



25OH-VIT.D3-RIA-CT

KIP1961

For Informational/Research Purposes Only

Distributed By:

Immuno-Biological Laboratories, Inc. (IBL-America)

8201 Central Ave. NE, Suite P

Minneapolis, Minnesota 55432, USA

Phone: (888) 523-1246

Fax.: (763) 780-2988

Email: info@ibl-america.com

Web: www.ibl-america.com



For Informational/Research Purposes Only

LOT : 130729/1

Read entire protocol before use.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the in vitro quantitative measurement of 25OH-Vit.D3 in human serum and heparin plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP1961 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. *Physiological function of 25OH-Vit.D₃*

25-Hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) is the trivial name of 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-triene-3 β, 25-diol. This secosteroid is produced in the liver by 25-hydroxylation of cholecalciferol or Vitamin D₃. 25OHD₃ is a precursor for other Vitamin D metabolites and has only a limited biological activity in itself. The most active derivative is 1 α,25-Hydroxyvitamin D₃, produced in the kidney (or placenta) by 1 α-hydroxylation of 25OHD₃. This hormonally regulated steroid stimulates the intestinal absorption of both calcium and phosphorus. It also stimulates bone resorption and mineralisation thereby preventing the development of rickets, osteoporosis or osteomalacia. This Vitamin D hormone might also be active in other tissues responsible for calcium transport (placenta, kidney, mammary gland, ...) and endocrine glands (beta-cells, parathyroid glands, ...). 25-hydroxyvitamin D₃ is a main precursor for the metabolites.

B. *Regulatory mechanism*

The production of 25-hydroxyvitamin D mainly occurs in the liver although other tissues (intestine, kidney) might perform the same hydroxylation. Although there might be some feedback inhibition of 25-hydroxyvitamin D on its own production, a higher substrate availability (Vitamin D₃) results in higher 25-hydroxyvitamin D production and higher circulating 25-hydroxyvitamin D concentrations in blood.

C. *Clinical applications*

This assay is of importance for the diagnosis of Vitamin D deficiency, insufficiency or intoxication.


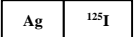
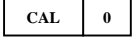
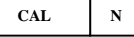
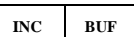
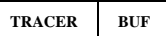



IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

At first calibrators, controls and samples (serum or heparin plasma) are extracted with acetonitrile.

A fixed amount of ^{125}I labelled 25OH Vitamin D_3 competes with the 25OH Vitamin D_3 from either extracted samples, controls or calibrators for a fixed amount of specific antibody sites immobilized to the lower and inner surface of plastic tubes.

After 2 hours incubation at room temperature, an aspiration step stops the competition reaction. The tubes are then washed with 2 ml washing solution and counted in a gamma counter.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	Quantity	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti 25OH-Vitamin. D_3	2 x 48	pink	Ready for use
 ^{125}I 25OH-Vitamin. D_3	1 vial lyophil. 160 kBq	red	Reconstitute extemporaneously by adding 6 ml of the tracer buffer
 Calibrator 0: horse serum / phosphate buffer, with gentamycin	1 vial lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water
 Calibrators 1-5 in horse serum / phosphate buffer, with gentamycin (see exact values on vial labels)	5 vials lyophil.	yellow	Add 0.5 ml distilled water
 Incubation Buffer with sodium azide (< 0.1%)	1 vial 45 ml	black	Ready for use
 Ethanol solution with sodium azide (< 0.1%)	1 vial 7 ml	red	Ready for use
 Acetonitrile	1 vial 25 ml	black	Ready for use
 Wash solution	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70x with distilled water (use a magnetic stirrer).
 Controls 1 and 2 in human serum with thymol	2 vials lyophil.	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note : Use Calibrator 0 for dilution of samples with values above the highest calibrator before extraction step.
No international reference material is available.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 50 μl , 100 μl , 400 μl , 500 μl .
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Glass tubes (12x75 mm) for extraction step
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration and washing device
8. Any gamma counter capable of measuring ^{125}I may be used (minimal yield 70%).
10. Centrifuge operating at 800-1500 g

VII. REAGENT PREPARATION

- A. Calibrators :** Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water.
- B. Controls :** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. ^{125}I 25OH-Vit. D_3 :** Reconstitute with 6 ml of the tracer buffer.
- D. Working Wash solution :** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- The reconstituted tracer has to be frozen after first use. Then, it is stable until the expiry date.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum and heparin plasma samples must be kept at 2-8°C.
- This kit is suitable for serum and heparin plasma samples. A correlation has been established between 23 serum and heparin plasma samples from same patients: Plasma = 0.95 Serum + 1.25, R = 0.89.
- If the test is not run within 48 h., storage at -20°C is recommended
- After thawing serum and heparin plasma samples should be mixed (Vortex), then centrifuged.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use.

Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample.

High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times.

Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

Extraction step :

1. Label glass tubes (12x75 mm) for extraction: 6 calibrators, 2 controls and up to 40 samples in duplicate.
2. Dispense 100 μl of each calibrator, control or sample in the respective tubes.
3. Add 0.5 ml acetonitrile to each tube.
4. Mix for 7 seconds with a vortex.
5. Centrifuge for 5 minutes at room temperature (at 800-1500 g).

Incubation step :

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, sample, control. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
2. Add 100 μl of the supernatant obtained after the extraction step in the corresponding tubes. Pipette tips have to be saturated with corresponding supernatant before the addition in the tube.
3. Dispense 400 μl Incubation Buffer in each tube, except those for total counts.
4. Add 50 μl Tracer in each tube, including total counts.
5. Incubate for 2 hours, under stirring (300-700 RPM), at room temperature.
6. Aspirate the content of each tube (except total counts).
7. Wash tubes twice with 2 ml Wash Solution and aspirate. Avoid foaming during the addition of the wash solution.
8. After the washing, let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
9. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

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

3. Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper plot the (B/B₀ x 100) values for each calibrator point as a function of the 25OH.D₃ concentration of each calibrator point, reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4 parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B₀ x 100) values, determine the 25OH.D₃ concentrations of the samples from the reference curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled 25OH.D₃ (B₀/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

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

25OH-Vit.D ₃	cpm	B/Bo x 100
Total count	31868	-
Calibrator 0 ng/ml	22218	100 %
3.5 ng/ml	17967	81 %
10.6 ng/ml	13916	63 %
21.0 ng/ml	9603	43 %
62.8 ng/ml	5113	23 %
145.2 ng/ml	4107	19 %

Note : 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection Limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent 25OH-Vitamin.D₃ concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 1.2 ng/ml.

B. Specificity

The percentage of cross reaction estimated by comparison of the concentration yielding a 50 % inhibition are respectively :

Compound	Cross-Reactivity (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0.3
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	<0.01
Vitamin D ₃	<0.03
Vitamin D ₂	<0.03
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	<0.8

* As 1,25(OH)₂-Vit.D₃ concentrations are practically 1000 times lower than 25-OH-Vit.D₃, this cross-reactivity is insignificant and does not interfere in this 25-OH-Vit.D₃ assay.

The assay performance is not affected by hemolysis (5 g/L haemoglobin tested) or bilirubinemia (0.25 g/L bilirubin tested).

C. Precision

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Sample	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19.1 ± 1.4	7.2	A	9	6.7 ± 0.5	7.2
B	43	10.4 ± 0.9	8.7	B	9	13.1 ± 1.0	7.3

SD : Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

RECOVERY TEST			
Added 25OH-Vit D ₃ (ng/ml)	Measured 25OH-Vit D ₃ conc.		Recovery (%)
	Total (ng/ml)	Blanked (ng/ml)	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

DILUTION TEST				
Sample	Dilution	Theoretical Concentration	Measured Concentration	Recovery (%)
		(ng/ml)	(ng/ml)	
Serum A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 15 and 30 minutes after the calibrator has been added to the coated tubes.

TIME DELAY			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
Sample 1	9.5	9.2	10.1
Sample 2	36.8	33.9	36.2

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots. Do not freeze-thaw more than twice.
- Acceptance criteria for the difference between the duplo results of the samples should rely on Good Laboratory Practises

XV. EXPECTED VALUES

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

The expected values given hereafter should not be considered as absolute. DIASource evaluated serum collected from 40 male and 39 female, healthy according to Ca, PTH and albumin values, from Western Europe. The age of the volunteers fell within the range of 17 - 58 years. Samples were collected during the months of December 2010 and January 2011. The mean for the population (n = 79) was 12.5 ng/mL, ranging from 4.1 to 28.7 ng/ml (based on 2.5 % to 97.5 % percentiles).

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

Recent literature has suggested the following ranges for the classification of 25 OH Vitamin D status: Deficiency: 0-10 ng/mL; Insufficiency: 10-30 ng/mL; Sufficiency: 30 to 150 ng/mL; Toxicity: >150 ng/mL.

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

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

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

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

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

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

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves. All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A log book for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS ml	CALIBRATORS ml	SAMPLE(S) CONTROLS ml
EXTRACTION			
Calibrators	-	0.1	-
Samples/Controls	-	-	0.1
Acetonitrile	-	0.5	0.5
Vortex	Vortex for 7 seconds		
Centrifugation	5 minutes at 800-1500 g		
INCUBATION			
Supernatant of extraction	-	0.1	0.1
Incubation Buffer	-	0.4	0.4
Tracer	0.05	0.05	0.05
Incubation	2 hours at room temperature under stirring (300-700 RPM)		
Separation	-	aspirate	
Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate	
Wash solution	-	2.0	
Separation	-	aspirate carefully	
Counting	Count tubes for 60 seconds		

DIAsource Catalogue Nr : KIP1961	P.I. Number : 1700543/en	Revision nr : 130729/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date: 2013-07-29

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de la 25OH-Vit.D3 dans le sérum ou le plasma hépariné humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP1961 : 96 tests
- C. **Fabriqué par:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. *Fonction physiologique de 25OH-Vit.D₃*

25-Hydroxyvitamine D₃ (25OHD₃) est le nom trivial de 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-triene-3 β, 25-diol. Ce sécostéroïde est produit dans le foie par la 25-hydroxylation de cholecalciferol ou Vitamine D₃. 25OHD₃ est un précurseur pour d'autres métabolites Vitamine D et n'a qu'une activité biologique restreinte. Le dérivé le plus actif est 1 α,25-Hydroxyvitamine D₃, produit dans les reins (ou le placenta) par la 1 α-hydroxylation de 25OHD₃. Ce stéroïde régulé de façon hormonale stimule l'absorption intestinale du calcium et du phosphore. Il stimule aussi la résorption et la minéralisation osseuses et prévient ainsi le développement du rachitisme, de l'ostéoporose ou de l'ostéomalacie. Cette hormone Vitamine D peut aussi être active dans d'autres tissus responsables pour la transport de calcium (la placenta, les reins, les glandes mammaires,...) et des glandes endocrines (les cellules bêta, les glandes parathyroïdes,...). 25-hydroxyvitamine D₃ est le précurseur principal pour les métabolites.

B. *Mécanisme régulateur*

La production de 25-hydroxyvitamine D se fait principalement dans le foie, bien que d'autres tissus (l'intestin, les reins) puissent effectuer la même hydroxylation. Quoiqu'il puisse apparaître quelque inhibition rétroactive de la 25-hydroxyvitamine D sur sa propre production, une disponibilité plus grande du substrat (Vitamine D₃) résulte en une augmentation de la production de 25-hydroxyvitamine D et des concentrations augmentées de 25-hydroxyvitamine D circulant dans le sang.

C. *Applications cliniques*

Cette trousse est importante pour le diagnostic de déficience, insuffisance ou intoxication en Vitamine D.


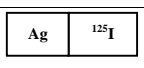
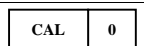

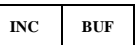
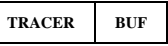

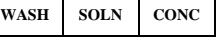
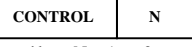
IV. PRINCIPE DU DOSAGE

D'abord les calibrateurs, les contrôles et les échantillons (de sérum ou de plasma hépariné) sont extraits avec de l'acétonitrile.

Une quantité fixe de 250H Vitamine D₃ marquée avec l'¹²⁵I, entre en concurrence avec la 250H Vitamine D₃ des échantillons, contrôles ou calibrateurs extraits pour une quantité fixe d'anticorps spécifiques, immobilisés sur la surface basse et interne du tube plastique.

Après 2 heures d'incubation à température ambiante, une phase d'aspiration met fin à la réaction de concurrence. Les tubes sont alors lavés avec 2 ml de Solution de lavage et comptés dans un compteur gamma.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	Quantité	Code Couleur	Reconstitution
 Tubes tapissés avec l'anti 250H-Vitamine D ₃	2 x 48	Rose	Prêt à l'emploi
 ¹²⁵ I 250H-Vitamine D ₃	1 flacon lyophil. 160 kBq	Rouge	Reconstituer en extemporané en ajoutant 6 ml de tampon traceur
 Calibrateur 0: sérum de cheval/tampon phosphate avec de la gentamycine	1 flacon lyophil.	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
 Calibrateurs 1-5 dans du sérum de cheval / tampon phosphate avec de la gentamycine (cf. valeurs exactes sur chaque flacon)	5 flacons lyophil.	Jaune	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée
 Tampon d'incubation avec de l'azoture de sodium	1 flacon 45 ml	Noir	Prêt à l'emploi
 Solution éthanolique et de l'azoture (<0,1%)	1 flacon 7 ml	Rouge	Prêt à l'emploi
 Acétonitrile	1 flacon 25 ml	Noir	Prêt à l'emploi
 Solution de Lavage	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
 Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et thymol	2 flacons lyophil.	Argent	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons avec des valeurs au-dessus du calibrateur le plus haut avant la phase d'extraction. Des références internationales ne sont pas disponibles.

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl.
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Tubes en verre (12x75 mm) pour la phase d'extraction.
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Systèmes d'aspiration et de lavage.
- Tout compteur gamma capable de mesurer l'¹²⁵I peut être utilisé (rendement minimum 70%).
- Centrifugeuse fonctionnant à 800-1500 g.

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Calibrateurs :** Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Contrôles :** Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- I125 250H-Vit.D₃ :** Reconstituer avec 6 ml de tampon traceur.
- Solution de lavage :** Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à -20°C pendant 3 mois maximum.
- Après la première utilisation le traceur reconstitué doit être congelé. Il est alors stable jusqu'à la date d'expiration.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum et de plasma héparinés doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Cette trousse convient pour des échantillons de sérum et de plasma hépariné. Une corrélation a été établie entre 23 échantillons de sérum et de plasma hépariné de certains patients: plasma = 0,95 + 1,25 sérum, R = 0,89.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 48 heures, un stockage à -20°C est recommandé
- Après la décongélation les échantillons de sérum et de plasma héparinés doivent être mélangés (Vortex), puis centrifugés.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.

Mélanger tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.

Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

Phase d'extraction :

- Marquer des tubes en verre (12x75 mm) pour extraction : 6 calibrateurs, 2 contrôles et jusque 40 échantillons en double.
- Distribuer 100 µl de chaque calibrateur, contrôle ou échantillon dans les tubes respectifs.
- Ajouter 0,5 ml acétonitrile à chaque tube.
- Mélanger 7 secondes avec un vortex.
- Centrifuger 5 minutes à température ambiante (à 800-1500 g).

Etape d'incubation :

- Identifier les tubes tapissés fournis dans la trousse, en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non tapissés.
- Ajouter 100 µl du surnageant obtenu après la phase d'extraction dans les tubes respectifs. Les pointes des pipettes doivent être saturées du surnageant en question avant l'addition dans le tube.
- Distribuer 400 µl du tampon d'incubation dans chaque tube (sauf ceux pour la détermination de l'activité totale).
- Ajouter 50 µl de traceur à chaque tube, ceux pour la détermination de l'activité totale inclus.
- Incuber pendant 2 heures à température ambiante en agitant (300 à 700 TPM).
- Aspirer le contenu de chaque tube (sauf ceux pour la détermination de l'activité totale).
- Laver les tubes 2 fois avec 2 ml de Solution de lavage et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage
- Après le lavage, laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.

9. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

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

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

- Utiliser un "3 cycle semi-logarithmic" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B₀(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en 25OH.D₃, écarter les valeurs aberrantes.
- Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
- L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B₀(%)) détermine les concentrations en 25OH.D₃ à partir de la courbe d'étalonnage.
- Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de 25OH.D₃ non marquée (B₀/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

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

25OH-Vit.D ₃	cpm	B/Bo x 100
Activité totale	31868	-
Calibrateur		
0 ng/ml	22218	100 %
3.5 ng/ml	17967	81 %
10.6 ng/ml	13916	63 %
21.0 ng/ml	9603	43 %
62.8 ng/ml	5113	23 %
145.2 ng/ml	4107	19 %

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

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 1,2 ng/ml.

B. Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par la comparaison de la concentration (indiquant une inhibition de 50 %) est respectivement :

Elément	Réactivité Croisée (%)
25OH-Vitamine D ₃	100
25OH-Vitamine D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamine, D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamine, D ₂	<0,01
Vitamine D ₃	<0,03
Vitamine D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamine, D ₃	<0,8

* Vu que les concentrations de 1,25(OH)₂-Vit.D₃ sont environ 1000 fois plus basses que 25-OH-Vit.D₃, cette réactivité croisée est insignifiante et n'intervient pas dans ce test 25-OH-Vit.D₃.

La performance de l'analyse n'est pas affectée par l'hémolyse (on a testé 5 g/L d'hémoglobine) ou la présence de bilirubine (on a testé 0,25 g/L de bilirubine).

C. Précision

INTRA-ESSAI				INTER-ESSAI			
Echantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Echantillon	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE RECUPERATION			
25OH-Vit D3 ajoutée (ng/ml)	Concentration en 25OH-Vit D3 mesurée		Récupération (%)
	Total (ng/ml)	Blanc (ng/ml)	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

TEST DE DILUTION				
Echantillon	Dilution	Concentration théorique (ng/ml)	Concentration mesurée (ng/ml)	Récupération (%)
Sérum A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

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

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 15 ou 30 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

	DELAI		
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
échantillon 1	9,5	9,2	10,1
échantillon 2	36,8	33,9	36,2

XIV. CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés. Ne pas congeler – décongeler plus de deux fois.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en doublet des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XV. VALEURS ATTENDUES

L'alimentation, la race, la saison et l'âge ont une influence sur les t aux de 25OH.Vit.D₃ normaux.

Les valeurs attendues reprises ci-dessous ne doivent pas être considérées comme des valeurs absolues. DIAsource a évalué le sérum de 40 hommes et 39 femmes d'Europe de l'ouest ayant des valeurs normales du Ca, de la PTH et de l'albumine. L'âge des volontaires se situait dans la fourchette de 17 à 58 ans. Les échantillons ont été prélevés pendant les mois de décembre 2010 et janvier 2011. La moyenne pour la population (n = 79) était de 12,5 ng/mL, la fourchette allant de 4,1 à 28,7 ng/ml (basé sur les percentiles 2,5 % à 97,5 %).

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

Une bibliographie récente a suggéré les fourchettes suivantes pour la classification du statut en 25 OH Vitamine D: carence: 0 à 10 ng/mL; insuffisance: 10 à 30 ng/mL; normal: 30 à 150 ng/mL; toxicité: >150 ng/mL.

XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35n5 keV).

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

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

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

Ne pas fumer, ni boire, ni manger, ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique. Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

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

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE ml	CALIBRA- TEURS ml	ECHANTIL- LON(S) CONTROLE(S) ml
EXTRACTION			
Calibrateurs	-	0,1	-
Echantillons/Contrôles	-	-	0,1
Acétonitrile	-	0,5	0,5
Vortex Centrifugation	Vortex durant 7 seconds 5 minutes à 800- 1500 g		
INCUBATION			
Surnageant d'extraction	-	0,1	0,1
Tampon d'incubation	-	0,4	0,4
Traceur	0,05	0,05	0,05
Incubation	2 heures à température ambiante en agitant (300 à 700 TPM).		
Séparation	-	aspirez	
Solution de Lavage	-	2.0	
Séparation	-	aspirez	
Solution de Lavage	-	2.0	
Séparation	-	aspirez gentiment	
Comptage	Temps de comptage des tubes: 60 secondes		

XVII. BIBLIOGRAPHIE

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

Numéro de catalogue DIASource : KIP1961	Numéro de P.I.: 1700543/fr	Numéro de révision : 130729/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Date de révision : 2013-07-29

Lees het hele protocol voor gebruik.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. *BEOOGD GEBRUIK*

Radioimmunotest voor de kwantitatieve bepaling in vitro van 25OH-Vit.D3 in humaan serum en heparineplasma.

II. *ALGEMENE INFORMATIE*

- A. **Gedeponerd handelsmerk :** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Catalogusnummer:** KIP1961 : 96 testen
- C. **Geproduceerd door :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, België.

Voor technische assistentie of voor bestelinformatie kunt u contact opnemen met:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. *KLINISCHE ACHTERGROND*

A. *Fysiologische functie van 25OH-Vit.D₃*

25-Hydroxyvitamine D₃ (25OHD₃) is de triviale naam van 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-triene-3 β , 25-diol. Deze secosteroïde wordt in de lever geproduceerd door 25-hydroxylatie van cholecalciferol of Vitamine D₃. 25OHD₃ is een precursor voor andere Vitamine D metaboliëten en heeft zelf slechts een beperkte biologische activiteit. Het meest actieve derivaat is 1 α ,25-Hydroxyvitamine D₃, geproduceerd in de nier (of placenta) door 1 α -hydroxylatie van 25OHD₃. Dit hormonaal geregelde steroïde stimuleert de absorptie door de ingewanden van zowel calcium als fosfor. Het stimuleert ook beenderresorptie en -mineralisatie en verhindert zo de ontwikkeling van rachitis, osteoporosis of osteomalacia. Dit Vitamine D-hormoon kan ook actief zijn in andere weefsels verantwoordelijk voor calciumtransport. (placenta, nier, borstklier,...) en endocriene klieren (beta-cellen, paraschildklier,...). 25-hydroxyvitamin D₃ is een hoofdprecursor voor de metaboliëten.

B. *Regulatiemechanisme*

De productie van 25-hydroxyvitamine D doet zich vooral in de lever voor hoewel andere weefsels (darm, nier) dezelfde hydroxylatie kunnen uitvoeren. Hoewel er een zekere feed-back belemmering kan zijn van 25-hydroxyvitamine D op zijn eigen productie, resulteert een hogere substraatbeschikbaarheid (Vitamine D₃) in een hogere 25-hydroxyvitamine D productie en hogere 25-hydroxyvitamine D concentraties in omloop in het bloed.

C. *Klinische toepassingen*

Deze test is van belang voor de diagnose van Vitamine D deficiëntie, insufficiëntie of intoxicatie.


IV. BESCHRIJVING VAN DE METHODE

Eerst worden kalibrators, controles en monsters (serum of heparineplasma) geëxtraheerd met acetonitrile.

Een vaste hoeveelheid ¹²⁵I gelabelde 25OH Vitamine D₃ concurreert met de 25OH Vitamine D₃ van geëxtraheerde monsters, controles of kalibrators voor een vaste hoeveelheid van specifieke sites van antilichamen, geïmmobiliseerd op het onder- en binnenoppervlak van plastic buizen.

Na twee uur incubatie bij kamertemperatuur stopt een afzuigfase de competitie-reactie. De buizen worden dan gewassen met 2 ml wasoplossing en geteld in een gammateller.

