστήρια	Συνολικές μετρήσεις	NSB	Βαθ 0-5	Υλικά ελέγχου και άγνωστα δείγματα
Ανασυσταθέντες βαθμονομητές	-	-	75 μL	-
Ανασυσταθέντα υλικά ελέγχου και Άγνωστα δείγματα	-	-	-	75 μL
Αιθανόλη 95% και Ιχνηθέτης **	75 μL	75 μL	-	-
Ρυθμιστικό διάλυμα NSB	-	300 μL	-	-
1,25-(OH) ₂ -D Αντιορός	-	-	300 μL	300 μL

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Οι σωλήνες Συνολικής μέτρησης και NSB δημιουργούνται με την προσθήκη 50 μL αιθανόλης 95% με 125 μL ιχνηθέτη και διανομή με πιπέτα 75 μL του μίγματος αυτού σε διπλούς σωλήνες προσδιορισμού.










3. Αναμίξτε καλά. Επιάστε επί 2 ώρες (± 15 λεπτά) στους 20-25°C.
4. Διανέμετε 500 μL αντιδραστήριο καθίζησης GAR σε όλες τις υποδοχές, εκτός από τους δοκιμαστικούς σωλήνες συνολικών μετρήσεων.
5. Αναμίξτε καλά. Επιάστε επί 20 λεπτά (± 5 λεπτά) στους 20-25°C.
6. Φυγοκεντρήστε χρησιμοποιώντας 1800 x g* για 20 λεπτά στους 20 έως 25°C.
7. Μεταγγίστε τα υπερκείμενα.
8. Μετρήστε κάθε σωλήνα σε μετρητή γάμμα για 1 λεπτό.

*g = (1118×10^{-8}) (ακτίνα σε εκατοστά) (rpm)²

**REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFIA/
REFERENSER/SEZNAM LITERATURY/REFERANSER/BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**










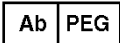
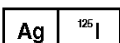







1. Haddad, J.G. and T.C.B. Stamp, "Circulating 25-Hydroxyvitamin D in Man," **American Journal of Medicine**, 57: 57, (1974).
2. Holick, M.F., "The Cutaneous Photosynthesis of Previtamin D₃: A Unique Photo-endocrine System," **Journal of Investigative Dermatology**, 76: 51, (1981).
3. Harrison, J.E., A.J.W. Hitchman, G. Jones, C.S. Tam and J.N.M. Heersche, "Plasma Vitamin D Metabolite Levels in Phosphorus Deficient Rats During the Development of Vitamin D Deficient Rickets," **Metabolism**, 31 (11): 1121, (1982).
4. DeLuca, H.F., "The Vitamin D Systems: A View From Basic Science to the Clinic," **Clinical Biochemistry**, 14: 213, (1981).
5. Norman, A.W. and F.P. Roos, "Vitamin D Seco-Steroids: Unique Molecules with Both Hormone and Possible Membranophilic Properties," **Life Science**, 24: 759, (1979).
6. DeLuca, H.F. and H.K. Schnoes, "Metabolism and Mechanism of Action of Vitamin D," **Annual Reviews Biochemistry**, 45: 631, (1976).
7. Aarskog, D., L. Aksnes and T. Markestad, "Effect of Parathyroid Hormone on Vitamin D Metabolism in Osteoporosis," **Pediatrics**, 68 (1): 109, (1981).
8. Chesney, R.W., "Current Clinical Applications of Vitamin D Metabolite Research," **Clinical Orthopedics and Related Research**, 161: 285, (1981).
9. Sorensen, O.H., B. Lumholtz, B. Lund, I. Hjelmstrand, L. Mosekilde, F. Melsen, J.E. Bishop and A.W. Norman, "Acute Effects of Parathyroid Hormone on Vitamin D Metabolism in Patients with the Bone Loss of Aging," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 54 (6): 1258, (1982).
10. Hollis, B.W., "Assay of Circulating 1,25-dihydroxyvitamin D Involving a Novel Single-Cartridge Extraction and Purification Procedure," **Clinical Chemistry**, 32 (11): 2060, (1986).
11. Lissner, D., R.S. Mason and S. Posen, "Stability of Vitamin D Metabolites in Human Blood Serum and Plasma," **Clinical Chemistry**, 27 (5): 773, (1981).
12. Tonks, D.B., "A Study of the Accuracy and Precision of Clinical Chemistry Determinations in 170 Canadian Laboratories," **Clinical Chemistry**, 9: 217, (1963).
13. Rodbard, D., et. al., "Statistical Quality Control of Radioimmunoassays," **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, 28: 1412, (1968).
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions, Approved Guideline, **CLSI** document C24-A (ISBN 1-56238-112-1), CLSI, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085, (1991).
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory, 2nd ed." **CLSI** Document C28-A2, 20(13) Approved Guideline, (2000).
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices," **CLSI** Document EP5-A, 19(2), Approved Guideline, (1999).
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods: Performance of Clinical Chemistry Devices," **CLSI** Document EP6-P, 6(18), Proposed Guideline, (1996).
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "Interference Testing in Clinical Chemistry," **CLSI** Document EP7-P, 6(13), Proposed Guideline, (1986).