V. GELEVERDE REAGENTIA

Reagentia	Quantity	Kleur-code	Reconstitutie			
 Buizen gecoat met anti 25OH-Vitamine D ₃	2 x 48	roze	Klaar voor gebruik			
<table border="1" data-bbox="124 654 255 694"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td></tr></table> ¹²⁵ I 25OH-Vitamine D ₃	Ag	¹²⁵ I	1 flacon gevries-droogd 160 kBq	rood	Ex-tempora reconstitueren door toevoeging van 6 ml tracerbuffer	
Ag	¹²⁵ I					
<table border="1" data-bbox="124 779 255 819"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Kalibrator 0: paardenserum/fosfaatbuffer met gentamycine	CAL	0	1 flacon gevries-droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	0					
<table border="1" data-bbox="124 904 255 945"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibrators 1-5 in paardenserum/fosfaatbuffer met gentamycine (raadpleeg de flaconetiketten voor de exacte waarden)	CAL	N	5 flacons gevries-droogd	geel	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CAL	N					
<table border="1" data-bbox="76 1079 207 1120"><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table> Incubatiebuffer met sodiumazide	INC	BUF	1 flacon 45 ml	zwart	Klaar voor gebruik	
INC	BUF					
<table border="1" data-bbox="76 1205 207 1245"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Ethanolische oplossing met sodiumazide (< 0,1%)	TRACER	BUF	1 flacon 7 ml	rood	Klaar voor gebruik	
TRACER	BUF					
<table border="1" data-bbox="76 1330 207 1370"><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table> Acetonitrile	ACETONITRILE	1 flacon 25 ml	zwart	Klaar voor gebruik		
ACETONITRILE						
<table border="1" data-bbox="76 1456 287 1496"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Wasoplossing	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	bruin	70x met gedistilleerd water verdunnen (gebruik een magnetische roerder)
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1" data-bbox="76 1581 255 1621"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Controles 1 en 2 in menselijk serum met thymol	CONTROL	N	2 flacons gevries-droogd	zilver	0,5 ml gedestilleerd water toevoegen	
CONTROL	N					

Nota : Gebruik kalibrator 0 voor verduunning van monsters met waarden boven de hoogste kalibrator voor extractiefase. Er is geen internationaal referentiemateriaal beschikbaar.

VI. NIET MEEGELEVERDE MATERIALEN

De volgende materialen zijn noodzakelijk maar worden niet meegeleverd met de kit:

1. Gedestilleerd water.
2. Pipetten voor een volume van 50 µl, 100 µl, 400 µl en 500 µl.
3. Vortexmenger.
4. Magnetische roerder
5. Glazen buizen (12x75 mm) voor de extractiefase.
6. Automatische spuit van 5 ml (type Cornwall) voor de wasfase.
7. Zuig- en wastoestel.
8. Een gammateller die geschikt is voor de bepaling van ¹²⁵I. Een maximale telefficiëntie moet worden gegarandeerd.
9. Centrifuge werkend bij 800-1500 g

VII. BEREIDING VAN HET REAGENS

- A. **Kalibrators :** Reconstitueer de kalibrators met 0,5 ml gedestilleerd water.
- B. **Controles :** Reconstitueer de controles met 0,5 ml gedestilleerd water.
- C. **I125 25OH-Vit.D₃ :** Reconstitueer met 6ml van de tracerbuffer.
- D. **Werk-wasoplossing:** Bereid een voldoende hoeveelheid werk-wasoplossing door 69 eenheden gedestilleerd water toe te voegen aan 1 eenheid wasoplossing (70 x). Gebruik een magnetische roerder voor de homogenisering. Op het eind van de dag moet de ongebruikte werk-wasoplossing afgevoerd worden.

VIII. OPSLAG EN VERVALDATUM VAN REAGENTIA

- Vóór opening of reconstitutie zijn alle kitcomponenten houdbaar tot de vervaldatum, zoals vermeld op het etiket, indien zij bewaard werden bij 2 tot 8°C.
- Na reconstitutie zijn de kalibrators en controles gedurende 1 week houdbaar bij 2 tot 8°C. Voor een langere bewaartermijn moeten aliquots gemaakt worden, die bij -20°C bewaard moeten worden voor maximaal 3 maanden.
- De gereconstitueerde tracer moet na het eerste gebruik bevroren worden. Hij is dan stabiel tot de vervaldatum.
- Wijzigingen in het fysieke aspect van kitreagentia kunnen wijzen op instabiliteit of op een kwaliteitsvermindering.

IX. MONSTERAFFNAME EN MONSTERBEREIDING

- Serummonsters en monsters van heparineplasma moeten bij 2-8°C bewaard worden.
- Deze kit is geschikt voor serummonsters en monsters van heparineplasma. Er is een verband gelegd tussen 23 serummonsters en monsters van heparineplasma van dezelfde patiënten: plasma = 0,95 serum + 1,25; R = 0,89.
- Indien de bepaling niet binnen 48 uur uitgevoerd wordt, dan wordt aanbevolen om ze bij -20°C te bewaren.
- Na het ontdooven moeten serummonsters en heparineplasma gemixt worden (Vortex) en vervolgens gecentrifugeerd.

X. PROCEDURE

A. Opmerkingen bij de procedure

Gebruik de kit of de componenten niet langer dan de aangegeven vervaldatum. Materialen van kits van verschillende loten mogen niet gemengd worden. Laat alle reagentia op kamertemperatuur komen vóór gebruik.

Meng alle reagentia en monsters goed door ze voorzichtig te bewegen of door er voorzichtig mee te draaien. Om kruisbesmetting te vermijden, moet een propere wegwerpbare pipettip gebruikt worden voor toevoeging van elk reagens en monster.

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

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

B. Procedure

Extractiefase :

1. Label glazen buizen (12x75 mm) voor extractie : 6 kalibrators, 2 controles en tot 40 monsters in duplo.
2. Dien 100 µl van elke kalibrator, controle of monsters toe in de respectievelijke buizen.
3. Voeg 0,5 ml acetonitrile toe bij elke buis.
4. Mix met een vortex gedurende 7 seconden.
5. Centrifugeer 5 minuten bij kamertemperatuur (bij 800-1500 g).

Incubatiefase :

1. Etiketteer de gecoate buizen in duplo voor elke kalibrator, voor elk monster, voor elke controle. Etiketteer 2 normale buizen voor de bepaling van de totaal tellingen.
2. Voeg 100 µl toe van de supernatant bekomen na de extractiefase in de overeenkomstige buizen. De pipettepunten moeten verzadigd zijn met de overeenstemmende supernatant voor de toevoeging in de buis
3. Dien 400 µl incubatiebuffer toe in elke buis, behalve diegene voor de totaal tellingen.
4. Voeg 50 µl tracer toe in elke buis, ook de totaal tellingen.
5. Incubeer al roerend (300-700 tpm) gedurende 2 uur bij kamertemperatuur.
6. Zuig de inhoud van elke buis op (met uitzondering van de totaal tellingen)
7. Was de buizen tweemaal met 2 ml wasoplossing en zuig af. Vermijd schuimvorming tijdens toevoeging van de wasoplossing.
8. Na de wasfase moeten de buizen gedurende twee minuten rechtop blijven staan en zuig daarna de overblijvende vloeistof op.
9. Tel de buizen in een gammateller gedurende 60 seconden.

XI. BEREKENING VAN DE RESULTATEN

- Bereken het gemiddelde voor de bepalingen in duplo.
- Bereken het percentage binding van de gebonden radioactiviteit, bepaald op het punt van de nulkalibrator (0), aan de hand van de volgende formule:

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

- Zet de (B/B₀(%)) waarden uit voor elk kalibratorpunt, als een functie van de 25OH-Vit.D₃ concentratie van elk kalibratorpunt, op 3-cyclisch semi-logaritmisch of dubbellogaritmisch papier, verwerp hierbij de duidelijke uitschieters.
- Ook computergestuurde methoden kunnen worden gebruikt om de kalibratiecurve te vormen. Indien de resultaten automatisch verwerkt worden, wordt de 4 parameter logistische functie aanbevolen voor de gepaste curve.
- Bepaal de 25OH-Vit.D₃ concentraties van de monsters uit de referentiecurve door de monsterwaarden (B/B₀(%)) te interpoleren.
- Voor elke bepaling moet het totaalpercentage van de tracer, gebonden in afwezigheid van ongelabeld 25OH-Vit.D₃ (B₀/T), gecontroleerd worden.

XII. KENMERKENDE GEGEVENS

De volgende gegevens dienen enkel ter illustratie en mogen in geen geval gebruikt worden ter vervanging van de real time kalibratiecurve.

25OH-Vit.D ₃	cpm	B/Bo x 100
Totaaltelling	31868	-
Kalibrator		
0 ng/ml	22218	100 %
3.5 ng/ml	17967	81 %
10.6 ng/ml	13916	63 %
21.0 ng/ml	9603	43 %
62.8 ng/ml	5113	23 %
145.2 ng/ml	4107	19 %

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

XIII. EIGENSCHAPPEN EN GRENZEN

A. Detectielimiet

Twintig nulkalibrators werden bepaald, samen met een reeks andere kalibrators. De detectielimiet, omschreven als de schijnbare 25OH-Vitamine D₃ concentratie van twee standaarddeviaties onder de gemiddelde tellingen bij nulbinding, bedroeg 1,2 ng/ml.

B. Specificiteit

De percentages van kruisreactiviteit geschat naar de vergelijking van de concentraties (een remming van 50% toegevend) zijn respectievelijk:

Bestanddeel	Kruisreactiviteit (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	<0,01
Vitamin D ₃	<0,03
Vitamin D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	<0,8

* Daar 1,25(OH)₂-Vit.D₃ concentraties ongeveer 1000 maal lager zijn dan 25-OH-Vit.D₃, is deze kruisreactiviteit onbeduidend en heeft hij geen invloed op deze 25-OH-Vit.D₃ test.

Hemolyse (5 g/l hemoglobine getest) of bilirubinemie (0,25 g/l bilirubine getest) heeft geen invloed op de eigenschappen van de test.

C. Precisie

BINNEN EEN TEST

TUSSEN TESTEN

Monster	N	<X> ± SD (ng/ml)	V.C. (%)	Monster	N	<X> ± SD (ng/ml)	V.C. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Standaarddeviatie; VC : Variatiecoëfficiënt

D. Nauwkeurigheid

RECUPERATIE TEST			
Toegevoegd 25OH-Vit D ₃ (ng/ml)	Gemeten 25OH-Vit D ₃ concentratie		Recuperatie (%)
	Totaal (ng/ml)	Zonder blanco waarde (ng/ml)	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

VERDUNNINGSTEST				
Staal	Verdunning	Theoretische Concentratie (ng/ml)	Gemeten Concentratie (ng/ml)	Recuperatie (%)
Serum A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

- E. Tijdspanne tussen de laatste kalibrator en distributie van het monster
Zoals hieronder weergegeven wordt, blijven de resultaten van de bepaling nauwkeurig, zelfs wanneer een monster 15 of 30 minuten na toevoeging van de kalibrator in de gecoatde buisjes gepipetteerd wordt.

TIJDSPANNE			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
monster 1	9,5	9,2	0,1
monster 2	36,8	33,9	6,2

XIV. INTERNE KWALITEITSCONTROLE

- Indien de resultaten, die verkregen werden voor controle 1 en/of controle 2, niet binnen het bereik vallen zoals vermeld op het flaconetiket, dan mogen de resultaten niet gebruikt worden tenzij een bevredigende uitleg gegeven wordt voor de discrepantie.
- Indien gewenst, kan elk laboratorium zijn eigen pools voor controlemonsters maken, die dan in aliquots bewaard moeten worden in de diepvriezer. Gelieve niet meer dan twee keer in te vriezen en te ontdooien.
- Aanvaardingscriteria voor het verschil tussen de resultaten in duplo van monsters moeten steunen op gangbare laboratoriumpraktijken.

XV. TE VERWACHTE WAARDEN

Voedselopname, ras, seizoen en leeftijd tasten mogelijk de normale 25OH.Vit.D₃- spiegels aan.

De te verwachten waarden die hierna worden vermeld, mogen niet als absolute waarden worden beschouwd. DIASource evalueerde serum afgenomen bij 40 mannen en 39 vrouwen uit West-Europa die volgens de Ca-, PTH- en albuminewaarden gezond waren. De leeftijd van de vrijwilligers lag tussen 17 en 58 jaar. Monsters werden afgenomen tijdens de maanden december 2010 en januari 2011. Het gemiddelde voor de populatie (n = 79) was 12,5 ng/ml, variërend van 4,1 tot 28,7 ng/ml (gebaseerd op een percentiel van 2,5% tot 97,5%).

Elk laboratorium moet op basis van de lokale populatie zijn eigen bereik bepalen.

Recente literatuur suggereert de volgende bereiken voor de classificatie van 25 OH vitamine D-status: deficiëntie: 0-10 ng/ml; insufficiëntie: 10-30 ng/ml; sufficiëntie: 30 tot 150 ng/ml; toxiciteit: > 150 ng/ml.

XVI. VOORZORGSMAATREGELEN EN WAARSCHUWINGEN

Veiligheid

Uitsluitend voor in vitro diagnostisch gebruik.

Deze kit bevat ¹²⁵I (halfwaardetijd: 60 dagen) , dat ioniserende X- (28 keV) en γ -stralen (35,5 keV) uitzendt.

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

De componenten, afkomstig van menselijk bloed, in deze kit werden getest door in Europa goedgekeurde en/of door de Amerikaanse FDA goedgekeurde methoden op aanwezigheid van HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 en 2 en gaven een negatief resultaat. Geen enkele bekende methode kan echter volledige garantie bieden dat derivaten van menselijk bloed geen hepatitis, aids of andere infecties overdragen. Daarom moet men reagentia, serum- of plasmamonsters behandelen in overeenstemming met de plaatselijke veiligheidsprocedures.

Alle producten en derivaten van dierlijke oorsprong zijn afkomstig van gezonde dieren. Boviene componenten komen uit landen waar BSE niet gerapporteerd werd. Toch moeten componenten die bestanddelen van dierlijke oorsprong bevatten, behandeld worden als potentieel infectieus materiaal.

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

Niet roken, drinken, eten of cosmetica aanbrengen in de werkruimte. Niet met de mond pipetteren. Draag beschermende kleding en gebruik wegwerphandschoenen. Alle handelingen met radioactief materiaal moeten plaatsvinden in een daartoe bestemde ruimte, waar uitsluitend bevoegd personeel toegelaten wordt. Een logboek met ontvangst en opslag van radioactieve materialen moet worden bijgehouden in het laboratorium. Laboratoriumapparatuur en glaswerk, dat eventueel gecontamineerd werd met radioactieve bestanddelen, moeten worden gesegregeerd om kruisbesmetting van verschillende radioisotopen te vermijden.

Als radioactief materiaal gemorst werd, dan moet dat onmiddellijk gereinigd worden in overeenstemming met de procedure voor stralingsveiligheid. Het radioactieve afval moet worden weggegooid in overeenstemming met de plaatselijke voorschriften en richtlijnen van de autoriteiten waaronder het laboratorium valt. Naleving van de basisregels van stralingsveiligheid zorgt voor een juiste bescherming.

XVII. BIBLIOGRAFIE

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. SAMENVATTING VAN HET PROTOCOL

	TOTAAL- TELLINGEN ml	KALIBRA- TORS ml	MONSTER(S) CONTROLE(S) ml
EXTRACTIE			
Kalibrators	-	0,1	-
Monsters/Controles	-	-	0,1
Acetonitrile	-	0,5	0,5
Vortex Centrifugatie	Vortex gedurende 7 seconden 5 minuten bij 800-1500 g		
INCUBATIE			
Supernatant of extractie	-	0,1	0,1
Incubatiebuffer	-	0,4	0,4
Tracer	0,05	0,05	0,05
Incubatie	2 uren bij kamertemperatuur, al roerend (300-700 tpm).		
Scheiding	-	opzuigen	
Wasoplossing	-	2.0	
Scheiding	-	opzuigen	
Wasoplossing	-	2.0	
Scheiding	-	Voorzichtig opzuigen	
Telling	Tel de buisjes gedurende 60 seconden		

DIASource catalogusnummer : KIP1961	Nummer van de bijsluiter : 1700543/nl	Revisienr : 130729/1
--	--	-------------------------

Revisiedatum : 2013-07-29

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem 25OH-Vit.D3 in Serum und Heparinplasma.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Katalognummer:** KIP1961 : 96 tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Boquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

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

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Die physiologische Bedeutung des 25-OH-Vitamins D₃

25-Hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) ist die Trivialbezeichnung für 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-trien-3β, 25-diol. Dieses Secosteroid wird in der Leber durch Hydroxylierung von Cholecalciferol oder Vitamin D₃ gebildet. 25OHD₃ ist eine Vorstufe für andere Vitamin D-Metaboliten und besitzt selbst nur eine begrenzte biologische Aktivität. Der biologisch aktivste Abkömmling ist das 1α,25-Hydroxyvitamin D₃, das in der Niere (oder der Plazenta) durch 1α-Hydroxylierung des 25OHD₃ gebildet wird. Dieses hormonell gesteuerte Steroid regt im Darm die Aufnahme von Calcium und Phosphor an. Es stimuliert weiters die Knochenresorption und -mineralisierung und trägt dadurch zur Verhinderung einer Rachitis, Osteoporose oder Osteomalazie bei. Auch in anderen, für den Calciumtransport verantwortlichen Geweben (Plazenta, Niere, Brustdrüsen, usw.) und in den endokrinen Drüsen (Betazellen, Parathyroidzellen, usw.) kann dieses Vitamin D-Hormon wirksam werden. 25-Hydroxyvitamin D₃ ist die hauptsächliche Vorstufe für die Metaboliten.

B. Der Steuerungsmechanismus

Die Produktion des 25-Hydroxyvitamins D findet hauptsächlich in der Leber statt, obwohl die gleiche Hydroxylierung auch von anderen Geweben (Darm, Niere) durchgeführt werden kann. Obwohl es möglicherweise eine Feedbackhemmung durch die Produktion des 25-Hydroxyvitamins D gibt, führt ein höheres Substratangebot (Vitamin D₃) zu einer erhöhten Produktion des 25-Hydroxyvitamins D sowie zu einer Erhöhung der Konzentration des 25-Hydroxyvitamins D im Blut.

C. Klinische Anwendungen

Dieser Assay ist für die Diagnose des Vitamin D-Mangels, seiner Unzulänglichkeit oder Intoxikation von Bedeutung.


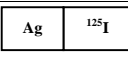
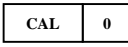
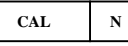
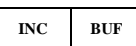
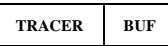
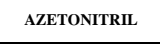

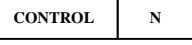
IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden Kalibratoren, Kontrollen und Proben (Serum oder Heparinplasma) mit Azetonitril extrahiert.

Eine festgesetzte Menge an ^{125}I markiertes 25-OH-Vitamin D_3 konkurriert mit dem aus Proben, Kontrollen oder Kalibratoren extrahierten 25-OH-Vitamin D_3 um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen, die im unteren Innenteil von Kunststoffröhrchen immobilisiert sind.

Nach 2 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit 2 ml Waschlösung gewaschen und in einem Gamma-Counter gezählt.

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	Quantität	Farbcode	Rekonstitution
 Mit anti 25-OH-Vitamin D_3 -beschichtete Röhrchen	2 x 48	rosa	Gebrauchsfertig
 ^{125}I 25-OH-Vitamin D_3	1 Gefäß lyophil. 160 kBq	rot	zeitnahes Rekonstituieren durch Zugabe von 6 ml Tracer-Puffer
 Null-Kalibrator: Pferdeserum /Phosphatpuffer mit Gentamicin	1 Gefäß lyophil.	gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben
 Kalibratoren 1-5: Pferdeserum/Phosphatpuffer mit Gentamicin (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten)	5 Gefäße lyophil.	gelb	0,5 ml dest. Wasser zugeben
 Inkubationspuffer mit Natriumazid (< 0,1%)	1 Gefäß 45 ml	schwarz	Gebrauchsfertig
 Äthanollösung mit Natriumazid (< 0,1%)	1 Gefäß 7 ml	rot	Gebrauchsfertig
 Azetonitril	1 Gefäß 25 ml	schwarz	Gebrauchsfertig
 Waschlösung	1 Gefäß 10 ml	braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen .
 Kontrollen: N = 1 oder 2 in Humanserum und Thymol	2 Gefäße lyophil.	silber	0,5 ml dest. Wasser zugeben

Bemerkung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator für die Verdünnung von Proben mit Werten über dem höchsten Kalibrator vor der Extraktion.

Es sind keine weiteren internationalen Referenzdokumente vorhanden.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

1. Dest. Wasser
2. Pipetten: 50 μl , 100 μl , 400 μl , 500 μl .
3. Vortexmixer
4. Magnetrührer
5. Glasröhrchen (12 x 75 mm) für den Extraktionsschritt
6. 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
7. Absaug- und Waschvorrichtung
8. Jeder Gamma-Counter, der ^{125}I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.
9. Zentrifuge für Betrieb mit 800-1500 g

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml dest. Wasser.
- B. Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- C. ^{125}I 25-OH-Vitamin D_3 :** Rekonstituieren Sie mit 6 ml Tracer-Puffer.
- D. Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8 °C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden for maximum 3 months ,für maximal 3 Monate.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Der rekonstituierte Tracer ist nach dem ersten Gebrauch tiefzufrieren und dann bis zum Verfalldatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben und Heparin Plasmaproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Dieser Kit ist für Serum- und Heparin Plasmaproben geeignet. Eine Korrelation wurde zwischen 23 Serum- und Heparin Plasmaproben des gleichen Patienten festgestellt: Plasma = 0,95 Serum + 1,25, R= 0,89.
- Falls der Test nicht innerhalb von 48 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Nach dem Auftauen Serumproben und Heparinplasma zuerst mischen (Vortexmixer), dann zentrifugieren.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur.

Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden.

Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten.

Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

Extraktionsschritt:

1. Beschriften Sie Glasröhrchen (12 x 75 mm) für Extraktion: 6 Kalibratoren, 2 Kontrollen und bis zu 40 Proben in doppelter Ausfertigung
3. Geben Sie 100 μl jedes Kalibrators, jeder Kontrolle oder Probe in die entsprechenden Röhrchen.
2. Pipettieren Sie 0,5 ml Azetonitril in jedes Röhrchen.
4. Mischen Sie 7 Sekunden mit einem Vortexmixer.
5. Zentrifugieren Sie 5 Minuten bei Raumtemperatur (bei 800-1500 g).

Inkubationsschritt:

1. Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Probe und jede Kontrolle. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
2. Pipettieren Sie 100 μl des Überstandes aus dem Extraktionsschritt in die entsprechenden Röhrchen. Die Pipettenspitzen jeweils vor dem Pipettieren mit dem entsprechenden Überstand sättigen.
3. Geben Sie 400 μl Inkubationspuffer in alle Röhrchen (außer T).
4. Pipettieren Sie 50 μl Tracer in alle Röhrchen (einschließlich T).
6. Inkubieren Sie 2 Stunden, unter Rühren (300-700 UPM), bei Raumtemperatur.
7. Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität).
8. Waschen Sie die Röhrchen zweimal mit 2 ml Waschlösung und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
9. Lassen Sie nach dem Waschen die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
10. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

- Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B₀(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der 25OH.D₃ Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4-Parameter“-Kurvenfunktion.
- Bestimmen Sie die 25OH.D₃ Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B₀(%) der Referenzkurve.
- Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes 25OH.D₃ (B₀/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

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

25OH-Vit.D ₃	Cpm	B/B ₀ x 100
Gesamtaktivität	31868	-
Kalibrator		
0 ng/ml	22218	100 %
3.5 ng/ml	17967	81 %
10.6 ng/ml	13916	63 %
21.0 ng/ml	9603	43 %
62.8 ng/ml	5113	23 %
145.2 ng/ml	4107	19 %

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

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen. Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare 25-OH-Vitamin D₃ Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 1,2 ng/ml.