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
IVD	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
LOT	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Maximum temperature	Température maximale	Höchsttemperatur	Temperatura máxima	Temperatura massima
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
Ab	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisero	Antisiero
Ab PEG	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reactivo precipitante	Reagente precipitante
Ag ¹²⁵ I	Tracer: antigen labelled with ¹²⁵ I	Traceur : antigène marqué à l'iode ¹²⁵	Tracer: ¹²⁵ I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con ¹²⁵ I	Tracciatore: antigene etichettato con ¹²⁵ I
BUF	Buffer	Tampon	Puffer	Tampón	Tampone
CAL	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
CONTROL	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
REAG	Reagent	Réactif	Reagenz	Reactivo	Reagente
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radioactivo	Radioattivo
	Highly flammable	Facilement inflammable	Leichtentzündlich	Fácilment inflamable	Facilment infiammabile
	Harmful	Nocif	Mindergiftig	Nocivo	Nocivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Svenska	Česky	Norsk	Ελληνικά
	Europeisk överensstämmelse	Značka evropské shody	EU-konformitet	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Utgångsdatum	Datum ukončení použitelnosti	Utløpsdato	Ημερομηνία Λήξης
	Tilverkare	Výrobce	Tilvirker	Κατασκευαστής
	Se bruksanvisningen	Prostudujte návod k použití	Se Bruksanvisninger	Συμβουλευτείτε τις Οδηγίες Χρήσης
	Diagnostik in vitro.	Diagnostický prostředek in vitro	In vitro-diagnostikk.	In vitro διαγνωστικό ιατροτεχνολογικό προϊόν.
	Batch-nummer	Číslo šarže	Partnr.	Αρ. παρτίδας
	Max. temperatur	Maximální teplota	Maksimums-temperatur	Μέγιστη θερμοκρασία
	Temperatur-begränsning.	Teplotní limit	Temperatur-begrensninger	Περιορισμοί θερμοκρασίας
	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Αντιορός
	Utfällningsreagens	Precipitační reagens	Utfellings-reagens	Αντιδραστήριο καθίζησης
	Spårelement: antigen betecknad med ¹²⁵ I	Izotopový indikátor: antigen značený ¹²⁵ I	Sporstoff: antigen merket ¹²⁵ I	Ιχνηθέτης: Αντιγόνο σηματοδοτούμενο με ¹²⁵ I
	Buffert	Puftr	Buffer	Ρυθμιστικό διάλυμα
	Kalibrator	Kalibrátor	Kalibrator	Βαθμονομητής
	Kontrollserum	Kontrolní sérum	Kontrollserum	Ορός μάρτυρα
	Reagens	Reagens	Reagens	Αντιδραστήριο
	Radioaktiv	Radioaktivní	Radioaktiv	Ραδιενεργό
	Mycket brandfarligt	Vysoce hořlavý	Svært brannfarlig	Πολύ εύφλεκτο
	Skadligt	Zdraví škodlivýss	Skadelig	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 U.S. and Canada Call Toll Free: 800-328-1482	
In the United Kingdom Call: +44(0) 1344 401 430 FAX: +44(0) 7884 050812	
13161E	34691 7/10

PRINTED IN U.S.A.