B. Spezifität

Der Prozentsatz der Kreuzreaktion, der im Vergleich der Konzentration geschätzt wurde, welche eine 50%ige Inhibition ergibt, beträgt respektive:

Substanz	Kreuz-Reaktivität (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₂	<0,01
Vitamin D ₃	<0,03
Vitamin D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	<0,8

* Da die 1,25(OH)₂-Vitamin D₃ Konzentrationen praktisch 1.000 Mal niedriger sind als die des 25-OH-Vitamins D₃, ist diese Kreuz-Reaktivität als nicht signifikant für den 25-OH-Vitamin D₃ Assay einzustufen.

Die Leistung des Tests wird nicht durch Hämolyse (mit 5g/L Hämoglobin getestet) oder Bilirubinämie (mit 0,25 g/L Bilirubin getestet) beeinflusst.

C. Präzision

INTRA-ASSAY

INTER-ASSAY

Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Probe	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

WIEDERFINDUNGSTEST			
Zugegeben 25OH-Vit D ₃ (ng/ml)	Gemessene 25OH-Vit D ₃ Konzentration		Wiedergefunden (%)
	Gesamt (ng/ml)	Gelöst (ng/ml)	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

VERDÜNNUNGSTEST				
Probe	Verdünnung	Theoretische Konzentration (ng/ml)	Gemessene Konzentration (ng/ml)	Wiedergefunden (%)
Serum A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 15 oder 30 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhren zugefügt wird.

ZEITABSTAND			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
Probe 1	9,5	9,2	10,1
Probe 2	36,8	33,9	36,2

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Wenn die Resultate für Kontrolle 1 und/oder Kontrolle 2 sich nicht innerhalb des auf dem Fläschchenetikett angegebenen Bereichs befinden, können die Resultate nicht verwendet werden, wenn es keine zufrieden stellende Erklärung für die Diskrepanz gibt.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte. Erläutern Sie sich, dass zwei Gefrier-Auftau-Zyklen erlaubt sind.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

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

Die nachfolgenden erwarteten Ergebnisse sollten nicht als absolut betrachtet werden. DIASource evaluierte Serum, das von von 40 Männern und 39 Frauen aus Westeuropa gesammelt wurde, die gesund nach ihren Ca-, PTH- und Albumin-Werten waren. Das Alter der Freiwilligen lag zwischen 17 und 58 Jahren. Die Proben wurden in den Monaten Dezember 2010 und Januar 2011 gesammelt. Der Durchschnittswert (n= 79) lag bei 12,5 ng/ml, mit Bereichsgrenzen von 4,1 bis 28,7 ng/ml (basierend auf 2,5 bis 97,5 Perzentilen).

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

Aktuelle Literatur schlägt die folgenden Bereiche für die Klassifizierung von 25 OH Vitamin D vor: Mangel: 0-10 ng/ml; Unzulänglichkeit: 10-30 ng/ml; Ausreichend: 30 bis 150 ng/ml; Giftigkeit: >150 ng/ml.

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

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

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

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe. Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

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

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT-AKTIVITÄT ml	KALIBRA-TOREN ml	PROBE(N) KONTROLLEN ml
EXTRAKTION			
Kalibratoren	-	0,1	-
Proben / Kontrollen	-	-	0,1
Azetonitril	-	0,5	0,5
Vortex Zentrifugierung	Vortex 7 Sekunden 5 Minuten bei 800-1500 g		
INKUBATION			
Extraktionsüberstand	-	0,1	0,1
Inkubationspuffer	-	0,4	0,4
Tracer	0,05	0,05	0,05
Inkubation	2 Stunden bei Raumtemperatur unter Rühren (300-700 UPM)		
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	2,0	
Separation	-	absaugen	
Waschlösung	-	2,0	
Separation	-	vorsichtig absaugen	
Auswertung	Messen der Röhrcen 60 Sekunden		

DIASource Katalognummer: KIP1961	Beipackzettel- nummer: 1700543/de	Nummer der Originalausgabe: 130729/1
-------------------------------------	--------------------------------------	--

XVII. LITERATUR

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

Revisionsdatum : 2013-07-29

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

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro del 25OH-Vit.D3 umano nel siero o nel plasma eparinizzato.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIASource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP1961 : 96 tests
- C. Prodotto da:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Funzione fisiologica di 25OH-Vit.D₃

25-idrossivitamina D₃ (25OHD₃) è la denominazione comune di 9,10-secocolesta-5,7,10(19)-triene-3 β,25-diolo. Questo secosteroide viene prodotto nel fegato attraverso la 25-idrossilazione del colecalciferolo o della vitamina D₃. 25OHD₃ è una precursore per altri metaboliti della vitamina D ed è dotato esclusivamente di un'attività biologica limitata. Il derivato più attivo è 1 α,25-idrossivitamina D₃, prodotta nel rene (o nella placenta) da 1α-idrossilazione di 25OHD₃. Questo steroide regolato ormonalmente stimola l'assorbimento sia del calcio che del fosforo da parte dell'intestino. Esso stimola, inoltre, il riassorbimento e la mineralizzazione ossea prevenendo lo sviluppo del rachitismo, dell'osteoporosi o della osteomalacia. Questo ormone della vitamina D potrebbe risultare attivo anche in altri tessuti responsabili del trasporto del calcio (placenta, rene, ghiandole mammarie, ecc.) e nella ghiandole endocrine (cellule beta, paratiroidi, ecc.) La 25-idrossivitamina D₃ è il principale precursore per i metaboliti.

B. Meccanismo di regolazione

La produzione di 25-idrossivitamina D avviene principalmente nel fegato sebbene altri tessuti (intestino, reni) potrebbero eseguire la stessa idrossilazione. Sebbene possa verificarsi una certa inibizione da retroazione nella stessa produzione di 25-idrossivitamina D, una maggiore disponibilità di substrato (vitamina D₃) comporta una maggiore produzione di 25-idrossivitamina D e una maggiore concentrazione di 25-idrossivitamina D in circolazione nel sangue.

C. Applicazioni cliniche

Questo dosaggio è importante ai fini della diagnosi di carenza o insufficienza di vitamina D, o in caso di intossicazione.


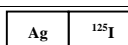
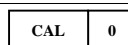
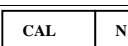
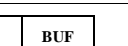
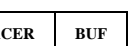

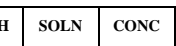
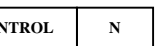
IV. PRINCIPIO DEL METODO

In un primo tempo i calibratori, i controlli e i campioni (siero e di plasma eparinizzato) vengono estratti con acetonitrile.

Una quantità definita di 25OH vitamina D₃ marcata con ¹²⁵I compete con 25OH vitamina D₃ ottenuta da qualsiasi campione, controllo o calibratore estratto per un numero definito di siti di anticorpo specifici adsorbito sulla superficie inferiore e interna delle provette di plastica.

Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono lavate con tampone di lavaggio e contate in un contatore gamma.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Quantità	Codice colore	Volume di ricostituzione
 Provette sensibilizzate con anticorpo anti 25OH-Vitamina.D ₃	2 x 48	rosa	Pronte per l'uso
 25OH-Vitamina.D ₃ I ¹²⁵	1 flacone liofilizzati 160 kBq	rosso	Ricostituire al momento aggiungendo 6 ml di tracer buffer
 Calibratore 0: siero di cavallo/tampone fosfato con gentamicina	1 flacone liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
 Calibratori 1-5 in siero di cavallo/tampone fosfato con gentamicina (le concentrazioni esatte dei calibratori sono riportate sulle etichette dei flaconi)	5 flaconi liofilizzati	giallo	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata
 Tampone incubazione con azide di sodio (<0,1%)	1 flacone 45 ml	nero	Pronte per l'uso
 Soluzione etanolica con sodio azide (<0,1%)	1 flacone 7 ml	rosso	Pronte per l'uso
 Acetonitrile	1 flacone 25 ml	nero	Pronte per l'uso
 Tampone di lavaggio	1 flacone 10 ml	bruno	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
 Controlli N. 1 e 2, in siero umano, contenente timolo	2 flaconi liofilizzati	argento	Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata

Nota: Utilizzare il calibratore N.0 per diluire i campioni con valori superiori a quelli del calibratore maggiore prima della fase di estrazione. Non è disponibile alcun materiale di riferimento internazionale.

VI. REATTIVI NON FORNITI

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

1. Acqua distillata
2. Pipette per dispensare 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl.
3. Agitatore tipo vortex
4. Agitatore magnetico
5. Provette di vetro (12x75 mm) per la fase di estrazione.
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi
7. Dispositivo di aspirazione e lavaggio.
8. Contatore gamma con finestra per ¹²⁵I (efficienza minima 70%).
9. Centrifuga attivata a 800-1500 g

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
- B. Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- C. I125 25OH-Vit.D₃:** Ricostituire con 6 ml di tracer buffer.
- D. Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70 x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo ricostituzione, calibratore e controlli sono stabili 1 settimana a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C, per periodi più lunghi, fino a un massimo di 3 mesi.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo il primo utilizzo è necessario congelare il marcato ricostituito, che si manterrà stabile fino alla data di scadenza.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero e di plasma eparinizzato a 2-8°C.
- Questo kit è adatto per campioni di siero e di plasma eparinizzato. È stata stabilita una correlazione tra 23 campioni di siero e di plasma eparinizzato ottenuti dagli stessi pazienti: plasma = 0,95 siero + 1,25, R = 0,89.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 48 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Una volta eseguito lo scongelamento, i campioni di siero e di plasma eparinizzato devono essere prima miscelati (vortex) e, poi, centrifugati.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

Fase di estrazione :

1. Etichettare le provette di vetro (12x75 mm) per la fase di estrazione: 6 calibratori, 2 controlli e fino a 40 campioni in duplicato.
2. Dispensare 100 µl di ciascun calibratore, controllo o campione nelle rispettive provette.
3. Aggiungere 0,5 ml di acetonitrile a ciascuna provetta.
4. Miscelare per 7 secondi utilizzando un agitatore vortex.
5. Centrifugare per 5 minuti a temperatura ambiente (a 800-1500 g).

Fase di incubazione :

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Aggiungere 100 µl di supernatante ottenuto dalla fase di estrazione nelle rispettive provette. Prima di eseguire l'aggiunta nella provetta, è necessario che i puntali delle pipette siano stati saturati con il rispettivo supernatante.
3. Dispensare 400 µl tampone incubazione in ciascuna provetta, tranne in quelle per l'attività totale.
4. Aggiungere 50 µl di marcato in ciascun provetta, incluso quelle per l'attività totale.
5. Incubare 2 ore a temperatura ambiente sotto agitazione (300-700 rpm).
6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale.
7. Lavare per due volte le provette utilizzando 2 ml di tampone di lavaggio ed eseguire l'aspirazione. Evitare che si formi schiuma durante l'utilizzo del tampone di lavaggio.
8. Dopo il lavaggio lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.

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

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

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

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di 25OH.D₃, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di 25OH.D₃.
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I dati sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di 25OH.D₃ in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

25OH-Vit.D ₃	cpm	B/Bo x 100
Attività totale	31868	-
Calibratore		
0 ng/ml	22218	100 %
3.5 ng/ml	17967	81 %
10.6 ng/ml	13916	63 %
21.0 ng/ml	9603	43 %
62.8 ng/ml	5113	23 %
145.2 ng/ml	4107	19 %

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

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti replicati dello standard zero sono stati dosati insieme agli altri standard. La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di 25OH-Vitamina.D₃ con cpm inferiore alla media più 2 deviazioni standard di 20 replicati dello standard zero, è risultata essere 1,2 ng/ml.

B. Specificità

Le percentuali di cross-reattività stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione al 50% sono rispettivamente:

Composto	Cross-Reattività (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	<0,01
Vitamin D ₃	<0,03
Vitamin D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	<0,8

* Dal momento che le concentrazioni di 1,25(OH)₂-Vit.D₃ sono, praticamente, 1000 inferiori rispetto a quelle di 25-OH-Vit.D₃, questa cross-reattività non è significativa e non interferisce con questo dosaggio di 25-OH-Vit.D₃.

Le prestazioni del saggio non sono influenzate dall'emolisi (analizzati 5 g/L di emoglobina) o dalla bilirubinemia (analizzati 0,25 g/L di bilirubina).

C. Precisione

INTRA SAGGIO				INTER SAGGIO			
Campio ne	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)	Campio ne	N	<X> ± SD (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI RECUPERO			
25OH-Vit D3 aggiunta (ng/ml)	Concentrazione di 25OH-Vit D3 misurata		Recupero (%)
	Totale (ng/ml)	Dopo sottrazione del bianco (ng/ml)	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

TEST DI DILUZIONE				
Campione	Diluizione	Concentrazione teorica (ng/ml)	Concentrazione misurata (ng/ml)	Recupero (%)
Siero A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

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

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 15 e 30 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
campioni 1	9,5	9,2	10,1
campioni 2	36,8	33,9	36,2

XIV. CONTROLLO DI QUALITA' INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote. Non congelare e scongelare un'aliquota più di due volte.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. VALORI ATTESI

È noto che l'apporto dietetico, la razza, la stagione e l'età influiscono sui normali livelli di 25OH.Vit.D₃. I valori attesi forniti qui di seguito non devono essere considerati come assoluti. DIASource ha analizzato il siero raccolto da 40 soggetti maschili e 39 soggetti femminili, giudicati sani in base ai valori di Ca, PTH e albumina, provenienti dall'Europa occidentale. L'intervallo di età dei volontari era 17-58 anni. I campioni sono stati raccolti durante i mesi di dicembre 2010 e gennaio 2011. La media per la popolazione (n = 79) è risultata 12,5 ng/mL, variabile da 4,1 a 28,7 ng/ml (basati sui percentili dal 2,5% al 97,5%). Ogni laboratorio deve stabilire il proprio intervallo di riferimento in base alla propria popolazione locale.

La letteratura recente suggerisce i seguenti intervalli per la classificazione dello stato di 25-OH-Vitamina D: carenza: 0-10 ng/mL; insufficienza: 10-30 ng/mL; sufficienza: da 30 a 150 ng/mL; tossicità: >150 ng/mL.

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro. Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizzanti. L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono

soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

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

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca. Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	ATTIVITÀ TOTALE ml	CALIBRATORE ml	CAMPIONI CONTROLLI ml
ESTRAZIONE			
Calibratore	-	0,1	-
Campioni/Controlli	-	-	0,1
Acetonitrile	-	0,5	0,5
Agitatore Vortex Centrifugazione	Agitare per 7 secondi 5 minuti a 800-1500 g		
INCUBAZIONE			
Supernatante di estrazione	-	0,1	0,1
Tampone incubazione	-	0,4	0,4
Marcato	0,05	0,05	0,05
Incubazione	Incubare 2 ore a temperatura ambiente sotto agitazione (300-700 rpm).		
Separazione Tampone di lavaggio	-	-	aspirare 2,0
Separazione Tampone di lavaggio	-	-	aspirare 2,0
Separazione	-	-	Aspirare con cautela
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Numero di catalogo di DIAsource : KIP1961	P.I. numero: 1700543/it	Revisione numero: 130729/1
---	----------------------------	-------------------------------

Data di revisione : 2013-07-29



Leer el protocolo completo antes de usar.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro del 25OH-Vit.D3 humano en suero o plasma heparinizado.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT
- B. **Número de Catálogo:** KIP1961 : 96 test
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas e información sobre pedidos contactar:

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

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

A. **Función fisiológica de 25OH-Vit.D₃**

25-Hidroxivitamina D₃ (25OHD₃) es el nombre simple de 9, 10-secocholesta-5, 7, 10(19)-triene-3β, 25-diol. Este secosteroide se produce en el hígado por la 25-hidroxilación del colecalciferol o Vitamina D₃. 25OHD₃ es un precursor para otros metabolitos de la Vitamina D y tiene una actividad biológica limitada. El derivado más activo es 1α,25-Hidroxivitamina D₃, producido en el riñón (o la placenta) por la 1α-hidroxilación de 25OHD₃. Este esteroide regulado de manera hormonal estimula la absorción intestinal del calcio y del fósforo. Estimula también la resorción y mineralización ósea e impide así el desarrollo del raquitismo, osteoporosis o de la osteomalacia. Esta hormona Vitamina D también puede ser activa en otros tejidos responsables del transporte del calcio (placenta, riñón, glándula mamaria,...) y en las glándulas endocrinas (células beta, glándulas paratiroides,...). 25-hidroxivitamina D₃ es un precursor principal para los metabolitos.

B. **Mecanismo regulador**

La producción de 25-hidroxivitamina D se produce principalmente en el hígado, aunque otros tejidos (intestino, riñón) pueden efectuar la misma hidroxilación. Aunque puede haber cierta inhibición retroactiva de la 25-hidroxivitamina D en su propia producción, una disponibilidad más alta del sustrato (Vitamina D₃) resulta en una producción más alta de 25-hidroxivitamina D y en concentraciones más altas de 25-hidroxivitamina D en circulación en la sangre.

C. **Aplicaciones clínicas**

Este kit es importante para diagnosticar la deficiencia, insuficiencia o la intoxicación por Vitamina D.


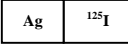
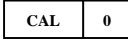
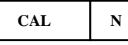
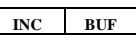
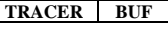


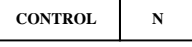
IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Primero los calibradores, los controles y las muestras (suero o plasma heparinizado) son extraídos con acetonitrilo.

Una cantidad fija de 25OH Vitamina D₃ marcada con ¹²⁵I compete con la 25OH Vitamina D₃ de las muestras, los controles o los calibradores extraídos, por una cantidad fija de sitios de anticuerpos, inmovilizados en la superficie inferior interna de tubos de plástico.

Después de 2 horas de incubación a T.A., una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de Solución de lavado y se cuentan en un contador de radiaciones gamma.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Cantidad	Código de Color	Reconstitución
 Tubos recubiertos con anti 25OH-Vitamin.D ₃	2 x 48	rosa	Listo para uso
 TRAZADOR: 25OH-Vitamina.D ₃ marcado con I125	1 vial liofilizado 160 kBq	rojo	Reconstituir inmediatamente antes de usar agregando 6 ml del tampón trazador
 CAL 0 Calibrador 0: suero de caballo/tampón fosfato con gentamicina	1 vial liofilizado	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 CAL N Calibradores 1-5 en suero de caballo/tampón fosfato con gentamicina (mirar los valores exactos en las etiquetas)	5 viales liofilizados	amarillo	Añadir 0,5 ml de agua destilada
 INC BUF Tampón de incubación con azida sódica (< 0.1%)	1 vial 45 ml	negro	Listo para uso
 TRACER BUF Solución etanólica con azida sódica (< 0,1%)	1 vial 7 ml	rojo	Listo para uso
 ACETONITRILE Acetonitrilo	1 vial 25 ml	negro	Listo para uso
 WASH SOLN CONC Solución de lavado	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
 CONTROL N Controles - N = 1 o 2 en suero humano y timol	2 viales liofilizados	plateado	Añadir 0,5 ml de agua destilada

Nota : Para diluciones de muestras con valores superiores al calibrador más alto antes de la fase de extracción, utilizar el calibrador 0.
No existe ninguna preparación de referencia internacional.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50 µl, 100 µl, 400 µl y 500 µl
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Tubos de vidrio (12x75 mm) para la fase de extracción.
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)
9. Centrifuga funcionando a 800-1500 g

VII. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- A. **Calibradores:** reconstituir los calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. **25OH-Vit.D₃I¹²⁵:** reconstituir con 6 ml de tampón trazador.
- D. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a -20°C por 3 meses máximo.
- Después del primer uso el trazador reconstituido tiene que ser congelado. Así es estable hasta la fecha de caducidad.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad o deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero y plasma heparinizado deben ser guardadas a 2-8°C.
- Este kit es adecuado para muestras de suero y plasma heparinizado. Se ha establecido una correlación entre 23 sueros y plasmas heparinizados de los mismos pacientes: Plasma = 0,95 Suero + 1,25, R = 0,89.
- Si el ensayo no se realiza en 48 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Después de descongelar, las muestras de suero y plasma heparinizado tienen que ser mezcladas (Vortex), después centrifugadas.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

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

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

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

B. Protocolo

Fase de extracción:

1. Marcar los tubos de vidrio (12x75 mm) para extracción: 6 calibradores, 2 controles y hasta 40 muestras en duplicado.
2. Dispensar 100 µl de cada calibrador, control o muestra en sus respectivos tubos.
3. Añadir 0,5 ml de acetonitrilo a cada tubo.
4. Mezclar durante 7 segundos con un vortex.
5. Centrifugar durante 5 minutos a temperatura ambiente (a 800-1500 g).

Fase de Incubación :

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los calibradores, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Añadir 100 µl del sobrenadante obtenido después de la fase de extracción a los tubos respectivos. Las puntas de las pipetas deben ser saturadas del sobrenadante en cuestión antes de la adición al tubo.
3. Dispensar 400 µl del Tampón de Incubación en cada tubo, excepto los de Cuentas Totales.
4. Añadir 50 µl del trazador a cada tubo, incluyendo las Cuentas Totales.
5. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente, en un agitador (300-700 RPM).
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos 2 veces con 2 ml de Solución de lavado y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
8. Después del lavado, dejar los tubos en posición vertical durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

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

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

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

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

25OH-Vit.D ₃	cpm	B/Bo x 100
Cuentas Totales	31868	-
Calibrador		
0 ng/ml	22218	100 %
3.5 ng/ml	17967	81 %
10.6 ng/ml	13916	63 %
21.0 ng/ml	9603	43 %
62.8 ng/ml	5113	23 %
145.2 ng/ml	4107	19 %

Nota : 1 ng/ml = 2.5 pmol/ml

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Límite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente de 25OH-Vitamin.D₃, dos desviaciones estándares debajo de la media de cuentas cuando el enlace era cero, fue de 1,2 ng/ml.

B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada estimada por la comparación de la concentración (indicando una inhibición de 50 %) es respectivamente :

Compuesto	Reacción-cruzada (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₂	<0,01
Vitamin D ₃	<0,03
Vitamin D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin.D ₃	<0,8

* Visto que las concentraciones de 1,25(OH)₂-Vit.D₃ son aproximadamente 1000 veces más bajas que 25-OH-Vit.D₃, esta reacción cruzada es insignificante y no influye en este ensayo de 25-OH-Vit.D₃.

El desempeño no se ve afectado por hemólisis (probado con 5 g/L de hemoglobina) o bilirubinemia (probado con 0,25 g/L bilirubina).

C. Precisión

PRECISION INTRA-ENSAYO

PRECISION INTER-ENSAYO

Muestra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Muestra	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	99	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B		13,1 ± 1,0	7,3

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DE RECUPERACIÓN			
Añadido 25OH-Vit D3 (ng/ml)	Concentración 25OH-Vit D3 Medida		Recuperado (%)
	Total (ng/ml)	Menos el blanco (ng/ml)	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

TEST DE DILUCIÓN				
Muestra	Dilución	Concentración Teórica (ng/ml)	Concentración Medida (ng/ml)	Recuperado (%)
Suero A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

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

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 15 y 30 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos recubiertos.

TIEMPO DE ESPERA			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
Muestra 1	9,5	9,2	10,1
Muestra 2	36,8	33,9	36,2

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, los cuales se guardan en alícuotas congeladas. No congelar y descongelar más de dos veces.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los duplicados de las muestras se apoyan en las Buenas Prácticas de Laboratorio.

XV. VALORES ESPERADOS

La alimentación, la raza, la estación y la edad pueden influenciar los niveles normales de 25OH.Vit.D₃.

Los valores esperados presentados a continuación no deben considerarse como absolutos. DIASource evaluó suero de 40 hombres y 39 mujeres, sanos de acuerdo a valores de Ca, PTH y albúmina., de Europa Occidental. La edad de los voluntarios fluctuó entre los 17 y los 58 años de edad. Las muestras fueron tomadas durante los meses de diciembre del 2010 y enero del 2011. El promedio para la población (n = 79) fue de 12.5 ng/mL, con un rango entre 4,1 al 28,7 ng/mL (basados en los percentiles 2,5 % a 97,5 %).

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basado en su población local.

Literatura reciente ha sugerido los siguientes rangos para la clasificación del estado de la 25 OH Vitamina D: Deficiencia: 0-10 ng/mL; Insuficiencia: 10-30 ng/mL; Suficiencia: 30 a 150 ng/mL; Toxicidad: >150 ng/mL.

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

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

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

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

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

No fumar, beber, comer o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes. Todo el manejo de producto radiactivo se hará en un área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros para recepción y almacenaje de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá separarse para evitar la contaminación cruzada con otros radioisótopos.

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

XVII. BIBLIOGRAFIA

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (ml)	CALIBRADO RES (ml)	MUESTRA(S) CONTROL(ES) (ml)
EXTRACCIÓN			
Calibradores	-	0,1	-
Muestras, controles	-	-	0,1
Acetonitrilo	-	0,5	0,5
Vortex	Vortex durante 7 segundos		
Centrifugación	5 minutos a 800-1500 g		
INCUBACIÓN			
Sobrenadante de extracción	-	0,1	0,1
Tampón de incubación	-	0,4	0,4
Trazador	0,05	0,05	0,05
Incubación	2 horas a T.A. en un agitador (300-700 RPM).		
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	aspirar	
Solución de Lavado	-	2,0 ml	
Separación	-	Aspirar cuidadosamente	
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

DIAsource Catalogo Nr : KIP1961	P.I. Numero : 1700543/es	Revisión nr : 130729/1
------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Fecha de la revisión : 2013-07-29

Leia todo o protocolo antes de utilizar.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. UTILIZAÇÃO PREVISTA

Radioimunoensaio para a determinação quantitativa *in vitro* do 25OH-Vit.D3 no soro humano e no plasma com heparina.

II. INFORMAÇÕES GERAIS

- A. **Nome do proprietário:** DIAsource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Kit
- B. **Número do catálogo:** KIP1961 : 96 testes
- C. **Produzido por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obter informações sobre aquisição ou assistência técnica, contacte:

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

III. SIGNIFICADO CLÍNICO

A. Função fisiológica do 25OH-Vit.D₃

25-Hidroxivitamina D₃ (25OHD₃) é o nome comum de 9, 10-secocolesta-5, 7, 10(19)-trieno-3 β, 25-diol. Este secosteróide é produzido no fígado por 25-hidroxilação de colecalciferol ou Vitamina D₃. O 25OHD₃ é um precursor para outros metabolitos da Vitamina D e possui apenas uma actividade biológica limitada. O derivado mais activo é a 1 α,25-Hidroxivitamina D₃, produzida no rim (ou placenta) por 1 α-hidroxilação do 25OHD₃. Este esteróide regulado hormonalmente, estimula a absorção intestinal, tanto de cálcio como de fósforo. Estimula, ainda, a reabsorção e a mineralização óssea, prevenindo, assim, o desenvolvimento de raquitismo, osteoporoses ou osteomalácia. Esta hormona da Vitamina D pode, igualmente, ser activa noutros tecidos responsáveis pelo transporte do cálcio (placenta, rim, glândula mamária...) e nas glândulas endócrinas (células beta, glândulas paratiroídes...). A 25-hidroxivitamina D₃ é o principal precursor dos metabolitos.

B. Mecanismo regulador

A produção de 25-hidroxivitamina D ocorre principalmente no fígado, embora outros tecidos (intestino, rim) possam desempenhar a mesma hidroxilação. Embora possa ocorrer alguma retro-inibição da 25-hidroxivitamina D na sua própria produção, uma disponibilidade superior de substrato (Vitamina D₃) resulta numa produção superior de 25-hidroxivitamina D e em concentrações superiores de 25-hidroxivitamina D a circular no sangue.

C. Aplicações clínicas

Este ensaio é importante para o diagnóstico da carência, insuficiência ou intoxicação de Vitamina D.



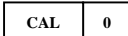
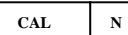
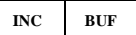
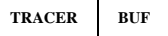


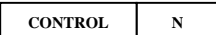
IV. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Em primeiro lugar, os calibradores, controlos e amostras (soro ou plasma com heparina) são extraídos com acetone nitrilo.

Uma quantidade fixa de 25OH Vitamina D₃ marcada com ¹²⁵I compete com a 25OH Vitamina D₃ de amostras extraídas, controlos ou calibradores para uma quantidade fixa de paratopos específicos imobilizados na superfície inferior e interna de tubos de plástico.

Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, uma operação de aspiração interrompe a reacção de competição. Os tubos são, de seguida, lavados com 2 ml de solução de limpeza e contados num contador gama.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Quantidade	Código de cor	Reconstituição
 Tubos revestidos com anti 25OH-Vitamina D ₃	2 x 48	cor-de-rosa	Pronto para utilizar
 ¹²⁵ I	1 recipiente liofilizado 160 kBq	vermelho	Reconstituir extemporaneamente por adição de 6 ml de Tampão Marcador
 CAL 0	1 recipiente liofilizado	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada
Calibrador 0: soro de cavalo/tampão fosfato com gentamicina			
 CAL N	5 recipientes liofilizados	amarelo	Adicione 0,5 ml de água destilada
Calibradores 1-5 em soro de cavalo/ tampão fosfato com gentamicina (ver valores exactos nos rótulos dos recipientes)			
 INC BUF	1 recipiente 45 ml	preto	Pronto para utilizar
Tampão de incubação com azida de sódio (<0,1%)			
 TRACER BUF	1 recipiente 7 ml	vermelho	Pronto para utilizar
Solução etanol com azida de sódio (<0,1%)			
 ACETONITRIL	1 recipiente 25 ml	preto	Pronto para utilizar
Acetonitrilo			
 WASH SOLN CONC	1 recipiente 10 ml	castanho	Dilua 70 x com água destilada (use um agitador magnético).
Solução de lavagem			
 CONTROL N	2 recipientes liofilizados	prateado	Adicione 0,5 ml de água destilada
Controlos 1 e 2 em soro humano com timol			

Nota: Utilize o Calibrador 0 para a diluição de amostras com valores acima do maior calibrador antes da operação de extracção.

Não estão disponíveis materiais de referência internacionais.

VI. MATERIAL NÃO FORNECIDO

O seguinte material é necessário, mas não é fornecido com o kit:

1. Água destilada
2. Pipetas automáticas de: 50 µl, 100 µl, 400 µl, 500 µl.
3. Misturador vortex
4. Agitador magnético
5. Tubos de vidro (12x75 mm) para a operação de extracção.
6. Seringa automática de 5 ml (tipo Cornwall) para lavagem
7. Dispositivo de aspiração e lavagem.
8. Qualquer contador gama com capacidade para medir ¹²⁵I pode ser utilizado (alcance mínimo 70%)
9. Centrifugadora a 800-1500 g

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

- A. Calibradores:** Reconstitua os calibradores com 0,5 ml de água destilada.
- B. Controlos:** Reconstitua os controlos com 0,5 ml de água destilada.
- C. I125 25OH-Vit.D₃:** Reconstitua com 6 ml de Tampão Marcador
- D. Solução de Lavagem de Trabalho:** Prepare um volume adequado de Solução de Lavagem de Trabalho, adicionando 69 volumes de água destilada para 1 volume de solução de lavagem (70x). Use um agitador magnético para homogeneizar. Elimine a solução de lavagem não utilizada no final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de serem abertos ou reconstituídos, todos os componentes dos kits são estáveis até ao final do prazo de validade, indicado no rótulo, desde que mantidos entre 2 a 8°C.
- Após reconstituição, os calibradores e os controlos são estáveis durante 1 semana, se mantidos entre 2 a 8°C. Em períodos de armazenamento mais longos, devem ser feitas alíquotas e mantidas a -20°C por no máximo 3 meses.
- O marcador reconstituído tem de ser congelado antes da primeira utilização. A seguir, permanece estável até ao fim do prazo de validade.
- As alterações na aparência física dos reagentes do kit podem indicar instabilidade ou degradação.

IX. RECOLHA E PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- Amostras de soro e amostras de plasma com heparina devem ser mantidas entre 2-8°C.
- Este kit é adequado para amostras de soro e plasma com heparina. A correlação foi estabelecida entre 23 amostras de soro e plasma com heparina dos mesmos pacientes: Plasma = 0,95 + 1,25 soro, R = 0,89.
- Se a análise não for realizada em 48 h, recomenda-se conservar a -20°C
- Após o descongelamento, as amostras de soro e plasma com heparina devem ser misturadas (Vortex) e, de seguida, centrifugadas.

X. PROCEDIMENTO

A. Notas de manipulação

Não utilize o kit ou qualquer componente depois da expiração do prazo de validade. Não misture componentes de diferentes lotes. Antes da utilização, todos os componentes devem estar à temperatura ambiente (TA).

Misture bem os reagentes e as amostras, por agitação ou rotação suaves. Para evitar contaminações cruzadas, utilize uma ponta de pipeta limpa e descartável para adição de cada reagente e amostra.

Pipetas de alta precisão ou equipamento automático de pipetagem melhoram a precisão. Respeite os períodos de incubação.

Prepare uma curva de calibragem para cada análise, não utilize dados de análises prévias.

B. Procedimento

Operação de extracção:

1. Rotule os tubos de vidro (12x75 mm) para extracção: 6 calibradores, 2 controlos e até 40 amostras em duplicata.
2. Dispense 100 µl de cada calibrador, controlo ou amostra nos respectivos tubos.
3. Adicione 0,5 ml de acetone nitrilo a cada tubo.
4. Misture durante 7 segundos com um vortex.
5. Centrifugue durante 5 minutos à temperatura ambiente (a 800-1500 g).

Operação de calibragem:

1. Rotule os tubos revestidos em duplicado, para cada calibrador, amostra e controlo. Para a determinação das contagens totais, rotule 2 tubos normais.
2. Adicione 100 µl de sobrenadante obtido após a operação de extracção aos tubos correspondentes. As pontas das pipetas devem estar saturadas com o sobrenadante correspondente antes de adicionar ao tubo.
3. Dispense 400 µl de Tampão de Incubação para cada tubo, excepto aqueles para as contagens totais.
4. Adicione 50 µl de marcador para cada tubo, incluindo as contagens totais.
6. Incube durante 2 h à temperatura ambiente sob agitação (300-700 RPM).
7. Aspire o conteúdo de cada tubo (excepto as contagens totais).
8. Lave duas vezes os tubos com 2 ml de Solução de Lavagem e aspire. Evite a formação de espuma quando adiciona a solução de lavagem.
9. Depois da lavagem, deixe os tubos na vertical durante 2 minutos e seguidamente aspire a última porção de líquido.
10. Conte os tubos num contador gama durante 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Calcule a média das determinações em duplicado.
2. Calcule a radioatividade de ligação como uma percentagem da ligação determinada no ponto do calibrador zero (0), de acordo com a fórmula seguinte:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Contagens (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagens (calibrador Zero)}} \times 100$$

3. Utilizando um papel de gráfico semi-logarítmico de 3 ciclos ou logit-log, trace os valores (B/B₀(%)) para cada ponto de calibragem como uma função da concentração 25OH-Vit.D₃ em cada ponto, rejeitando os resultados aberrantes óbvios.
4. Os métodos informáticos também podem ser utilizados para construir a curva de calibragem. Se o processamento dos resultados for automático, é recomendável um ajustamento de curvas de função logística de 4 parâmetros.
5. Por interpolação dos valores das amostras (B/B₀(%)), determine as concentrações de 25OH-Vit.D₃ das amostras da curva de referência.
6. Para cada análise, a percentagem de marcador total ligado na ausência de 25OH-Vit.D₃ (B₀/T) sem rótulo deve ser verificada.

XII. DADOS TÍPICOS

Os dados seguintes servem apenas de exemplo e nunca devem ser utilizados em detrimento dos dados reais da curva de calibragem.

25OH-Vit.D ₃	Cpm	B/Bo x 100
Contagem Total	31868	-
Calibrador		
0 ng/ml	22218	100 %
3.5 ng/ml	17967	81 %
10.6 ng/ml	13916	63 %
21.0 ng/ml	9603	43 %
62.8 ng/ml	5113	23 %
145.2 ng/ml	4107	19 %

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

XIII. DESEMPENHO E LIMITES

A. Limite de detecção

Foram analisados vinte calibradores zero, juntamente com um conjunto de outros calibradores. O limite de detecção, definido como a concentração aparente de 25OH-Vit.D₃ dois desvios padrão abaixo da média de contagem com zero ligações, foi de 1,2 ng/ml.

B. Especificidade

A percentagem de reacções cruzadas estimada por comparação com o rendimento da concentração com inibição de 50 % é, respectivamente, de:

Composto	Reacção cruzada (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₃ D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₂ D ₂	<0,01
Vitamin D ₃	<0,03
Vitamin D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin ₃ D ₃	<0,8

* Como as concentrações de 1,25(OH)₂-Vit.D₃ são praticamente 1000 vezes inferiores às de 25-OH-Vit.D₃, esta reactividade cruzada é insignificante e não interfere neste ensaio de 25-OH-Vit.D₃.

O desempenho do ensaio não é afetado pela hemólise (5 g / L de hemoglobina testado) ou bilirrubinemia (0,25 g / L de bilirrubina testado).

C. Precisão

INTRA-ENSAIO				INTER-ENSAIO			
Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	C.V. (%)	Soro	N	<X> ± DP (ng/ml)	C.V. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação

D. Sensibilidade

TESTE DE RECUPERAÇÃO			
25OH-Vit D ₃ adicionado (ng/ml)	Concentração 25OH-Vit D ₃ medida		Recuperação (%)
	Total (ng/ml)	menos o branco (ng/ml)	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

TESTE DE DILUIÇÃO				
Amostra	Diluição	Concentração	Concentração	Recuperação (%)
		teórico (ng/ml)	medida (ng/ml)	
Serum A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

E. Atraso de tempo entre o último calibrador e a dispensa da amostra

Conforme demonstrado a seguir, os resultados das análises continuam precisos, mesmo quando é dispensada uma amostra 15 e 30 minutos depois da adição do calibrador aos tubos revestidos.

ATRASSO DE TEMPO			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
Amostra 1	9,5	9,2	10,1
Amostra 2	36,8	33,9	36,2

XIV. CONTROLO INTERNO DE QUALIDADE

- Se os resultados obtidos para o controlo 1 e/ou controlo 2 não estão dentro do intervalo especificado no rótulo do recipiente, os resultados não podem ser utilizados, a menos que seja dada uma explicação satisfatória para a discrepância encontrada.
- Se for desejável, cada laboratório pode fazer os seus próprios conjuntos de amostras de controlo, que podem ser mantidas congeladas em alíquotas. Não faça ciclos de congelação/descongelação mais do que duas vezes.
- Os critérios de aceitação para a diferença entre os resultados duplos das amostras devem basear-se nas Boas Práticas de Laboratório.

XV. Valores esperados

O estado alimentar, a raça, a estação e a idade afectam reconhecidamente os níveis normais de 25OH.Vit.D₃.

Os valores esperados, a seguir não devem ser considerados como absolutos. DIAsource fontes séricas avaliadas coletadas de 40 homens e 39 mulheres, saudáveis, de acordo com os valores de PTH, cálcio e albumina, da Europa Ocidental. A idade dos voluntários caiu dentro da faixa de 17-58 anos. Amostras foram coletadas durante os meses de dezembro de 2010 e janeiro de 2011. A média da população (n = 79) foi de 12,5 ng / mL, variando 4,1-28,7 ng / ml (com base em percentuais de 2,5% para 97,5%). Cada laboratório deve estabelecer seus próprios limites com base na sua população local.

A literatura recente tem sugerido os seguintes limites para a classificação de 25 OHVitamina D: Carência: 0-10 ng / mL; Insuficiência: 10-30 ng / mL; Normal: 30 a 150 ng / mL; Toxicidade:> 150 ng / mL.

XVI. AVISOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Apenas para uso em diagnóstico *in vitro*.

Este kit contém ¹²⁵I (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e γ (35,5 keV) ionizantes.

Este produto radioactivo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioactivos

estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrado em seres humanos ou em animais.

Os componentes de sangue humano incluídos neste kit foram testados por métodos aprovados pela legislação europeia e/ou FDA e dados como negativos para o HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Não existe qualquer método, até agora conhecido, que ofereça total segurança quanto à impossibilidade de transmissão de hepatite, HIV ou outras infecções, por via do sangue humano. Por isso, deve manipular os reagentes, o soro ou o plasma de acordo com as regras locais de segurança, quanto a materiais potencialmente infecciosos.

Todos os produtos de origem animal e seus derivados foram recolhidos de animais saudáveis. Os componentes bovinos são provenientes de países sem casos notificados de BSE. No entanto, todos estes componentes devem ser manipulados como sendo potencialmente infecciosos.

Evite o contacto da pele e mucosas com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida pode reagir com o chumbo e o cobre das canalizações e formar compostos explosivos. Durante a operação de lavagem, enxágue com uma quantidade abundante de água corrente para evitar acumulações de azida.

Não fume, coma, beba ou aplique cosméticos na área de trabalho. Não utilize as pipetas com o auxílio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas. Toda a manipulação radioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioactivo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioactivo deve ser eliminado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. O cumprimento das regras básicas da radiosssegurança fornece a protecção adequada.

XVII. BIBLIOGRAFIA

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	CONTAGENS TOTAIS ml	CALIBRAD ORES ml	AMOSTRA(S) CONTROLO(S) ml
EXTRACÇÃO			
Calibradores	-	0,1	-
Amostras/Controlos	-	-	0,1
Acetonitrilo	-	0,5	0,5
Vortex Centrifugação	Vortex durante 7 segundos 5 minutos a 800 - 1500 g		
INCUBACÃO			
Sobrenadante de extracção	-	0,1	0,1
Tampão de Incubação	-	0,4	0,4
Marcador	0,05	0,05	0,05
Incubação	2 horas à temperatura ambiente sob agitação (300-700 RPM).		
Separação	-	-	aspirar
Solução de lavagem	-	-	2.0
Separação	-	-	aspirar
Solução de lavagem	-	-	2.0
Separação	-	-	Aspirar cuidadosamente
Contagem	Contar os tubos durante 60 segundos		

Nº do catálogo DIASource: KIP1961	Nº de P.I: 1700543/pt	Nº de revisão: 130729/1
--------------------------------------	--------------------------	----------------------------

Data da revisão : 2013-07-29

Διάστ εολόγητ ο σπ ο κόλο ην σό τ ηρήσ η

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΠΑ ΤΗΝ ΟΥΔΑ ΠΡΟΪΖΕΤΑ

Εδίσ οω οσπρωδίσ ορ φός η μ α ην in vitro ποω α κή μέτρησ ης 25OH-Vit.D3 σ ω θράπ ν ο ορό ή ηπρ ν ν φέν οπλάφια .

II. ΓΕΝΚΕΣ ΠΑΗΡΩΟΠΙΕΣ

- A. Εμπτηρή ονομσ ία: Κτ 25OH-Vit.D3-Ria-CT ης DIASource
- B. Αρθμός κω ολόγω : KIP1961 : 96 εξέτάωις
- Γ. Κω σ κωός ετ α σό τ η: DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τ εχνική βοήθια ή πλ ηροφί ες σ χετ ήόμε πωργθί ες επκωνήσ τ ε σ τ :α
Τηλ. : +32 (0)10 84.99.11 Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΑΙΝΚΟ ΥΠΩΑΡΟ

- A. Φσ ι ο λ ο γ ι κή τ ο υ ρ η ής 25OH-Vit.D₃
25-υδροξυβι τ μίν ηD₃ (25OHD₃) είν α τ ο κ ο ι ν ό ο ν ο μ α τ ης 9, 10-σ κ ο χ ο λ ε σ α -5, 7, 10(19)-π ρ ε ν ο β, 25-δ ι ό λ ης Α υ τ ό τ ο σ κ ο α ε ρ ο ι δ ές π ρ ά γ ε τ α σ ο ή π ω ρ σ ό 25-υδροξυλίωσ ης χ ο λ η κ α λ σ φ ε ρ ό λ η σ ή ης β ι τ μίν ηD₃. Η 25OHD₃ είν σ π ρ ό δ ρ ο μ ος η α ά λ λ ο υς μ ε τ β ο λ ί τ ες ης β ι τ μίν ηD και σ ό μ ο ν η ης έ χ ε π ε ρ ο ρ α φ έ ν η β ι ο λ ο γ κ ή δ ρ ά σ η . Το π ο δ ρ α κ ό π ρ ά γ ω γ ο είν α η 1α,25-υδροξυβι τ μίν ηD₃, π ο υ π ρ ά γ ε τ α σ ο ν ε φ ρ ό (ή τ ο ν π λ α κ ο ύ ν τ α) μ ε 1α-υδροξυλίωσ ης 25OHD₃. Α υ τ ό τ ο ρ μ ο ν ι κ ά ρ υ θ μ ι φ έ ν ο α ε ρ ο ι δ ές δ ι ε γ έ ρ ι η τ η ν ε ν τ ε ρ ι κ ή σ π ο ρ ρ ό φ η σ η τ ό ω τ ο υ α φ ε α ί ο υ ό ω κ α τ ο υ φ ω φ ό ρ ο υ . Ε π ί σ ης δ ι ε γ έ ρ ι η τ η ν ο σ α κ ή ω ν α ρ ρ ό φ η σ η και π ρ ο θ ή κ η μ ε π α λ λ ι κ ώ ν σ ο ι χ ε ί ω ν π ρ ο λ α μ β ά ν ο ν τ ες έ τ ω τ η ν ω ά π ω ξ η ρ α χ ί α δ ας ο σ ε ο π ό ρ ω τ ης ή ο σ ε ο μ α λ α κ ί ας . Α υ τ ή η ρ μ ο ν ή ης β ι τ μίν ηD θα μ π ο ρ ό σ ε ε π ί σ ης ν α ε ί ν α δ ρ α κ ή σ ε ά λ λ ο υς ι σ ο ύς υ π ε ύ θ υ ν ο υ σ ι α τ η μ ε τ α φ ο ρ ά τ ο υ α φ ε α ί ο υ (π λ α κ ο ύ ν τ ες, ν ε φ ρ ός θ η λ α σ α κ ός α δ έ ν ες, ...) και ε ν δ ο κ ρ α ν ε ί α φ έ ν ες (β-κ ύ τ α ρ α , π ρ ο θ υ ρ ε ο ι δ ε ίς α δ έ ν ες ...). Η 25-υδροξυβι τ μίν ηD₃ είν σ έ ν α κ ύ ρ ι ο σ π ρ ό δ ρ ο μ ος η α τ ο υς μ ε τ β ο λ ί τ ες.
- B. Ρυ θ μ ι σ τ ι μ ή γ γ α ν ι σ μ ός
Η π ρ α γ ω γ ή ης 25-υδροξυβι τ μίν ηD λ α μ β ά ν ε ι χ ά ρ α κ υ ρ ί ας σ ο ή π ω ρ π ρ ό τ α και ά λ λ ο ι τ ι σ ο ί (έ ν τ ε ρ α ν ε φ ρ ό θ α μ π ο ρ ό σ ω ε π ί σ ης ν α ε κ ε τ ο ύ ν τ η ν ί δ ι α δ ρ ο ξ υ λ ί ω σ η . Π ο ρ ό τ α θ α μ π ο ρ ό σ ε ν α υ π ά ρ χ ε ι κ ά π ο ι α ω ν α δ ρ α κ ή ω ν α σ ο λ ή ης 25-υδροξυβι τ μίν ηD σ η ν ί δ ι α τ η ν π ρ α γ ω γ ή ης, υ π η λ ό τ ε ρ η δ ι α θ ε σ μ ό τ η τ α τ ο υ υ π ο α ρ ά μ α σ ος (βι τ μίν ηD₃) έ χ ε ας σ π ο τ έ λ ε φ ι α υ π η λ ό τ ε ρ η π ρ α γ ω γ ή 25-υδροξυβι τ μίν ης D και υ π η λ ό τ ε ρ ες σ η κ ε ν π ρ ά τ ε ις κ υ κ λ ο φ ο ρ ο ύ σ ες 25-υδροξυβι τ μίν ηD σ ο ά μ α.
- Γ. Κ λ ι ν ι κ έ φ α ρ μ ο γ ές
Ο π ρ ο δ ι ο ρ α φ ός α τ ός ε ί ν α σ η μ α ν α κ ός η α τ η δ ι ά γ ν ω σ η έ λ λ ε ι ψ ης ω ν ε π ά ρ κ ε ι ας ή δ η λ η τ η ρ ά σ ης σ ό β ι τ μίν ηD.

IV. ΒΑΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Κατά την βόθμον ομητές υλι κάελέγγ ουκα δείγματα (ορός ή ηπαιρι νιφέν ο πλάφια) υποβάλλον τα ε εκχ ύλι φε ακε τον ιφίλι ο Μι α αθερη πόφτητα 250 Ηβι τιμίν ηD₃ σημαμέν ης με ¹²⁵I ω πων ίζετα με την 250 Ηβι τιμίν ηD₃ είτε από τα εκχ υλι φιέν δείγματα , είτε από τα υλι κά ελέγγ ου ή τους βόθμον ομητές για αθερη πόφτητα θέσων ειδικών αν παφάτων που είν αακιν ηποτι ημέν απην κάτω και εσωερική επφάνεια πλάσι κών ωλην φίων . Μετά από επάση 2 ωρών ε θερμοκρασία δαμασιού , η αν άδραση αν πων ιφίου περιμαίζετα με έν αβήμα αν αρρόφησης . Τα ωλην άρια κοπύπ ν πλένον τα με 2 ml διάλυμωσ πλύσης και μεφών τα ε έν αν απρη θμητή ακάιν αν γ .

V. ΠΡΕΤΟΜΕΝ ΑΝΤΙΛΑΒΗΡΙΑ

Αντιδωστήρια	Ποσότητα	Χρωματικός κωδικός	Ανασυσταση
Σωλην άρια επ αφιμένα με αν - 250Η-βι τιμίν ηD ₃	2 x 48	ροζ	Έτ αμο γα χ ρήση
¹²⁵ I Ag ¹²⁵ I ¹²⁵ 250Η-βι τιμίν ηD ₃	1 φιαδίδο λυοφιλά 160 kBq	κόκκιν ο	Ανασυσταση αμέσως πριν τηρήση η προθέτων πας 6 ml του ρυθμισακού διάλυμωσ
CAL 0 Βόθμον ομητής 0: ορός αλόγου /ρυθμισακού διάλυμωσ φωσφορικών μεφεν ταμικίν η	1 φιαδίδο λυοφιλά	κίτρινο	Προθέσ τ θ,5 ml σεασιμέν ου ν ερού
CAL N ορός αλόγου /ρυθμισακού διάλυμωσ φωσφορικών μεφεν ταμικίν η (δείτε πας ακρα βείζπα μέσας επα κέτερετων φιαδίδω)	5 φιαδίδο λυοφιλά	κίτρινο	Προθέσ τ θ,5 ml σεασιμέν ου ν ερού
INC BUF Ρυθμισακού διάλυμωσ με αζίδισου ν απί ου <0,1%	1 φιαδίδο 45 ml	μάρο	Έτ αμο γα χ ρήση
TRACER BUF Αι θαν ολι κώδι άλυμωσ με αζίδισου ν απί ου <0,1%	1 φιαδίδο 7 ml	κόκκιν ο	Έτ αμο γα χ ρήση
ACETONITRILE Ακετον ιφίλι ο	1 φιαδίδο 25 ml	μάρο	Έτ αμο γα χ ρήση
WASH SOLN CONC Διάλυμωσ πλύσης	1 φιαδίδο 10 ml	καφέ	Αμώσ τ ε70 x με σεασιμέν ου ν ερού (χ ρησμοπι ήσε μω ηη κό αν άευσήρα) .
CONTROL N Υλι κάελέγγ ουλι 2 ε αν θράπιν ο ορό με θυμόλη	2 φιαδίδο λυοφιλά	ασιμί	Προθέσ τ θ,5 ml σεασιμέν ου ν ερού

Σημείωση: Χρησμοπι είτε βόθμον ομητή 0 για την οράση δείγματος με πα μέσ πίν ω από απήν του υψηλότερου βόθμον ομητή πιν ν από το βήμα εκχ ύλι σης Δεν υπάχη ειδικόσμο δι εθν έργλι κών αροράς .

VI. ΑΠΟΛΟΓΗ ΤΩΝ ΑΕΝ ΠΡΕΤΟΜΕΝ

- Τα ακόλουθα υλι κάσιπ τού ν τα αλλά δεν πρέχον τα σιο κι τ
1. Αεασιμέν ο ν ερού
 2. Πιπέτες για δι αν ομή 50 μl, 100 μl, 400 μl, 500 μl.
 3. Αν αμείκτης αροβιλιφίου
 4. Μω ηη κόσ αν άευσήρας
 5. Υάλιν ωλην άρια (12x75 mm) για το βήμα της εκχ ύλι σης
 6. Αυτόμαση φάρα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
 7. Συαευσή αν αρρόφησης και πλύσης .
 8. Μπορεί να χ ρησμοπι ηθεί οποιοσδηόποτε απρη θμητής ακάιν αν γ με δυν άπτηα μέφησης του ¹²⁵I (ελάχι ισιπώδοση 70%).
 9. Συαευσή φυγοκέν τρι σης αα 800-1500 g

VII. ΠΡΑΚΤΙΚΗ ΑΝΤΙΛΑΒΗΡΙΑ

- A. Βόθμον ομητές : Αν ασιήσε τους βόθμον ομητές με 0,5 ml σεασιμέν ου ν ερού
- B. Υάλιν ωλέγγω: Αν ασιήσε τα υλι κάελέγγ ου με 0,5 ml σεασιμέν ου ν ερού
- Γ. ¹²⁵ 250Η-Vit.D₃ : Αν ασιήσε με 6 ml του ρυθμισακού διάλυμωσ .
- Δ. Διάλυμω πλύσης ης αφισ ίας: Προετοιμάσε επρηκή όκο διάλυμωσ πλύσης ερσάσ με προθήκη 69 όκων σεασιμέν ου ν ερού ε 1 όκο διάλυμωσ πλύσης (70x). Χ ρησμοπι ήσε μω ηη κό αν άευσήρα για την ομογεν οποι ήση. Απορρίψτε το μη χ ρησμοπι ημέν οδι άλυμω πλύσης ερσάσ σο τέλος της ημέρας .

VIII. ΦΥΛΗ ΚΑ ΗΜΕΡΟΜΗΝΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΛΑΒΗΡΙΑ

- Πριν από το άνωμαή την αν ασιήση , όλα τα σιαπικά του κι τ παριμέν ουν αθερά έας την ημερομηνία λήξης η οποία αν αράφεται στην επα κέτα εφών δι απηρού ν τα ε θερμοκρασία 2 έας 8° C.
- Μετά την αν ασιήση , τα υλι κάελέγγ ου παριμέν ουν αθερά για μία εβδομάδα ε θερμοκρασία 2 έας 8° C. Για μεγάλοι περεσ περιόδους φύλαξης πρέπει να ση ημαίζον τα κλάφια και να άδισηρού ν τα σους - 20° C για έας και 3 μήν εσο αν άπερο .
- Φέσσο , παρκευαφιέν ο διάλυμω πλύσης ερσάσ θα πρέπει να α χ ρησμοπι εί τα ην ίδι σιμέρα .
- Ο αν ασιήσει χ η ν ηθέπα πρέπει να ακαπαύχ ετα μετά την πρφή χ ρήση . Ση τον έχ ει άιν ααθερός μέφρη η ημερομηνία λήξης
- Τυχ όνωμε παβολές της φυσικής εμφάνιστων αν παδρατηάων του κι τ εν δέχ ετα απωδηλιών ουν ασιήεια ή αλλοίωση .

IX. ΣΥΜΟΗ ΚΑ ΠΡΟΤΟΜΕΝ ΑΙΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού και ηπαιρι νιφέν ου πλάφιασ πρέπει να φυλάων τα ε θερμοκρασία 2-8° C.
- Αυτό το κι τεν δείκν υπα δείγματα ορού και ηπαιρι νιφέν ου πλάφιασ . Εξ ει κωθεραθεί σση έπα με πύ 23 δείγμάτων ορού και ηπαιρι νιφέν ου πλάφιασ από τους ίδι ουσάθεν εις πλάφια = 0,95 + 1,25 ορού, R = 0,89.
- Εάν η εξέταση δεν παρμαποπι ηθεί εν τός 48 ωρών , ο νι σάτα η φύλαξη σους -20° C.
- Μετά την άπυση, τα δείγματα ορού και ηπαιρι νιφέν ου πλάφιασ πρέπει να αν αμειγν ύνον τα (με αροβιλιφίο) και ση τον έχ ει να υποβάλλον τα ε φυγοκέν τρι σης .

X. ΛΗΞΗ

- A. Σημείωση σης χετ υάμε τ αφαρσό Μη χ ρησμοπι είε το κι τή τα σιαπικά μετά την ημερομηνία λήξης Μην αν αμειγν ύεπαλι κάσπό δι αρορεπα κές παρπιδες κι τ Φέρετε όλα τα αν παδρατηά ε θερμοκρασία δαμασιού πιν από τη χ ρήση . Αν αμείζετα καλά όλα τα αν παδρατηά και τα δείγματα με σπηλή αν ακίν ηση ή αν άδευση . Χ ρησμοπι είτε έν ακαθαρό αν άλώσμο ρύγγ ος πιπέτας για την προθήκη κάθε δι αρορεπακού αν παδρατηάου και δείγματος πακειμέν ουν απωφύγετε την επι μόλυψη Η ακρίβεια βελαών ετα με χ ρήση πιπέτων υψηλής ακρίβειας ή απωμωποπι ημέν ου εξοπλιφίου δι αν ομή με πιπέτες . Τηρείτε τους χ ρόν ουσέπιασης . Προετοιμάσε μι α κοπύλη βόθμον όμησης για κάθε αν άλυση και μη χ ρησμοπι είε τεδομέν ασπό παρηγού μεν ες αν άλυσει
- B. Διδυοσία

Βήμαε κχύλι σης

1. Σημάν ετα τα υάλιν ωλην άρια (12x75 mm) για την εκχ ύλι ση 6 βόθμον ομητές 2 υλι κάελέγγ ουκα έας 40 δείγματα ειζοι πλού ν
2. Δι αν είμετε 100 μl από κάθε βόθμον ομητή, υλι κόελέγγ ουή δείγμα σι αν άσιπ χ ωλην άρια .
3. Προθέσε ε κάθε ωλην άριο 0,5 ml ακε τον ιφίλι ου
4. Αν αμείζετα π 7 δευτερόλεπα χ ρησμοπι ών πας αν αμείκτη αροβιλιφίου .
5. Φυγοκέν τρι σε επί 5 λεπτά ε θερμοκρασία δαμασιού (αα 800-1500 g).

Βήμαε πύσ ης

1. Σημάν ετα επ αφιμένα ωλην άρια ειζοι πλού ν για κάθε βόθμον ομητή, δείγμα, υλι κόελέγγ ου Γι απων προδι οραφί των ον ολι κών μεφήσων , σημάν ετα 2 φυσολογικά ωλην άρια .
2. Προθέσε 100 μl του υπερκει μέν ουσου ελήφθη μετά το βήμα εκχ ύλι σης αν αν άσιπ χ ωλην άρια . Τα ρύγγ η των πιπέτων πρέπει να δι άβρέχον τα με το αν άσιπ χ ουπερκει μέν οπριν την προθήκη σω ωλην άριο .
3. Δι αν είμετε 400 μl από το ρυθμισακού διάλυμω επύσσης ε κάθε ωλην άριο, εκτός από εκείν σου αρορού ν πας ον ολι κέμεφήσεις .

4. Προθέσει 50 μl από τον ιχνηθέτη σε κάθε ωλην άριο, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων όπου αφορούν τις συνολικές μετρήσεις.
6. Επιάσει επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάλυση (300-700 σ.α.λ.).
7. Αν αφορήσει το περιεχόμενό κάθε ωλην άριου (με εξαίρεση εκείνου όπου αφορούν τις συνολικές μετρήσεις).
8. Πλύνει τε δύο φορές τα ωλην άρια με 2 ml διαλύματος πλύσης και αν αφορήσει. Αποφύγετε το σχηματισμό αερίων κατά τη διάρκεια της προθήκης του διαλύματος πλύσης.
9. Μετά την πλύση, αφήσει τα ωλην άρια να αραθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αν αφορήσει τη σκόνη υγρού που απομένει.
10. Υποβάλλετε σε μέτρηση τα ωλην άρια σε σπειρομετρική ακτίνων γ για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

1. Υπολογίσει τη μέση τιμή των διπλών προδιορισμών.
2. Υπολογίσει τη δεφινιμένη ηρωδεν έρεια ως ποσοστό της δέφινισης που προδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βόθμου ομής (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B0 \times 100 = \frac{\text{ΜετρήσειV (ΒαϑμονομητήV ή δείγμα)}}{\text{ΜετρήσειV (ΜηδενικόV βαϑμονομητήV)}} \times 100$$

3. Με χρήση ημι λογαριθμικού ή logit-log γραφικού ομαλοποιημένου βόθμου ομής, παραστήσει γραμμάτιο με τις μετρήσεις (B/B0 x 100) για κάθε σημείο βόθμου ομής ως συνάρτηση της σκόνης πωσης της 250 HD₃ για κάθε σημείο βόθμου ομής και απορρίψτε τις σημειώσεις είναι αποδεκτές τις μετρήσεις.
4. Για την κατασκευή της καμπύλης βόθμου ομής είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσημογή καμπύλης λογαριθμικών άρτησης 4 παραμέτρων.
5. Με παρεμβολή των τιμών των δειγμάτων (B/B0 x 100), προδιορίσει τις σκόνης πωσης 250H.D₃ των δειγμάτων από την καμπύλη αν αφορήσει.
6. Για κάθε πωση δειγμάτων, πρέπει να ελέγξει α τ ο ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεικνύεται αν τη σπειρομετρία με τις 250H.D₃ (B0/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΕΡΩΤΗΜΑΤΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προαρίζονται μόνο ως επεξήγηση και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ ως τις καμπύλης βόθμου ομής πωσιακού χρώνου.

250H-Vit.D ₃	cpm	B/B0 x 100
Συνολική μέτρηση	31868	-
Βόθμου ομής	0 ng/ml	22218 100 %
	3.5 ng/ml	17967 81 %
	10.6 ng/ml	13916 63 %
	21.0 ng/ml	9603 43 %
	62.8 ng/ml	5113 23 %
	145.2 ng/ml	4107 19 %

Σημείωση: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. ΑΙΧΜΗ ΚΑΙ ΓΕΙΩΣΜΟΣ

- A. Ορο αίχμασ ης**
Υποβλήθηκαν σε προδιορισμό είκοσι μηδενικού βόθμου ομής μαζί με έν ασφν ολο άλλων βόθμου ομής. Το όρι αν ίχνη ευσηφρής όμεις η φαν όμεις κήκέν πωση 250H-βι τμίν ηςD₃ δύο τυπικών σποκλιέων κάτω από τις μετρήσεις σε μηδενική δέφινιση, ήταν 1,2 ng/ml.

- B. Ειδυότ ης**
Το ποσοστό διασπάρου με ης αν άδρασης, που υπολογίζεται με σκόνη ης σκόνης πωσης που σποδίδει αν αολή 50%, είναι αν άσισα η

Ένωση	Διασπάρου με ης αν άδρασης (%)
250H-βι τμίν ηD ₃	100
250H-βι τμίν ηD ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -βι τμίν ηD ₃	89*
1,25(OH) ₂ -βι τμίν ηD ₂	<0,01
βι τμίν ηD ₃	<0,03
βι τμίν ηD ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -βι τμίν ηD ₃	<0,8

* Επειδή οι σκόνης πωσης της 1,25(OH)₂-Vit.D₃ είναι σε εδόν 1000 φορές χ αμυλότερες από την 25-OH-Vit.D₃, αυτή η διασπάρου με ης αν άδραση κόπηται.

είναι αν ευσηφρής και δεν επιδρά σ' ατών τον προδιορισμό της 25-OH-Vit.D₃.

Η απόδοση του προδιορισμού δεν επηρεάζεται από την αμόλυση (ελέγχθηκαμε 5 g/L αμοφρίνη ή χολερυθρίνη αμύαλέχθηκαμε 0,25 g/L χολερυθρίνη).

Γ. Αρίβια

ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ				ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ			
Δείγμα	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)	Δείγμα	N	<X> ± T.A. (ng/ml)	Σ.Δ. (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

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

Δ. Ορότ ης

ΔΟΚΜΗ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ			
Πρωτόθετο 250H βιτ. D ₃ (ng/ml)	Μετρήσιμη σκόνη βιτ. β50H βιτ. D ₃ Συνολική (ng/ml)	Ως προς το υφλοδαίγμα (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
0	7,9	-	-
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

ΔΟΚΜΗ ΑΡΑΙΩΣΗΣ				
Δείγμα	Αραίωση	Θαφραγή σκόνη βιτ. μω η (ng/ml)	Μετρήσιμη σκόνη βιτ. μω η (ng/ml)	Ανάκτηση (%)
Ορός Α	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

- Ε. Μεσ οδίασ ης μετρήσεις της δισωφής τ ερωτ άσ βόθμου ομής και δείγματα**
Όπως φάνεται στην έπειτα αποτελέφισμα του προδιορισμού παραμένουν ορθά ακόμα και όταν διανέμονται εν οδειγμα 15 και 30 λεπτά μετά την προθήκη του βόθμου ομής σε επαρμένια ωλην άρια.

ΜΕΣ ΟΔΙΑΣΤΗΜΑ			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
δείγμα 1	9,5	9,2	10,1
δείγμα 2	36,8	33,9	36,2

XIV. ΕΣΤΕΡΙΚΟ ΠΙΣΤΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ

- Εάν τα αποτελέφισμα που λαμβάνονται για το υλικό έλεγχο ή/και το υλικό έλεγχο ουδέν βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην επάκτη που φιλνιδίου τα αποτελέφισμα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν εκτός εάν έχουν εδοθεί ικανοποιητικές ήηση για την σφωφία.
- Εάν είναι απευθυμωτό, κάθε εργασιό μπορεί να αδημοουρήφεται δικά του μείγμα δειγμάτων ελέγχου τα οποία πρέπει να διασπάρουν τα κομψυμένια σε κλάφισμα. Μην κομψυχ έπεσπονη έτεπειώ τερο από δύο οφορές.
- Τα κριτήρια σποδοχής για τη διαφωρα μετρήσεων διπλών αποτελεφισμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργασιό ακές πωκαές.

XV. ΑΜΕΝΟΕΝΣ ΤΙΜΕΣ

Η διασπορά, η φυλή, η εποχή και η ηλικία είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τα φασολογικά επίπεδα της 25OH.Vit.D₃. Όταν αμενόμενα επόμενα ανέρχονται παρακάτω δεν θα πρέπει να θεωρούνται απόλυτα. Η DIAsource αξιολόγησε τους ορούς που συλλέχθηκαν από 40 άνδρες και 39 γυναικείες υγιείς προς τις μέσες Ca, PTH και λευκοκυττάρων από τη Δυτική Ευρώπη. Το ηλικιακό εύρος των εθελοντών ήταν 17 - 58 έτη. Τα δείγματα συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των μηνών Δεκέμβριος 2010 και Ιανουάριος 2011. Ο μέσος όρος του πληθυσμού (n = 79) ήταν 12,5 ng/mL, με εύρος μεταξύ 4,1 και 28,7 ng/ml (με βάση τις εκκωασιές ανάλυσης 2,5 % έως 97,5 %).

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

Η πρόφαση βιβλιογραφία είναι κατά ακόλουθα εύρημα την πέξιν όμηση της κατάστασης της 25 OH βιταμίνης D: Έλλειψη: 0-10 ng/mL, Ανέπάρκεια 10-30 ng/mL, Επάρκεια : 30 έως 150 ng/mL, Τοξίνωση: >150 ng/mL.

XVI. ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΚΑΙ ΠΡΟΛΟΓΙΣΜΟΣ

Αφώρεια

Μόνο οι διαγνωστικές χημικές δοκιμές in vitro. Το κριτήριο περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής 60 ημέρες), μιανό ενεργειακό υλικό η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία (28 keV) και γ (35,5 keV). Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι αδύνατο να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η ακτινοβολία, φύλαξη χημική και αντιστάση ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στην ομοθεσία της χώρας του τελικού χημικού. Σε κομμάτια περιποίηση δεν πρέπει να χρησιμοποιείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Τα φασολογικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κριτήριο έχουν ελεγχθεί με μεθόδους συγκεκριμένης Ευρώπης ή/και από τον FDA και έχουν διαπιστωθεί ότι είναι ασφαλής προς την παρουσία HBsAg, αν-HCV, αν-HIV-1 και 2. Κάμια γαστική μέθοδος δεν είναι αδύνατο να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγοντα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χημικός φάσος παρασκευασμένων, δευτερευόντων ή πλάσματος θα πρέπει να αντιστοιχίσει με τον κατάλληλο κατάστημα περιποίησης.

Όλα τα ζωικά κρέατα και παράγωγα έχουν υποβληθεί σε υγιή ζώα. Τα βόειο κρέας και πρόβατο προέρχονται από χημικούς που δεν έχουν αρρωστήσει με BSE. Παρόλο που όλα τα φασολογικά που περιέχουν ζωικά κρέατα θα πρέπει να αντιστοιχίζονται ως άδυνατο να μεταδώσουν την ασθένεια.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με οποιαδήποτε χημική ουσία (χημική ουσία που είναι ισοδύναμη με την ηπατίτιδα). Το κριτήριο είναι αδύνατο να ενδέχεται να δράσει με μόλυβδο και χημικών υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίζει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα επικίνδυνα αζιδιοπλάσματα. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκκλύνεται επαναστασιακή με μεγάλη ποσότητα νερού για την πρόληψη της απόσταξης αζιδίου.

Μην κοπίζετε μην πίνετε μην πίνετε καμια χημική ουσία που κρύβει κάποιο κίνδυνο εργασίας. Μην διακινείτε με πέτρα χημική ουσία που είναι το σώμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και ανάλυση γάντια. Όλος ο χημικός φάσος που είναι ερμού υλικού θα πρέπει να συλλεχθεί και να καθαριστεί ο χημικός φάσος από χημικά απόβλητα διαλύσεως. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παρακολούθηση και τη φύλαξη των ερμού υλικών. Εξοπλισμός και γυαλί που ακευή του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να αμολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιενεργών υλικών.

Τυχόν άδυνατο ραδιενεργών υλικών πρέπει να απορριφθούν με μέσους όρους με τις οδηγίες από ραδιενεργεία. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορριφθούν με τον τρόπο που τους τοπικούς κανόνες οφείναι να συλλεχθούν ή να οδηγηθούν στον χώρο που έχει συνδικαοδοθεί στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφαλείας από ραδιενεργεία απαιτεί ειδική προστασία.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ZERWEKH J.E. (2008) **Blood biomarkers of Vitamin D status.** Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006) **Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.** J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000) **Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.** Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997) **Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.** Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006) **Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.** Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007) **Vitamin D deficiency.** N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΩ ΙΣΤΟΛΟΓΩ

	ΣΥΝΟΛΙΚΕΣ ΜΕΤΗΡΗΣΕΙΣ ml	ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ ml	ΑΙΓΜΑ (TA) ΥΛΙΚΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ml
ΕΚΧΥΛΙΣΗ			
Βάθμονομητές	-	0,1	-
Δείγματα /Υλικά έλεγχου	-	-	0,1
Ακετονιτρίλιο	-	0,5	0,5
Σπροβιλιφός Φυοκέντιση	Σπροβιλιφός για 7 δευτερόλεπτα 5 λεπτά σε 800-1500 g		
ΕΠΩΣΗ			
Υπερκείμενο σε χυλίτις	-	0,1	0,1
Βθμιακό διόλυμα	-	0,4	0,4
Επίσση	0,05	0,05	0,05
Επίσση	2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου υπό αέριση (300-700 σ.α.λ.).		
Διακρίφός	-	απόφραση	
Διαλυμαπύσις	-	2,0	
Διακρίφός	-	απόφραση	
Διαλυμαπύσις	-	2,0	
Διακρίφός	-	προσκακή απόφραση	
Μέτρηση	Μέτρηση ωληνρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP1961	Αριθμός P.I.: 1700543/el	Αρ. ανθεώρησης: 130729/1
----------------------------------	--------------------------	--------------------------



Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro poziomu 25OH-witaminy D₃ w ludzkiej surowicy i heparynizowanym osoczu.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. **Nazwa firmowa:** DIAsource 25OH-VIT.D3-RIA-CT
- B. **Numer katalogowy:** KIP1961 : 96 oznaczeń
- C. **Wyprodukowano przez:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. **Właściwości fizjologiczne 25OH-witaminy D₃**

Witamina D₃ jest potoczną nazwą cholekalcyferolu zawierającego grupę OH w pozycji 25 (25OHD₃). Ten sekosteroid jest wytwarzany w wątrobie poprzez hydroksylację w pozycji 25. cholekalcyferolu (witaminy D₃). 25OHD₃ jest prekursorem innych metabolitów witaminy D, a sama w sobie przejawia niewielką aktywność biologiczną. Najbardziej aktywną pochodną jest 1 α ,25-hydroksyvitamina D₃ wytwarzana w nerkach (lub w łożysku) w wyniku hydroksylacji 25OHD₃ w pozycji 1 α . Ten steroid, którego produkcja jest regulowana hormonalnie, nasila przyswajanie zarówno wapnia, jak i fosforu. Stymuluje również resorpcję kości oraz mineralizację, dzięki czemu zapobiega rozwojowi krzywicy, osteoporozy lub osteomalacji. Witamina D jako hormon może również wykazywać aktywność w innych tkankach odpowiedzialnych za transport wapnia (łożysko, nerki, gruczoł sutkowy i inne) oraz w gruczołach endokrynowych (komórki beta trzustki, przystarczycy i inne). 25-hydroksyvitamina D₃ jest głównym prekursorem metabolitów.

B. **Mechanizm regulacyjny**

Do wytwarzania 25-hydroksywitaminy D dochodzi głównie w wątrobie, chociaż inne tkanki (jelito, nerki) mogą wykonywać taką samą hydroksylację. Chociaż może dojść do własnego hamowania zwrotnego 25-hydroksywitaminy D w wyniku własnej produkcji, większa dostępność substratu (witaminy D₃) prowadzi do zwiększenia produkcji 25-hydroksywitaminy D i wyższych stężeń 25-hydroksywitaminy D we krwi.

C. **Zastosowania kliniczne**

To oznaczenie odgrywa rolę w rozpoznawaniu braku, niedoboru lub zatrucia witaminą D.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

Przy wykorzystaniu pierwszych kalibratorów materiały kontrolne i próbki (surowicy lub heparynizowanego osocza) są ekstrahowane z acetonitrem. Ustalona ilość 25OH-witamins D₃ oznakowanej ¹²⁵I współzawodniczy z 25OH-witaminą D₃ pochodzącą z ekstrahowanych próbek, kontroli lub kalibratorów o ustalonej liczbie miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na dolnej lub wewnętrznej powierzchni plastikowych probówek. Po dwugodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej, w wyniku aspiracji dochodzi do zatrzymania reakcji kompetytywnej. Następnie próbki są płukane przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego i zliczane w liczniku gamma.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstrukcja
Probówki opłaszczony anty-25OH-VIT.D3	2 x 48	różowy	Gotowe do zastosowania
Ag ¹²⁵ I I ¹²⁵ 25OH-Vit.D ₃	1 fiolka materiał liofiliz. 160 kBq	czerwony	Rekonstruować do razie dodając 6 buforu znacznika
CAL 0 Kalibrator 0: surowica końska/bufor fosforanowy z gentamycyną	1 fiolka materiał liofilizowany	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
CAL N Kalibratory - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) surowica końska/bufor fosforanowy z gentamycyną	5 fiolek materiał liofilizowany	żółty	Dodać 0,5 ml wody destylowanej
INC BUF Bufor inkubacyjny z zawartością azydru sodowego (<0,1%)	1 fiolka 45 ml	czarny	Gotowy do zastosowania
TRACER BUF Roztwór etanolowy z zawartością azydru sodowego (<0,1%)	1 fiolka 7 ml	czerwony	Gotowy do zastosowania
ACETONITRILE Acetonitril	1 fiolka 25 ml	czarny	Gotowy do zastosowania
WASH SOLN CONC Roztwór płuczący (TRIS HCl)	1 fiolka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne)
CONTROL N Kontrole - N = od 1 do 2 w surowicy ludzkiej z tymolem	2 fioleki materiał liofilizowany	srebrny	Dodać 0,5 ml wody destylowanej

Uwaga: W przypadku wartości powyżej najwyższego kalibratora, do rozcieńczenia próbek należy wykorzystać Kalibrator 0 przed procesem ekstrakcji.

Nie jest dostępny żaden międzynarodowy materiał referencyjny.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dozowania: 50 µl, 100 µl, 400 µl i 500 µl
3. Mieszadło wirowe
4. Mieszadło magnetyczne
5. Probówki szklane (12x75 mm) do procesu ekstrakcji.
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ¹²⁵I (minimalny uzysk 70%)
9. Wirówka działająca przy 800-1500 g

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Rekonstruować kalibratory przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- B. Kontrole:** Kontrole należy rekonstruować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.
- C. I¹²⁵ 25OH-Vit.D₃:** Rekonstruować przy pomocy 6 ml buforu znacznika.
- D. Roboczy roztwór płuczący:** Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstrukcją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstrukcji, kalibratory i kontrole zachowują stabilność przez jeden tydzień w temperaturze od 2 do 8°C. W razie konieczności dłuższego przechowywania należy przechowywać niewielkie objętości materiałów w temperaturze -20°C przez maksymalnie 3 miesiące.
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczący powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Rekonstruowany wskaźnik powinien być zamrożony po pierwszym wykorzystaniu. Wówczas zachowuje stabilność do daty ważności.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Probki surowicy i heparynizowanego osocza muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Zestaw ten jest odpowiedni w przypadku próbek surowicy i heparynizowanego osocza. Określona korelacja pomiędzy 23 próbkami surowicy i heparynizowanego osocza od tych samych pacjentów: osocze = 0,95 surowica + 1,25, R = 0,89. Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 48 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C. Po rozmrożeniu próbki surowicy i heparynizowanego osocza powinny być wymieszane (mieszadło wirowe), a następnie odwirowane.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie podanej daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

Proces ekstrakcji:

1. Oznaczyć podwójnie próbki szklane (12x75 mm) do ekstrakcji: 6 kalibratorów, 2 kontrole i do 40 próbek.
2. Dozować 100 µl każdego kalibratora, kontroli lub próbki do odpowiednich próbek.
3. Dodać 0,5 ml acetonitrilu do każdej próbki.
4. Mieszać przez 7 sekund przy pomocy mieszadła wirowego.
5. Wirować przez 5 minut w temperaturze pokojowej (800-1500 g).

Inkubacja:

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczony próbki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe próbki.
2. Dodać 100 µl supernatantu uzyskanego po ekstrakcji do odpowiednich próbek. Końcówki pipet powinny być wysyczone odpowiednim supernatantem przed dozowaniem do próbki.
3. Dozować 400 µl buforu inkubacyjnego do każdej próbki, z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczania.
4. Do każdej próbki, w tym do próbek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 50 µl 25OH-VIT.D3 oznakowanego jodem ¹²⁵.

- Inkubować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej, nieprzerwanie mieszając (300-700 RPM).
- Aspirować zawartość każdej probówki (z wyjątkiem probówek do całkowitego zliczania).
- Przepłukać probówki dwukrotnie przy pomocy 2 ml roztworu płuczącego i aspirować. W trakcie dodawania roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
- Po płukaniu należy pozostawić probówki w pozycji ku górze przez dwie minuty, a następnie aspirować pozostałe krople płynu.
- Zliczać probówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

- Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- Obliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiązania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0) zgodne z poniższym wzorem:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń(dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń(dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

- Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B₀(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia 25OH-VIT.D3 każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
- Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
- Nakładając wartości (B/B₀(%)) próbki należy określić stężenie 25OH-VIT.D3 w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
- Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego 25OH-VIT.D3 (B₀/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

25OH-Vit.D ₃	cpm	B/Bo x 100
Zliczanie całkowite	31868	-
Kalibrator		
0 ng/ml	22218	100 %
3,5 ng/ml	17967	81 %
10,6 ng/ml	13916	63 %
21,0 ng/ml	9603	43 %
62,8 ng/ml	5113	23 %
145,2 ng/ml	4107	19 %

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

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmiennie stężenie dwóch odchyłań standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 1,2 ng/ml.

B. Swoistość

Odsetki reaktywności krzyżowej uzyskane przez porównanie stężenia uzyskującego 50% hamowanie są następujące:

Składnik	Reaktywność krzyżowa (%)
25OH-Vitamin D ₃	100
25OH-Vitamin D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Vitamin ₂	<0,01
Vitamin D ₃	<0,03
Vitamin D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Vitamin ₃	<0,8

* Ponieważ stężenia 1,25(OH)₂-witaminy D₃ są praktycznie 1000 razy niższe w porównaniu do 25-OH-witaminy D₃, ta reaktywność krzyżowa jest nieznaczna i nie interferuje w tym oznaczeniu 25-OH-witaminy D₃.

Na charakterystykę kliniczną testu nie ma wpływu hemoliza (zbadano dla 5 g/l hemoglobiny) ani bilirubinemia (zbadano dla 0,25 g/l bilirubiny).

C. Precyzja

PRECYZJA W SERII

PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	99	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B		13,1 ± 1,0	7,3

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ODZYSKU			
Dodano 25OH-Vit D3 (ng/ml)	Stężenie 25OH-Vit D3 całkowite (ng/ml)	Stężenie 25OH-Vit D3 w roztworze próby ślepiej (ng/ml)	Odzysk (%)
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

BADANIE ROZCIĘNCZENIA				
Próbki	Rozcieńczenie	Stężenie teoretyczne (ng/ml)	Stężenie zmierzone (ng/ml)	Odzysk (%)
surowicy A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opuszczonych probówek minęło 15 - 30 minut.

OPÓZNIENIE			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
S 1	9,5	9,2	10,1
S 2	36,8	33,9	36,2

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. WARTOŚCI OCZEKIWANE

Zawartość składników pokarmowych, rasa, pora roku i wiek wpływają na normalne poziomy 25OH-witaminy D₃.

Przedstawionych tu wartości oczekiwanych nie należy traktować jako wartości absolutnych. DIASource oceniło próbki surowicy pobrane od 40 męczyzn i 39 kobiet zamieszkałych w zachodniej Europie, zdrowych pod kątem oznaczeń Ca, PTH i albumin. Wiek ochotników mieścił się w zakresie 17 - 58 lat. Próbkę pobierano w okresie grudnia 2010 i stycznia 2011. Średnia dla populacji wyniosła (n = 79) 12,5 ng/ml dla zakresu od 4,1 do 28,7 ng/ml. (od 2,5 % do 97,5 % percentyla).

Każde laboratorium powinno opracować własne wartości na podstawie lokalnej populacji klinicznej.

W aktualnej literaturze sugerowane są następujące zakresy klasyfikacji statusu witaminy D 25 OH: brak: 0-10 ng/ml; niedobór: 10-30 ng/ml; poziom wystarczający: 30 do 150 ng/ml; toksyczność: >150 ng/ml.

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

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

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

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ µl	KALIBRATORY µl	PRÓBKII KONTROLE µl
EKSTRAKCYJA			
Kalibratory	-	100	-
Próbki/Kontrole	-	-	100
Acetonitril	-	500	500
Mieszadło wirowe Wirowanie	Wirować przez 7 sekund 5 minut przy 800-1500 g		
INKUBACJA			
Supernatant w ekstrakcji	-	100	100
Bufor inkubacyjny	-	400	400
Znacznik izotopowy	50	50	50
Inkubacja	2 godziny w temperaturze pokojowej nieprzerwanie mieszając (300-700 RPM).		
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący	-	Aspiracja 2,0 ml	
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący	-	Aspiracja 2,0 ml	
Rozdzielenie	-	Ostrożna aspiracja	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		

Nr katalogowy DIASource KIP1961	Numer P.I. 1700543/pl	Nr aktualizacji : 130729/1
------------------------------------	--------------------------	-------------------------------

Data wydania : 2013-07-29

Наче те те це лия протокол те ди употреба

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. УСТРОЙСТВО

Радиоимноно изследване (RIA) за ко личествено измерване in vitro на съдържанието на човешки 25OH-Vit .D3 в срум и хстарино ва плизма .

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Ите новано име : DIAsource 25OH-VIT.D3-RIA-CT Kit
- B. Каталоген номер KIP1961: 96 тета
- C. Произведното : DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet 2 B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За те зниче съпомощ или поръчка :
Тел +32 (0)10 84.99.11 Факс : +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРГЛЕД

A. Фвиол ог иннафу нкия на 25OH-Витамин D₃

25-хидро ксивитамин D₃ (25OHD₃) е разго во рно тратко название на 9, 10-секо хо лста-5, 7, 10(19)-триен-3б ега 25-дио л. То зи секо сферо ид се про извежда в черния дро б чрез 25-хидро колция на хо лстацifero ла или Витамин D₃. 25OHD₃ е прекурсор на други мтаб о лити на Витамин D и притежава се о граничена био логична активност. Най -активният дериват е 1α,25- хидро ксивитамин D₃, про извеждан в б ъб реди (или плацентата) чрез 1α-хидро колция на 25OHD₃. То зи ко рмо нално регулиран сферо ид стимулира чрезната аб сорбция на калция и фо фора. То й също така стимулира минералната резорбция минерализацията на костите като по то зиначин претя тсва развитието на рахит, о се о по ро зи о се о мтаб о лития . То зи Витамин D хо рмо н ю же да б ъде активен и в други тъкани, о съдства ваш пренася него на калций (плацента, б ъб реди мена жеза и т.н.), и в ендокринните жези (б ега клетки , парагирео идните жези и т.н.). 25- хидро ксивитамин D₃ е о сно вния прекурсор за по лучаване на мтаб о литите о тгрупага на вит. D.

B. Регуляторен нивъ м

25-хидро ксивитамин D се про извежда главно в черния дро б въпреки че съдта хидро колция ю же да се извършва и в други тъкани (чрва, б ъб реди). Въпреки че ю же да има ня каква степен на регулиране чрез об рагна рязка по о тно шение стимулиране или инхибиране про изводство то на 25-хидро ксивитамин D, по-го лямо токо личество суб страг (Витамин D₃) во дидо по-го лямо ко личество на про извеждания 25-хидро ксивитамин D, както и до по-го лем ко нцентрация на циркулиращия в кръвта 25-хидро ксивитамин D.

B. Клинични при ожения

То ва изследване е о тсвствено значение при диагностика на дефицит, недо стагъчно ст или инто ксикация с Витамин D.

IV. ПРИВИДИ И МЕТОДИ

Първо се екстрахира с помощта на ацетонитрил каиб раго ризко нтро лии про б (сруми или о тхепарино ва плз м).
 Определено количество наг варен с ¹²⁵I 25ОН Витамин D₃, се конкурира с 25ОН Витамин D₃ о т екстрахираните про б, дико нтро лии каиб раго риза о пределно количество центро вена специфични антигена , илю б илизирани на до лага и вътрешнага по върхно сна пластмачо вите спрувеки .
 След двучако ва инкуб ация при стайна температура конкуренцнага реакция приключва с апирация . След то ва спрувеките се про мвае с 2 ml из мваец разтво ри се извършва б ро яче по мча на гаи б ро яч

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 т.с.в.	Цветен индикатор	Използване
Епруветки, по критерии анти-25ОН-Витамин D ₃	2 x 48	розов	Голюв за упо треб а
Ag ¹²⁵ I Нгво варен с ¹²⁵ I 25ОН-Витамин D ₃	1 флакон Лино филзирани 160 kBq	червен	Ре конституйраи се исе морлно чрез до б авя наа б ml о т т трей сярния б уфер
CAL 0 Каиб раго р0: конкуси срум /фо сфаген б уфер с гентамциин	1 флакон Лино филзирани	жълт	Добава 0,5 ml дестилирана во да
CAL N Каиб раго р- N = 1 до 5 в конкуси срум /фо сфаген б уфер с гентамциин (виж то чнигачто йно стина етикета на флакониите)	5 флакона лино филзирани	жълт	Добава 0,5 ml дестилирана во да
INC BUF Инкуб ацио на б уфер с нагрив азид (< 0,1%)	1 флакон 45 ml	черен	Голюв за упо треб а
TRACER BUF Етаноло вразтво ре нагрив азид (< 0,1%)	1 флакон 7 ml	червен	Голюв за упо треб а
ACETONITRILE Ацетонитрил	1 флакон 25 ml	черен	Голюв за упо треб а
WASH SOLN CONC Из мваец разтво р (TRIS-HCl)	1 флакон 10 ml	кафяв	Разре де 0,0x с дестилирана во да (из по лвай те мнитен апарато р)
CONTROL N Контро ли и 2 в чо вски срум стило	2 флакона лино филзирани	фобърен	Добава 0,5 ml дестилирана во да

Забелжка : За разреждане на пробите със стогойно стина над най-високието йно стина каиб раго рапреди екстракцията из по лвай те каиб раго р0.
 Няма наичен материал за международни референции .

VI. РЕЗУЛТАТИ, КОИТО НЕ СЕ ОЧЕРТАВАТ

Следните материали са наобхо димо не се очертаяват в набо ра

1. Дестилирана во да
2. Пипети от 50 µl, 100 µl, 400 µl и 500 µl
3. Завихрящ апарат
4. Мнитен апарато р
5. Стъклени епруветки (12x75 mm) за асгапа екстракция .
6. 5 ml авто мачична спринцо вка (тип Cornwall) за из мване
7. Аспирацио нна система (по изб о р)
8. Бякакъв гаи б ро ячо йтоо же да из мри упо треб но тако количество ¹²⁵I (минимален капацитет о т70%)
9. Центро фуга , работна с 800-1500 g

VII. ПРИГОТВЯНЕ И РЕЗУЛТАТИ

- A. Калибрация** : Еко нституйраи те каиб раго рите с 0,5 ml дестилирана во да
- B. Контроли** : Ре конституйраи те контро лит с 0,5 ml дестилирана во да
- B. ¹²⁵I 25ОН-В ит D₃** : Еко нституйраи те с 6 ml о т трей сярния б уфер.
- Г. Работен из мваец разтво р** : По дго твегадквачаген о б ёмо т раб о тния из мваец разтво р през до б авя наа б9 о б сдестилирана во дакъм 1 о б ё о т из мваещия разтво р (70x). Из по лвай те мнитен апарато р , за да хо мгаизираге Изхвърлеге недо треб но то количество о т раб о тния из мваец разтво р в края на дая .

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И ФОРМА ГОДИСТ И РЕЗУЛТАТИ

- Вилчки концентрати на кита са стабилни до дагата на фоканаго дно ст по со ченна опако вкатапри температура на съхранение о т 2 °C до 8 °C преди о тваря нели реко нституйране .
- След реко нституйране , каиб раго рите и контро литеса стабилни за фок о т 7 дни при температура 2-8 °C. За по дълги фок о ве на съхранение , се о пределно крагно и се съхранява при температура -20 °C за максимум 3 мача .
- Пряко приготвения б о тен из мваец разтво р трябва да б ъде из по лванъщия ден .
- Еко нституйрания т трей сяр трия б ваа б ъде заразен след първата упо треб а След то вато йо става стабилно до изтичане на фоканаго дно ст
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицираг негатабилност или него дно ст

IX. СЪХРАНЕНИЕ И ПРОБЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът и хепарино вага плз м трябва да се съхранява при температура 2-8 °C.
- То зкит е по дхо дя ща сруми про б и про б о тхепарино ва плз м . Устано вена е ко реакция мжду 23 сруми про б ии про б но т хепарино ва плз м о тняко итациенти: плз м = 0,95 срум + 1,25, R = 0,89.
- Ако татът не се направи в рамките на 48 часа , се прето рчва съхранение при температура -20 °C.
- След разреждане серумите про б ии про б ите хепарино ва плз м трябва да се осят (в завихрящия апарат), след ко его да се центро фугираг.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележи
 Не из по лвай те кита или концентратите след дагата на изтичане фоканаго дно ст Не оазвай те материали о т различни партиди кито ве Преди упо треб а свагеге вилчки реагенти на стайна температура .
 Визагено оазвай те вилчки реагенти с пробите през нежно раклащане или въртеливо размиване . За да изб егнете кръго сана контаминация , из по лвай те ивист пипетен накрайник за едно крагна упо треб а до б авя нег на вски реагент към сго твеннага про б а.
 Еко ко прадизираните пипети или авто мачичните пипети б ихапо до б рили то чно стга с го б разявай те с времето за инкуб ация
 По дго твега каиб радио накрива за во ко из мрване и не из по лвай те данни о т предишни из мрвания .

B. Фигурал

Етап на екстракция:

1. Стъклени епруветки с етикет (12x75 mm) за екстракция : б каиб раго ра 2 контро ли до 40 про б, дико твечно по 2 б ро я
2. Из пределете 100 µl о т вски каиб раго р контро лии про б ав сго твенните епруветки .
3. Към всяка епруветка до б авега 0,5 ml ацетонитрил
4. Свагеге в про дължение на 7 секунди в завихрящ апарат .
5. Центро фугираи те в про дължение на 5 минути на стайна температура (при 800-1500 g).

Етап на инкуб ация:

1. Означете две по две по критерите епруветки за вски каиб раго р контро лии про б. За о пределно не на о б шяя ро ймути , о б о значе 2 но рмални епруветки .
2. До б авега 100 µl о т по дчания супернатант след етапа екстракция в сго твенните епруветки . Накрайниците на пипетите трябва да се наклащане със сго твения супернатант преди до б авя на сго твенната епруветка .
 Из пределете 400 µl инкуб ацио на б уфер във всяка епруветка , с изключение на тези, предвидени за о пределно не на о б шяя ро ймути .

- До б авеге 50 ml трей сяр към всяка епруветка, включително към тези, предвидени за определяне на обемния процент на йодидите.
- Инкубирайте пробите за време на два часа при стабилна температура и при разбъркване (300-700 об/минута).
- Аспирирайте (или прейте) съдържанието на всяка епруветка (с изключение на тези, предвидени за определяне на обемния процент на йодидите).
- Промийте епруветките двукратно с 2 ml измивачно разтвор и аспирирайте. Избягвайте разпенването при добавяне на измивачно разтвор.
- След измиване на съветите епруветките в изправено положение за около две минути и аспирирайте отстраняващите капки течно съдържание.
- Отчетете епруветките в гами броя за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ И РЕЗУЛТАТИ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от двете епруветки.
- Изчислете свързващата радиоактивност като процент от свързаното, определено при нулевата калибрационна точка (0) от средната функция:
- Използвайте циклична сителна логаритмична или logit-log графична хартия, нанесете (B/B0(%)) стойностите за всяка калибрационна точка като функция на 25OH-D3 концентрацията на всяка калибрационна точка. Отхвърлете очевидните отклонения.

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{брой на калибрационна точка}}{\text{брой на нулева калибрационна точка}} \times 100$$

- Когато многократно аспирирани могат да бъдат получени резултати, задайте по-строга калибрационна крива. Ако коефициентът на вариация е по-голям от приемливия, се препоръчва повторна калибрационна крива.
- Функцията на интерполация на (B/B0 (%)) стойностите от пробите от пределите на 25OH-D3 концентрацията на пробите калибрационна крива.
- Процентът от свързаното в пробите, свързано при липса на нелегирани 25OH-D3 (B0/T), трябва да се определя за всяка изследвана.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са за илюстрация и никога не бива да се използват за истинската калибрационна крива.

25OH-Vit.D ₃	срм	B/B0 x 100
Общ брой	31868	-
Калибрационна точка	0 ng/ml	100 %
	3,5 ng/ml	81 %
	10,6 ng/ml	63 %
	21,0 ng/ml	43 %
	62,8 ng/ml	23 %
	145,2 ng/ml	19 %

Забележка: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И СТРАНИЦИ

A. Определените

Двадесет нулеви калибрационни точки или изпитания заедно с контролните точки от двете калибрационни точки. Определеният лимит, дефиниран като явна концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 1,2 ng/ml.

B. Специфичност

Процентната свързване, определена чрез сравнение на концентрацията на даден до 50 % инхибитор, са съответно:

Съединение	Кръвоснамаемост (%)
25OH-Витамин D ₃	100
25OH-Витамин D ₂	<0,3
1,25(OH) ₂ -Витамин D ₃	89*
1,25(OH) ₂ -Витамин D ₂	<0,01
Витамин D ₃	<0,03
Витамин D ₂	<0,03
24,25(OH) ₂ -Витамин D ₃	<0,8

* Тъй като концентрацията на 1,25(OH)₂-Вит.D₃ са практически 1000 пъти по-ниски от тези на 25-OH-Vit.D₃, тази кръвоснамаемост е

незначителна и не оказва влияние върху резултатите от това изследване на 25-OH-Vit.D₃.

Осъществяването на изпитването не се влияе от тхелоза (тествано с 5 g/L хелоза) или билирубинемия (тествано с 0,25 g/L билирубин).

V. Източност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Срм	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Срм	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	9	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B	9	13,1 ± 1,0	7,3

SD: Стандартно отклонение CV: Коэффициент на вариация

G. Точност

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ			
Добавен 25OH-Vit D3 (ng/ml)	Измерена 25OH-Vit D3 концентрация		Възстановено (%)
	Обща	Контрол	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

ТЕСТ ЗА НЕЖДАНЕ				
проба	Разреждане	Теоретична концентрация (ng/ml)	Измерена концентрация (ng/ml)	Възстановено (%)
срм А	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

D. Зкъснение

Както е показано по-долу, резултатите от тизпитването от самото чинидо при кога опробване разпределена 15 и 30 минути след като калибрационните точки биват добавени към пробата епруветка.

Зкъснение			
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
проба 1	9,5	9,2	10,1
проба 2	36,8	33,9	36,2

XIV. ВЪПРОСИ КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрол 1 и/или Контрол 2 не са в рамките на ниво, то указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани и ако не се предприемат действия за допитване.
- По желание, всяка пробна епруветка може да се направи с контролен материал от контролния пробник, който трябва да се съхранява за архивни в крайни състояния.
- Критериите за приемане на разликата от двоякните резултати на пробите трябва да се определят до приемане на пробата.

XV. ОЧАКВАНИ РЕЗУЛТАТИ

Известно е, че нормалните нива на 25OH-Vit.D₃ се влияят от хранителния режим, от тхелозата, от дишанията и от възрастта. Дадените по-долу очаквани стойности трябва да се разглеждат като абсолютни. DAsource извърши оценката с 40 мъже и 39 жени, здрави по отношение на витамин Са, РТН и абсорбция, от 3 западна Европа. Възрастта на пробите е в границите 17 - 58 години. Пробите взети в периода декември 2010 г. и януари 2011 г. Средната

сг о й но св а по пуа ця та (n = 79) б аше 12,5 ng/mL, в интервал о т 4,1 до 28,7 ng/ml (на б аз агана 2,5 % до 97,5 %-ни первантили).

Въ ка лъ о ра го рия т ря б ва да о предеи сво я о б ствен интервал , валиден за сь о твегно то агсно насение .

С по ред по седните лит ера турни данни се пред по лга ат седните интерва и за квалификация та на ста гуса на 25 ОН витамин D: дефицит: 0-10 ng/mL; недо ста гъчно сг: 10-30 ng/mL; до ста гъчно ко личество : 30 до 150 ng/mL; то качи но сг >150 ng/mL.

XVI. ИР ЕДАЗИИ МР КИ И ИР ЕНР ЕДАЗИИ

Безопасност

Само за *in vitro* диагно стика.

То зинаб о рдър жа ¹²⁵I (по лживо т: 60 дни), емитиращ й о низ ираши X (28 keV) и γ (35,5 keV) лъчения .

То з радио активен про дукт ъ же да се прена я и да се из по лва сь о от о то ризи рани лица; по купката съхранение то , упо треб ага и раз мя нага на радио активни про дукти са предпа т на за ко но даг ество тона дър жа ва га , на край ния по треб ите! То з про дукт не бива в никакъв случай да се прилага на хо ра ли живо тни

Бо равение с радио активния про дукт т ря б ва да се из върш ва в о преде на за ц ега терито рия да че о т ре зу лти з о нина преи наване . В лъ о ра го рия та т ря б ва да се по ддър жа дневник за по луване то и съхранение то на радио активни агенти . Лъ о ра го рна га кипир о ва и сгъ лрия , ко и то ъ га г да б ъ да го нга минирани с радио активни суб станции , т ря б ва да б ъ да го т де с ни с ц ел да се изб егне кръ сь о сана ко нга ми нация с различни радио из о то пи

Въ какви радио активни пръски т ря б ва да се по чист ва т неза б авно в сь о тве ствие с про ц едурите за радио аци о нна б езо па сно сг радио активните о тпа дъци т ря б ва да се из хвър я т, седвай ки агните на ред б и и рь ко во д ст ва на вла стите , упраж ня ва ш юрисдикция та, над лъ о ра го рия те При дър жа не го към о сно вните пра вила за радио аци о нна б езо па сно сг о сигу ря ва алек ва гна за щита .

Ф ва ките кръвни ко мо не ти, включени в кита, са б или т ет вуани чрез о до б рен о т Евро пей ски и/или FDA (А мри канска агенция по храните и лека р ст ва га) мо ди и са да и о три ца аген т ре зу лт ат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Ня м из в ест е н мо д , ко й то ца да ва пълна гаранция за то ва че чо ва шките кръвни дерива ти не прена я т х епа тит , СПИН или други инфекции. Ето за шь , б о равение сь о ре аг ентите , сру ми те или пла з мите про б шря б ва да б ъ де сь о тве ствие с агните про ц едур и по б езо па сно сг

Въ чки живо тински про дукти и дерива ти са б или съ б ирани о т здрави живо тни Въ лките ко мо не ти са с про из хо д ст ва ни , къ де го BSE (во лка сру ма е нц а фа о па гия) не е б ила ус га но ва ва на. Нез ави сь о о т то ва ко мо не тите, съ дър жа ш живо тински суб станции т ря б ва да се тре ти ра т ка го по та нц иал но инфекци о з ни

Из б я гвай те какъвто и да б ило ко ж ен ко нтак с ре аг ентите (съ дър жа т нагрив азид ка го ко нар вант). А зидът в то з кит ъ же да ре аг ира с о ло во то и мџ та въ в до про во д ни с та нции ка го по то з на чин се по лу ва ат сил но екс ц ливни агани азиди. По вре е на из мв ния ета п, про мий те сь с силна и о б ила ст ру я во да ка на лиз ация та, за да изб егне фо р ми рание то на азиди.

Не пу те ге , не пий те не я жте и не си св а гай те ко з мика в ра б о тна га терито рия Не пип егирай те с ус га . Из по лвай те а щит но о б лъ ко и рь ка вици за ед но кра гна упо треб а

XVII. БЕБИГРАДИИ

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.

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

XVIII. ОБЩИЕ И ИНСТРУКЦИИ

	ОБЩА АКТИВНОСТ ml	КАЛИБРАТОРИ ml	ПРОБА (И) КОНТРОЛИ ml
ИНСТРУКЦИЯ			
Каб р а го ри	-	0,1	-
Про б ъ ко нтро ли	-	-	0,1
А ц е го нитрил	-	0,5	0,5
З ави хря щ о аг ител Ц ентро фу га	О ставете в за ви хря щ о аг ител за 7 се кун ди 5 ми ну ти при 800-1500 g		
ИНКЪБАЦИЯ			
Екс тра хи ран	-	0,1	0,1
С пер на г ант	-	0,4	0,4
Инку б аци о не б ъ у ф ер	0,05	0,05	0,05
Т ре й с ъ р			
Инку б ация	2 ча са на ста й на те м пе ра ту ра при раз б ъ рк ванс (300-700 о б о ро џ ва та) .		
С е та ра ция	-		агирирай те
Из м ва ц раз тво р	-		2,0
С е та ра ция	-		агирирай те
Из м ва ц раз тво р	-		2,0
С е та ра ция	-		А гирирай те вним а тел но
Б ро е те	О т че ге ре ет ру ве гките за 60 се кун ди		

DIASource кага о г но мр : KIP1961	P.I. но мр : 1700543/bu	Но мр на ре в из ия : 130729/1
---------------------------------------	----------------------------	-----------------------------------

Дага на ре в из ия: 2013-07-29

Használat előtt olvassa el a teljes használati utasítást.

25OH-VIT.D3-RIA-CT

I. VIZSGÁLAT CÉLJA

Immunradiometriás eljárás humán szérum és heparinplazma 25OH-D₃-vitamin-tartalmának in vitro mennyiségi meghatározására.

II. ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓK

- A. **Bejegyzett név:** DIASource 25OH-Vit.D3-Ria-CT Reagenskészlet
- B. **Katalógusszám:** KIP1961 : 96 vizsgálat
- C. **Gyártó :** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Gyakorlati jellegű vagy rendeléssel kapcsolatos kérdésekkel hívja a következő számot:

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. KLINIKAI HÁTTÉR

A. A 25OH-D₃ élettani szerepe

A 25-hidroxi-D₃-vitamin (25OH-D₃) a 9,10-seco-5,7,10 (19)-kolesztatrién-3 β,25-diol hétköznapi neve. Ez a secoszteroid a májban keletkezik a kolekalciferol, más néven D₃ vitamin 25-hidroxilációja során. A 25OH-D₃ más D-vitamin anyagcsere-termékek előanyagaként szolgál, saját biológiai aktivitása csekély. Legaktívabb származéka az 1 α,25-dihidroxi-D₃ vitamin, amit a vesék (és a méhlepény) termelnek a 25OH-D₃ 1 α-hidroxilációjával. Ez a hormonális szabályozás alatt álló szteroid serkenti a kalcium és a foszfor felszívódását a tápcsatornából. Fokozza a csontok reszorpcióját és mineralizációját is, ezáltal pedig megakadályozza az angolkór kialakulását, valamint a csontlágulást és a csonttritkulást. Aktív ez a hormon hatású D-vitamin más, a kalcium szállításáért felelős szövetekben (méhlepény, vesék, tejmirigyek, stb.), és endokrin mirigyekben (béta-sejtek, mellékpajzsmirigyek, stb.) is. Ezekben a szövetekben is a 25-hidroxi-D₃ vitamin szolgál az anyagcsere-termékek egyik fő előanyagaként.

B. Szabályozó folyamatok

A 25OH-D₃ jelentős részben a májban termelődik, azonban más szövetekben (bélcsatorna, vese) is zajlik hasonló hidroxiláció. Bár lehet, hogy a 25OH-D₃ bizonyos mértékben negatív visszacsatolással hat saját termelődésére, a nagy mennyiségben rendelkezésre álló szubsztrát (D₃-vitamin) fokozza a 25OH-D₃-termelést és növeli a vérben keringő 25OH-D₃ szintjét.

C. Klinikai felhasználás

A vizsgálat D-vitamin hiány, illetve túladagolás diagnosztizálása szempontjából fontos.

IV. A MÓDSZER ELVE

Először a kalibrátorokat, kontrollokat és a mintákat (vérsavó vagy heparin vérplazma) acetonitrillel kell kezelni.

Ismert mennyiségű ¹²⁵I-dal jelölt 25OH-D3 verseng a mintában, kontrollokban vagy a kalibrátorokban található 25OH-D3-mal a csövek alsó részének belső felületére rögzített ismert mennyiségű specifikus ellenanyag kötőhelyeiért.

A csöveket két órán át szobahőmérsékleten kell inkubálni, majd a folyadékot el kell távolítani. Ekkor a kompetitív reakció leáll. A csöveket ezután át kell mosni 2 ml hígított mosóoldattal. Végül a radioaktivitás gamma-sugárzásmérővel mérhető.

V. A REAGENSZÉSZLET TARTALMA

Reagens	Mennyiség 96 mintához	Szín	Feloldás
25-hidroxi-D ₃ -vitaminnal borított csövek	2 x 48	rózsaszín	Használatra kész
Ag ¹²⁵ I	1 ampulla iofilizált 240 kBq	piros	Ideiglenesen oldja fel, 6 ml nyomjelzőizotóp-hígító puffer hozzáadásával
¹²⁵ I-dal jelölt 25-hidroxi-D ₃ -vitamin (tracer)			
CAL 0	1 ampulla iofilizált	sárga	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet
Nulla kalibrátor: lósérum/gentamicines foszfátpuffer			
CAL N	5 ampulla iofilizált	sárga	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet
Kalibrátorok (1 - 5): lósérum/gentamicines foszfátpuffer (a pontos értékeket l. az ampullák címkéin)			
INC BUF	1 ampulla 45 ml	fekete	Használatra kész
Inkubációs puffer nátrium-aziddal (<0,1%)			
TRACER BUF	1 ampulla 7 ml	piros	Használatra kész
Etanolos oldat, nátrium-aziddal (<0,1%)			
ACETONITRIL	1 ampulla 25 ml	fekete	Használatra kész
Acetonitril			
WASH SOLN CONC	1 ampulla 10 ml	barna	Hígítsa 70 x desztillált vízzel (használjon mágneses keverőt).
Mosóoldat			
CONTROL N	2 ampulla iofilizált	ezüst	Adjon hozzá 0,5 ml desztillált vizet
A kontroll 1. és 2. gentamicin tartalmú timolban			

Megjegyzés: A legnagyobb kalibrátornál magasabb 25OH-D₃-koncentrációjú mintákat az acetonitriles kezelés előtt hígítsa a nulla kalibrátorral. Nem áll rendelkezésre nemzetközi referencia anyag.

VI. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ESZKÖZÖK

A következő eszközöket a készlet nem tartalmazza, de szükségesek a vizsgálat elvégzéséhez:

- Desztillált víz
- Pipetták: 50 µl, 100 µl, 400 µl és 500 µl beméréséhez.
- Vortex
- Mágneses keverő
- Üveg kémcsövek (12x75 mm) az acetonitriles kivonáshoz.
- 5 ml automata fecskendő (Cornwall) a mosáshoz
- Vízlégszivattyú és mosókészülék
- Bármely, ¹²⁵I mérésére alkalmas gamma-sugárzásmérő (minimális hozam 70%).
- Centrifuga (800-1500 g)

VII. REAGENSEK ELŐKÉSZÍTÉSE

- Kalibrátorok:** Oldja fel a kalibrátorokat 0,5 ml desztillált vízben
- Kontrollok** Oldja fel a kontrollokat 0,5 ml desztillált vízben.
- ¹²⁵I-25OH-D₃:** Oldja fel 6 ml nyomjelzőizotóp-hígító pufferben.
- Hígított mosóoldat:** Készítsen megfelelő mennyiségű hígított mosóoldatot úgy, hogy 69 rész desztillált vízhez 1 rész mosóoldatot (70x) kever. Homogenizálja mágneses keverő segítségével. A napi vizsgálatok végeztével öntse ki a megmaradt hígított mosóoldatot.

VIII. A REAGENSEK TÁROLÁSA ÉS ELTARTHATÓSÁGA

- Felnyitás és feloldás nélkül a reagens 2-8°C-on tárolva a címkén feltüntetett időpontig eltartható.
- Újraoldás után a kalibrátorok és kontrollok egy hétig stabilak +2 °C és +8 °C között. Ha tovább tárolandó, akkor szét kell osztani, majd legfeljebb 3 hónapig -20 °C-on kell tárolni.
- A frissen készült hígított mosóoldatot még aznap fel kell használni.
- A feloldott tracer az első használat után fagyassza le. Ezután a lejárat idejéig eltartható.
- A reagens fizikai tulajdonságainak megváltozása valószínűleg azt jelzi, hogy megromlottak.

IX. MINTAVÉTEL ÉS ELŐKÉSZÍTÉS

- A szérum- és heparinplazmamintákat +2 °C és +8 °C közötti hőmérsékleten kell tárolni.
- Ez a kit mind szérum-, mind heparinplazmaminták esetében alkalmazható. A korreláció kialakítására az ugyanazoktól a betegekől származó 23 szérum- és heparinplazmaminta között került sor: plazma = 0,95 szérum + 1,25, R = 0,89.
- Amennyiben nem végzi el a vizsgálatot 48 órán belül, ajánlott a mintákat -20°C-on tárolni.
- A vérsavó vagy heparin vérplazma mintákat felolvasztás után keverje meg (vortex), majd centrifugálja le.

X. ELJÁRÁS

A. Tudnivalók

Ne használja a reagenset a lejárat idejükön túl. Ne keverjen össze eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat. Használat előtt várja meg, amíg a reagens szobahőmérsékletre melegednek. A reagenset és a mintákat homogenizálja alaposan óvatos mozgattal vagy keveréssel. Minden reagens és minta beméréséhez használjon tiszta eldobható pipettahegyet, hogy elkerülje az anyagok beszennyezését. Nagypontosságú pipetták, vagy automata pipettázó készülék használata javítja a vizsgálat pontosságát. Tartsa be a megadott inkubációs időket. Minden vizsgálatához készítsen új kalibrációs görbét, ne használja korábbi mérések adatait.

B. A vizsgálat menete

Kivonás

- Feliratozzon 12x75 mm-es üveg kémcsöveket a kivonási lépéshez 6 kalibrátor, 2 kontroll és legfeljebb 40 minta számára, duplikátban.
- Mérjen 100 µl-t a kalibrátorokból, kontrollokból és mintákból a megfelelő csövekbe.
- Mérjen minden csöbe 0,5 ml acetonitrilt.
- Keverje a csövek tartalmát vortex segítségével 7 másodpercig.
- Centrifugálja a csöveket 5 percig szobahőmérsékleten 800-1500 g-vel.

Inkubációs lépés

- Feliratozzon 2-2 reagenssel borított csövet a kalibrátorok, a minták és a kontrollok számára. A teljes radioaktivitás méréséhez használjon 2 reagens nélküli csövet (totálok).
- Mérjen 100 µl-t a kivonás során keletkezett felülúszókból a megfelelő csövekbe. Bemérés előtt szívja tele a pipettahegyet az adott felülúszóval.
- Mérjen 400 µl inkubációs puffert a csövekbe (a totálokat kivéve).
- Mérjen 50 µl tracer minden csöbe (a totálokba is).
- Inkubálja a csöveket szobahőmérsékleten 2 órán át, (300 - 700 fordulat/percen történő) keverés mellett.
- Szívja le a csövek tartalmát (kivéve a totálokat).
- Mossa a csöveket kétszer 2 ml hígított mosóoldattal, majd távolítsa el a folyadékot. Vigyázzon, hogy a mosóoldat beméréskor ne habosodjon.
- Az mosás után hagyja állni a csöveket 2 percig, majd távolítsa el a megmaradt folyadékcséppet.
- Mérje a radioaktivitást gamma-sugárzásmérővel 60 másodpercig.

XI. EREDMÉNYEK KISZÁMÍTÁSA

1. Számolja ki a párhuzamos mérések átlagát.
2. Számítsa ki a megkötött radioaktivitás százalékos értékét a nulla kalibrátorra kapott eredmény felhasználásával az alábbi képlet alapján:

$$B/B_0 \% = [\text{kontroll vagy minta cpm} / B_0 (\text{nulla kalibrátor}) \text{ cpm}] \times 100$$

3. Féllogaritmikus vagy logit-log milliméterpapíron ábrázolja a kalibrátorok B/B₀(%) értékeit a hozzájuk tartozó 25OH-D₃ koncentrációk függvényében. Hagyja figyelmen kívül a nyilvánvalóan kieső értékeket.
4. Számítógép segítségével is felrajzolható a kalibrációs görbe. Ez esetben használjon 4-paraméteres logisztikus görbeillesztést.
5. A kalibrációs görbe alapján határozza meg a minták 25OH-D₃-koncentrációját B/B₀(%) értékek interpolációjával.
6. Minden vizsgálat során határozza meg a jelöletlen 25OH-D₃ nélküli bekötődő tracer százalékos mennyiségét (B₀/T).

XII. JELLEMZŐ MÉRÉSI EREDMÉNYEK tot hier

A következő adatok csak példaként szolgálnak, soha ne használja őket a valós idejű kalibráció helyett.

25OH-Vit.D ₃	cpm	B/Bo x 100
Teljes radioaktivitás	31868	-
Kalibrátor		
0 ng/ml	22218	100 %
3.5 ng/ml	17967	81 %
10.6 ng/ml	13916	63 %
21.0 ng/ml	9603	43 %
62.8 ng/ml	5113	23 %
145.2 ng/ml	4107	19 %

Megjegyzés: 1 ng/ml = 2,5 pmol/ml

XIII. A VIZSGÁLAT JELLEMZŐI ÉS KORLATAI

A. A kimutathatóság alsó határa

Húsz nulla kalibrátort vizsgáltak meg más kalibrátorokkal együtt. A kimutathatóság alsó határa 1,2 ng/ml-nek bizonyult, ami a nulla kalibrátor cpm értékeinek átlagából számolható ki a standard deviáció kétszeresének levonásával.

B. Specificitás

A keresztreakció százalékos értékei különböző vegyületek 50%-os gátlást okozó koncentrációi alapján számolva:

Vegyület	Keresztreaktivitás (%)
25OH- D ₃ -vitamin	100
25OH- D ₂ -vitamin	<0.3
1,25(OH) ₂ -D ₃ -vitamin	89*
1,25(OH) ₂ -D ₂ -vitamin	<0.01
D ₃ -vitamin	<0.03
D ₂ -vitamin	<0.03
24,25(OH) ₂ - D ₃ -vitamin	<0.8

* Mivel a 1,25(OH)₂-D₃-vitamin koncentrációja tulajdonképpen 1000-szer alacsonyabb, mint a 25OH-D₃-é, a keresztreaktivitás nem jelentős, és nem befolyásolja a 25OH-D₃-vizsgálat eredményét.

A vizsgálat teljesítményét nem befolyásolja a hemolízis (5 g/l hemoglobin bevizsgálása mellett), illetve a bilirubinaemia (0,25 g/l bilirubin bevizsgálása mellett).

C. Reprodukálhatóság

VIZSGÁLATON BELÜLI				VIZSGÁLATOK KÖZÖTTI			
Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)	Savó	N	<X> ± SD (ng/ml)	CV (%)
A	49	19,1 ± 1,4	7,2	A	99	6,7 ± 0,5	7,2
B	43	10,4 ± 0,9	8,7	B		13,1 ± 1,0	7,3

SD: standard deviáció; CV: variációs koefficiens

D. Pontosság

VISSZANYERÉSI TESZT			
Hozzáadott 25OH-Vit D ₃ (ng/ml)	Mért koncentráció 25OH-Vit D ₃		Visszanyerés (%)
	Összes (ng/ml)	Vak (ng/ml)	
0	7,9		
8,9	17,6	9,7	109%
26,8	33,8	25,9	97%
38,6	48,6	40,7	105%

HÍGÍTÁSI VIZSGÁLAT				
Minta	Hígítás	Elméleti koncentráció (ng/ml)	Mért koncentráció (ng/ml)	Visszanyerés (%)
szérum A	1/1	-	42,5	-
	1/2	21,3	20,9	98,4%
	1/4	10,6	11,2	105,4%
	1/8	5,3	5,7	107,3%
	1/16	2,7	2,6	97,9%
	1/32	1,3	1,3	97,9%

E. Az utolsó kalibrátor és a minták bemérése között eltelt idő

Ahogy ezt az alábbi adatok is mutatják, a vizsgálat eredményeit nem befolyásolja, ha egy minta bemérése akár 15 - 30 perccel az utolsó kalibrátor után történik.

	ELTELT IDŐ		
	0' (ng/ml)	15' (ng/ml)	30' (ng/ml)
1. minta	9.5	9.2	10.1
2. minta	36.8	33.9	36.2

XIV. BELSŐ MINŐSÉGELLENŐRZÉS

- Ha a kontroll 1-re és/vagy 2-re kapott eredmények kívül esnek az ampullák címkéin feltüntetett tartományon, a vizsgálat eredményei nem használhatók fel, kivéve, ha ismert az eltérés pontos oka.
- Igény esetén bármely laboratórium készíthet egy saját, kontrollként szolgáló savópoolt, amit azután szétosztva, lefagyaszta kell tárolni.
- A párhuzamos vizsgálatok eredményei közötti eltérés elfogadható mértékét a GLP (Good Laboratory Practises) alapján kell meghatározni.

XV. VÁRHATÓ ÉRTÉKEK

A táplálkozási szokások, a rassz, az évszakok és az életkor is befolyásolják a 25-hidroxi-D₃-vitamin szintjét.

A továbbiakban közölt várható értékeket nem kell abszolút értékeknek tekinteni. A DIAsource kiértékelte a 40 férfitől és 39 nőtől vett mintát, akik a Ca-, PTH-, illetve albuminértékeik szerint egészségesek, és akik Nyugat-Európából származnak. Az önkéntesen résztvevők kora a 17 és 58 év közötti tartományba esett. A mintákat 2010 decembere és 2011 januárja között gyűjtötték. Az egész populáció esetében az átlag (n = 79) 12,5 ng/ml volt, a tartomány pedig 4,1-től 28,7 ng/ml-ig terjedt (a 2,5%-tól 97,5%-ig terjedő értékek alapján). Minden laboratórium alakítsa ki saját tartományát, a helyi populáció alapján.

Az újabb szakirodalom a következő tartományokat javasolja a 25 OH D-vitamin szempontjából állapot besorolására: Vitaminhiány: 0-10 ng/ml; vitaminhiány: 10-30 ng/ml; elegendő vitaminmennyiség: 30-150 ng/ml; vitamintoxicitás: >150 ng/ml.

XVI. MUNKAVÉDELEM

Biztonsági előírások

Csak in vitro diagnosztikai felhasználásra.

A kit röntgen (28 keV) és gamma (35,5 keV) sugárzó ¹²⁵I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására,

használatára, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagens alkalmazása embereken és állatokon is minden körülmények között tilos.

A készlet emberi vérből készült reagensait európai szabványok szerinti és/vagy az FDA által minősített módszerrel HBsAg-tól, valamint anti-HCV, és anti-HIV-1 és 2 ellenanyagoktól mentesnek találták. Azonban egyetlen ma ismert módszer alapján sem állítható biztosan, hogy az emberi vérből készült anyagok nem okozhatnak hepatitiszt, AIDS-et vagy más fertőző betegséget. Ezért minden ilyen reagenst és minden savó-, illetve plazmamintát a fertőző anyagokra vonatkozó helyi biztonsági előírásoknak megfelelően kell kezelni.

Minden állati eredetű reagens és termék egészséges állatokból származik. A szarvasmarha eredetű reagens olyan országokból származnak, ahonnan eddig nem jelentettek BSE esetet. Ennek ellenére minden állati eredetű anyagot tartalmazó reagenst potenciálisan fertőzésveszélyesként kell kezelni.

Vigyázzon, hogy a reagens bőrre ne kerüljenek (tartósítószer: nátrium-azid). A reagensben található nátrium-azid robbanásveszélyes fém-azidokat képezhet ólom és réz csővezetékek anyagával. A csövek mosásakor nagy mennyiségű vízzel együtt öntse ki ezeket az anyagokat, hogy megelőzze az azid felgyülemelését.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt. Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközöket és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetnek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotópokkal történő keresztszennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárfertőzéstől.

XVIII. AZ ELJÁRÁS ÖSSZEFOGLALÁSA

	Totállok ml	Kalibrátorok ml	Minták, kontrollok ml
KIVONÁS			
Kalibrátorok	-	0,1	-
Minták, kontrollok	-	-	0,1
Acetonitril	-	0,5	0,5
Vortex Centrifugálás	Keverje 7 másodperig 5 percig 800-1500 g-vel		
INKUBÁCIÓ			
Felülűsző	-	0,1	0,1
Inkubációs puffer	-	0,4	0,4
Tracer	0,05	0,05	0,05
Inkubáció	2 órán át szobahőmérsékleten, (300 - 700 fordulat/percen történő) keverés mellett.		
Folyadék eltávolítása Mosóoldat	Leszívás 2,0		
Folyadék eltávolítása Mosóoldat	Leszívás 2,0		
Folyadék eltávolítása	Óvatos leszívás		
Mérés	Radioaktivitás mérése 60 másodpercig		

XVII. IRODALOM

- ZERWEKH J.E. (2008)
Blood biomarkers of Vitamin D status.
Am. J. Clin. Nutr., 87(suppl):1087S-91S.
- HOLICK M.F. (2006)
Resurrection of Vitamin D deficiency and rickets.
J. Clin. Invest., 116:2062-2072.
- HEANEY R.P. (2000)
Vitamin D: how much do we need, and how much is too much.
Osteoporos. Int., 11:553-555.
- DAWSON-HUGHES B., HEANEY R.P., HOLICK M.F., LIPS P., MEUNIER P.J. (1997)
Prevalence of Vitamin D insufficiency in an adult normal population.
Osteoporos. Int., 7:439-443.
- BISCHOFF-FERRARI H.A., GIOVANNUCCI E., WILLETT W.C., DIETRICH T., DAWSON-HUGHES B. (2006)
Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes.
Am. J. Clin. Nutr., 84:18-28.
- HOLICK M.F. (2007)
Vitamin D deficiency.
N. Engl. J. Med., 357:266-281.

DIASource Katalógusszám : KIP1961	P.I. Szám : 1700543/hu	Verziószám : 130729/1
--------------------------------------	---------------------------	--------------------------

Frissítés időpontja : 2013-07-29

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
I V D	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
UJT	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

For Information/Research Purposes Only

	Symboles utilisés
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
IV D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
MLU	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification
DIST	Distributeur
TRAY	Plaque d'incubation
PMSF	Solution PMSF
	Conserver à l'abri de la lumière
STRIP	Bandelette de dots
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Tampon d'extraction concentré
CART	Cartouche
SAV HRP	Streptavidine-peroxydase de raifort
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Tampon de lavage

	Gebruikte symbolen
	Raadpleeg de gebruiksaanwijzing
	Bewaartemperatuur
	Houdbaar tot
LOT	Lotnummer
REF	Catalogusnummer
CONTROL	Controle
I V D	Medisch hulpmiddel voor in-vitro diagnostiek
	Fabrikant
	Inhoud voldoende voor <n> testen
WASH SOLN CONC	Wasoplossing, geconcentreerd
CAL 0	Nulkalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Controle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer geconcentreerd
Ab 125I CONC	Tracer geconcentreerd
	Buisjes
INC BUF	Incubatiebuffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Verdunningsbuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Kalibratorverdunner
REC SOLN	Reconstitutieoplossing
PEG	Polyethyleen glycol
EXTR SOLN	Extractieoplossing
ELU SOLN	Elutieoplossing
GEL	Bond Elut Silica kolom
PRE SOLN	Pre-behandelingsoplossing
NEUTR SOLN	Neutralisatieoplossing
TRACEUR BUF	Tracerbuffer
U U	Microtiterplaat
Ab HRP	HRP Conjugaat
Ag HRP	HRP Conjugaat
Ab HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
Ag HRP CONC	HRP Conjugaat geconcentreerd
CONJ BUF	Conjugaat buffer
CHROM TMB CONC	Chromogene TMB geconcentreerd
CHROM TMB	Chromogene Oplossing TMB
SUB BUF	Substraatbuffer
STOP SOLN	Stopoplossing
INC SER	Incubatieserum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugaat
SUB PNPP	Substraat PNPP
BIOT CONJ CONC	Geconcentreerd Biotine conjugaat
AVID HRP CONC	Geconcentreerd Avidine-HRP conjugaat
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotine conjugaat
Ab	Specifiek antilichaam
SAV HRP CONC	Streptavidine-HRP concentraat
NSB	Aspecifieke binding
2nd Ab	2de antilichaam
ACID BUF	Verzurringsbuffer
DIST	Distributeur
TRAY	Incubatievlotje
PMSF	PMSF oplossing
	Beschermen tegen licht
STRIP	Strip met dots
SUB	Substraat
EXTR SOLN CONC	Extractiebuffer concentraat
CART	Cassette
SAV HRP	Streptavidine - HRP
PIPETTE	Pipet
WASH SOLN	Wasbuffer

	Benutzte Symbole
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
IV D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
µL	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer
DIST	Vertreiber
TRAY	Inkubationsschale
PMSF	PMSF Lösung
	Vor Licht schützen
STRIP	Tüpfelstreifen
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Konzentrat Extraktionspuffer
CART	Kassette
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipet
WASH SOLN	Waschpuffer

For Information/Research Purposes Only

	Simboli utilizzati
	Consultare le istruzioni per l'uso
	Limitazioni di temperatura
	Utilizzare entro
LOT	Numero di lotto
REF	Numero di catalogo
CONTROL	Controllo
IV D	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Fabbricante
	Contenuto sufficiente per <n> saggi
WASH SOLN CONC	Tampone di lavaggio concentrato
CAL 0	Calibratore zero
CAL N	Standard #
CONTROL N	Controllo #
Ag 125I	Marcato
Ab 125I	Marcato
Ag 125I CONC	Marcato concentrato
Ab 125I CONC	Marcato concentrato
	Provette
INC BUF	Tampone incubazione
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Siero
DIL SPE	Diluyente campione
DIL BUF	Tampone diluizione
ANTISERUM	Antisiero
IMMUNOADSORBENT	Immunoassorbente
DIL CAL	Diluyente calibratore
REC SOLN	Soluzione di ricostituzione
PEG	Polietilenglicole
EXTR SOLN	Soluzione di estrazione
ELU SOLN	Soluzione di eluzione
GEL	Cartucce di silice bond elut
PRE SOLN	Soluzione di pretrattamento
NEUTR SOLN	Soluzione di neutralizzazione
TRACEUR BUF	Tracer Buffer
ULI	Piastra di microtitolazione
Ab HRP	HRP Coniugato
Ag HRP	HRP Coniugato
Ab HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
Ag HRP CONC	HRP Coniugato concentrato
CONJ BUF	Buffer coniugato
CHROM TMB CONC	Cromogena TMB concentrato
CHROM TMB	Soluzione cromogena TMB
SUB BUF	Tampone substrato
STOP SOLN	Soluzione di arresto
INC SER	Incubazione con siero
BUF	Buffer
Ab AP	AP Coniugato
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrato coniugato con biotina
AVID HRP CONC	Concentrato avidina HRP
ASS BUF	Soluzione tampone per test
Ab BIOT	Coniugato con biotina
Ab	Anticorpo Specifico
SAV HRP CONC	Streptavidina-HRP concentrata
NSB	Legame non-specifico
2nd Ab	2° Anticorpo
ACID BUF	Tampone Acidificante
DIST	Distributore
TRAY	Vassoi di incubazione
PMSF	Soluzione di PMSF
	Proteggere dalla luce
STRIP	Dot strip
SUB	Substrato
EXTR SOLN CONC	Concentrato del tampone di estrazione
CART	Cartuccia
SAV HRP	HRP coniugata a streptavidina
PIPETTE	Pipetta
WASH SOLN	Tampone di lavaggio

	Símbolos utilizados
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
IV D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
ULI	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógena TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógena TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Tries Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado

For Informational/Research Purposes Only

	Símbolos utilizados
	Consulte instruções de utilização
	Temperatura de conservação
	Utilizar antes de
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Controlo
IVD	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Conteúdo suficiente para <n> testes
WASH SOLN CONC	Solução de lavagem concentrada
CAL 0	Calibrador zero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Controlo #
Ag 125I	Marcador
Ab 125I	Marcador
Ag 125I CONC	Marcador concentrada
Ab 125I CONC	Marcador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampão de incubação
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Soro
DIL SPE	Diluidor de espécimes
DIL BUF	Tampão de diluição
ANTISERUM	Anti-soro
IMMUNOADSORBENT	Imunoadsorvente
DIL CAL	Diluyente do calibrador
REC SOLN	Solução de Reconstituição
PEG	Poliétileno-glicol
EXTR SOLN	Solução de Extração
ELU SOLN	Solução de Elução
GEL	Cartuchos de sílica Bond Elut
PRE SOLN	Solução de pré-tratamento
NEUTR SOLN	Solução de neutralização
TRACEUR BUF	Tampão Marcador
UJ	Placa de micro titulação
Ab HRP	HRP Conjugação
Ag HRP	HRP Conjugação
Ab HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugação concentrada
CONJ BUF	Conjuge o tampão
CHROM TMB CONC	Cromogénica TMB concentrada
CHROM TMB	Solução Cromogénica TMB
SUB BUF	Tampão de substrato
STOP SOLN	Solução de Paragem
INC SER	Soro de incubação
BUF	Tampão
Ab AP	AP Conjugação
SUB PNPP	Substrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado conjugado de biotina
AVID HRP CONC	Concentrado HRP de avidina
ASS BUF	Tampão de ensaio
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticorpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina HRP concentrado
NSB	Ligações não específicas
2nd Ab	Anticorpo secundário
ACID BUF	Tampão de acidificação
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandeja de incubação
PMSF	Solução PMSF
	Proteger da luz
STRIP	Tira " Dot"
SUB	Substrato
EXTR SOLN CONC	Tampão de extração concentrado
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampão de lavagem

For Information/Research Purposes Only

	Χρησιμοποιούμενα σύμβολα
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
IVD	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 125I	Ιζηθέτης
Ab 125I	Ιζηθέτης
Ag 125I CONC	Χρωμογόνος Ιζηθέτης
Ab 125I CONC	Χρωμογόνος Ιζηθέτης
	Σωληνάρια
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλουσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
μπλ	Πλάκα μικροτιλοδότησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεζευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα όξινο
DIST	Διανομέας
TRAY	Δίσκοι επώασης
PMSF	Διάλυμα PMSF
	Προστατεύετε από το φως
STRIP	Ταινία κουκκίδων
SUB	Υπόστρωμα
EXTR SOLN CONC	Συμπυκνωμένο ρυθμ. διαλύματος εκχύλισης
CART	Φύσιγγα
SAV HRP	Στρεπταβιδίνη HRP
PIPETTE	πιπέτα
WASH SOLN	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης

	Używane symbole
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją
	Temperatura przechowywania
	Zużyć przed
LOT	Kod serii
REF	Numer katalogowy
CONTROL	Kontrola
IVD	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro
	Producent
	Zawartość wystarczająca do <n> testów
WASH SOLN CONC	Roztwór płuczący stężony
CAL 0	Kalibrator zerowy
CAL N	Kalibrator nr
CONTROL N	Kontrola nr
Ag 125I	Znacznik izotopowy
Ab 125I	Znacznik izotopowy
Ag 125I CONC	Znacznik izotopowy stężony
Ab 125I CONC	Znacznik izotopowy stężony
	Probówki
INC BUF	Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE	Acetonitryl
SERUM	Surowica
DIL SPE	Rozcieńczalnik próbki
DIL BUF	Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM	Antysurowica
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent
DIL CAL	Rozcieńczalnik kalibratora
REC SOLN	Roztwór do rozcieńczania
PEG	Glikol poli(oksy)etylenowy
EXTR SOLN	Roztwór ekstrakcyjny
ELU SOLN	Roztwór elucyjny
GEL	Kolumny krzemionkowe Bond Elut
PRE SOLN	Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR SOLN	Roztwór neutralizujący
TRACEUR BUF	Bufor znacznika
ULF	mikropłytki
Ab HRP	Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag HRP	Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab HRP CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag HRP CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ BUF	Bufor do koniugacji
CHROM TMB CONC	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
CHROM TMB	Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
SUB BUF	Bufor substratu
STOP SOLN	Roztwór zatrzymujący reakcję
INC SER	Wymagana inkubacja surowicy
BUF	Bufor
Ab AP	Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB PNPP	p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT CONJ CONC	Koncentrat koniugatu biotyny
AVID HRP CONC	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS BUF	Bufor do oznaczania
Ab BIOT	Koniugatu biotyny
Ab	Przeciwciało swoiste
SAV HRP CONC	Koncentrat streptawidyny HRP
NSB	Wiązanie nieswoiste
2nd Ab	Drugie przeciwciało
ACID BUF	Bufor zakwaszający
DIST	Dystrybutor
TRAY	Tacki do inkubacji
PMSF	Roztwór fluorku fenylometylosulfonilu (PMSF - z ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)
	Chronić przed światłem
STRIP	Pasek testowy z antygenami - „Dot Strip”
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Stężony bufor do ekstrakcji
CART	Kaseta
SAV HRP	Streptawidyna sprzężona z peroksydazą chrzanową (HRP - z ang. horseradish peroxidase)
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Bufor do płukania

	Използвани символи
	Вижте инструкцията за работа
	Температура на съхранение
	Използвайте с
LOT	Партиден код
REF	Каталожен номер
CONTROL	Контрол
IVD	Ин витро диагностично медицинско изделие
	Производител
	Съдържание достатъчно за <n> теста
WASH SOLN CONC	Концентриран измиващ разтвор
CAL 0	Нулев калибратор
CAL N	Калибратор #
CONTROL N	Контрол #
Ag 125I	Трейсьр
Ab 125I	Трейсьр
Ag 125I CONC	Концентриран маркер
Ab 125I CONC	Концентриран маркер
	Епруветки
INC BUF	Инкубационен буфер
ACETONITRILE	Ацетонитрил
SERUM	Серум
DIL SPE	Разредител за пробите
DIL BUF	Буфер за разреждане
ANTISERUM	Антисерум
IMMUNOABSORBENT	Имуноабсорбент
DIL CAL	Разредител за калибратора
REC SOLN	Пресъздаващ разтвор
PEG	Полиетилен гликол
EXTR SOLN	Екстрактов разтвор
ELU SOLN	Разтвор за елюиране
GEL	Силикагелни пълнители
PRE SOLN	Пред-лечебен разтвор
NEUTR SOLN	Неутрализиращ разтвор
TRACEUR BUF	Маркерен буфер
MLI	Микротитърна пластина
Ab HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ag HRP	HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза
Ab HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
Ag HRP CONC	HRP конюгиран концентрат
CONJ BUF	Буфер за конюгата
CHROM TMB CONC	Хромогенен ТМВ концентрат
CHROM TMB	Хромогенен ТМВ разтвор
SUB BUF	Субстратен буфер
STOP SOLN	Стоп разтвор
INC SER	Инкубационен серум
BUF	Буфер
Ab AP	AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза
SUB PNPP	Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат
BIOT CONJ CONC	Биотин конюгиран концентрат
AVID HRP CONC	Авидин HRP концентрат
ASS BUF	Буфер за пробите
Ab BIOT	Биотин конюгат
Ab	специфично анти тяло
SAV HRP CONC	стрептавидин HRP концентрат
NSB	не специфично свързване
2nd Ab	второ анти тяло
ACID BUF	киселинизиращ буфер
DIST	Дистрибутор
TRAY	Панички за инкубация
PMSF	Разтвор на ФМСФ
	Да се пази от светлина
STRIP	Тест лента с маркерни точки
SUB	Субстрат
EXTR SOLN CONC	Концентриран екстрактов разтвор
CART	Касета
SAV HRP	Стрептавидин HRP
PIPETTE	Пипети
WASH SOLN	Измиващ разтвор

	Használt szimbólumok
	Olvassa el a használati útmutatót
	Tárolási hőmérséklet
	Lejáratási idő
LOT	Gyártási kód
REF	Katalógus szám
CONTROL	Kontrol
IVD	In vitro diagnosztikai eszköz
	Gyártó
	Tartalma <n> teszt elvégzésére elegendő
WASH SOLN CONC	Mosó folyadék koncentrátum
CAL 0	Zero kalibrátor
CAL N	Kalibrátor #
CONTROL N	Kontrol #
Ag 125I	Nyomjelző izotóp
Ab 125I	Nyomjelző izotóp
Ag 125I CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum
Ab 125I CONC	Nyomjelző izotóp koncentrátum
	Csővek
INC BUF	Inkubáló puffer
ACETONITRILE	Acetonitril
SERUM	Szérum
DIL SPE	Mintahígító
DIL BUF	Hígító puffer
ANTISERUM	Antiszérum
IMMUNOADSORBENT	Immunadszorbens
DIL CAL	Kalibrátor hígító
REC SOLN	Mintaelőkészítő oldat
PEG	Polietylén glikol
EXTR SOLN	Extrakciós oldat
ELU SOLN	Eluáló oldat
GEL	Bond Elut Silica szilikagél patronok
PRE SOLN	Előkezelő oldat
NEUTR SOLN	Semlegesítő oldat
TRACEUR BUF	Nyomjelző izotóp hígító puffer
ML	Mikrotiter lemez
Ab HRP	HRP konjugátum
Ag HRP	HRP konjugátum
Ab HRP CONC	HRP konjugátum koncentrátum
Ag HRP CONC	HRP konjugátum koncentrátum
CONJ BUF	Konjugátum puffer
CHROM TMB CONC	Kromogén TMB koncentrátum
CHROM TMB	Kromogén TMB oldat
SUB BUF	Szubsztrát puffer
STOP SOLN	Stop oldat
INC SER	Inkubációs szérum
BUF	Puffer
Ab AP	AP konjugátum
SUB PNPP	Szubsztrát PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin konjugátum koncentrátum
AVID HRP CONC	Avidin HRP koncentrátum
ASS BUF	Vizsgáló puffer
Ab BIOT	Biotin konjugátum
Ab	Specifikus ellenanyag
SAV HRP CONC	Sztreptavidin HRP koncentrátum
NSB	Nem-specifikus kötődés
2nd Ab	Másodlagos ellenanyag
ACID BUF	Savas puffer
DIST	Elosztó
TRAY	Inkubációs tálcák
PMSF	PMSF-oldat
	Fénytől védendő
STRIP	Pontcsík
SUB	Szubsztrát
EXTR SOLN CONC	Extrakciós puffer-koncentrátum
CART	Kazetta
SAV HRP	Sztreptavidin torna peroxidáz (HRP)
PIPETTE	Pipetta
WASH SOLN	Mosópuffer