

# 1,25-Dihydroxyvitamin D

<sup>125</sup>I RIA Kit

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

## **Instruction Manual**

Manuel d'Instructions

Testanleitung

Manual de Instrucciones

Manuale di Istruzioni

Bruksanvisning

**REF: 65100E**

**DiaSorin**

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

**TABLE OF CONTENTS**

English .....	Page 1
Français .....	17
Deutsch .....	35
Español .....	53
Italiano.....	71
Svenska .....	88

## 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D <sup>125</sup>I RIA KIT

### 1. INTENDED USE

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

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

### 2. SUMMARY AND EXPLANATION

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

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

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

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

### 3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D assay consists of a two-step procedure. The assay involves a preliminary extraction and subsequent purification of vitamin D metabolites from serum or EDTA plasma using C<sub>18</sub>OH cartridges.<sup>10</sup> Following extraction, the treated sample is then assayed using a competitive RIA procedure. The RIA method is based on a polyclonal antibody that is specific for both 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> and 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. The sample, antibody and tracer are incubated for 2 hours at 20-25°C. Phase separation is accomplished after a 20 minute incubation at 20-25°C with a second antibody precipitating complex. After centrifugation and decantation, the bound fraction remaining in the pellet is counted in a gamma counter. Values are calculated directly from a calibrator curve of known concentrations. The final concentration of the 1,25-(OH)<sub>2</sub>D in serum and EDTA plasma samples is expressed as pg/mL.

#### 4. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT

1,25-(OH) <sub>2</sub> D NSB BUFFER	1 vial / 3 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D CALBRATOR O	1 vial / 20 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> CALIBRATOR 1-5	5 vials / 3 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D ANTISERUM	1 bottle / 35 mL
<sup>125</sup> I 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 vial / 10 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> PRETREATMENT SOLUTION	1 bottle / 50 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D GAR PRECIPITATING COMPLEX	2 vials / 35 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D CONTROL SERUM	2 vials / 3 mL
95% ETHANOL	1 vial / 7 mL
Number of tests	100

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

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

**4.11,25-(OH)<sub>2</sub>D NSB Buffer:** Ready to use reagent

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

**4.21,25-(OH)<sub>2</sub>D 0 Calibrator:** Ready to use reagent

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

**4.31,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Calibrators (1-5):** Lyophilized reagent

Five lyophilized (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) calibrators at concentrations ranging from 5 - 200 pg/mL containing human serum and ProClin 300 (<0.2%). Reconstitute each calibrator with 3.0 mL of calibrator zero. Exact concentrations are stated on the vial labels. The kit calibrators are calibrated using UV quantitation. The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as recommended.

**4.41,25-(OH)<sub>2</sub>D Antiserum:** Ready to use reagent

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

**4.5<sup>125</sup>I 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** Ready to use reagent

Radio-iodinated 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> analogue diluted in an ethylene glycol phosphate buffer.

**4.61,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Pretreatment Solution:** Ready to use reagent

Potassium phosphate buffer.

**4.71,25-(OH)<sub>2</sub>D Controls: Level 1 (Normal), Level 2 (Elevated):** Ready to use reagent

Processed human serum pool, containing ProClin 300 (<0.2%), spiked with the appropriate amounts of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D to obtain control concentrations within the specified ranges. Control 1 is within the normal range and Control 2 is within an elevated range. Expected ranges, as determined by DiaSorin, are stated on the vial labels.

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

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

**4.995% Ethanol:** Ready to use reagent  
95% ethanol and 5% water.

**NOTE: C<sub>18</sub>OH cartridges are also required for this procedure. These cartridges must be ordered separately under DiaSorin Cat. No. 65101E.**

**5. WARNINGS AND PRECAUTIONS**

FOR IN VITRO DIAGNOSTIC USE.

Not for internal or external use in humans or animals.

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

**REAGENTS CONTAINING HUMAN SOURCE MATERIAL**

**Treat as potentially infectious.**

Each serum/plasma donor unit used in the preparation of this product has been tested by an U.S. FDA approved method and found non-reactive for the presence of HBsAg, antibody to HCV and antibody to HIV 1/2. While these methods are highly accurate, they do not guarantee that all infected units will be detected. This product may also contain other human source material for which there is no approved test. Because no known test method can offer complete assurance that hepatitis B virus, hepatitis C virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV) or other infectious agents are absent, all products containing human source material should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions as described in the U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4<sup>th</sup> ed., May 1999 or current edition.

**REAGENTS CONTAINING SODIUM AZIDE**

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

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

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

R32 - Contact with acids liberates very toxic gas.

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

**REAGENTS CONTAINING ETHANOL**

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

R11 - Highly Flammable

S16 - Keep away from sources of ignition - No smoking

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

## REAGENTS CONTAINING IODINE-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 5.5  $\mu\text{Ci}$  (204 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

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

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

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

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

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

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

## 6. INDICATIONS OF POSSIBLE DETERIORATION OF KIT REAGENTS

- 6.1 The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents.
- 6.2 A shift in the slope or position of the calibrator curve from what is normally obtained.
- 6.3 A decrease in maximum binding.
- 6.4 A high nonspecific binding.

## 7. COLLECTION AND PREPARATION OF SERUM AND PLASMA

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

Either human serum or plasma may be used in this kit. The anticoagulant EDTA may be used with this assay. A fasting specimen is recommended, but not required. Blood should be collected aseptically by venipuncture in a 5 or 10 mL evacuated glass tube.

For serum, allow the blood to clot at room temperature (15-25°C). Centrifuge for 15 minutes using approximately  $760 \times g^*$  to obtain hemolysis free sera. No additives or preservatives are required to maintain integrity of the sample. All plastics, glassware or other material coming into contact with the specimen should be entirely free of any contamination.

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

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

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

- 8.1 C<sub>18</sub>OH Cartridges (24 cartridges) ordered separately under DiaSorin Cat. No. 65101E.
- 8.2 Disposable borosilicate glass tubes, 12 x 75 mm and 13 x 100 mm.
- 8.3 Test tube rack.
- 8.4 Parafilm or equivalent for covering test tubes.
- 8.5 Foam rack for decanting or equivalent.
- 8.6 Centrifuge capable of accommodating 12 x 75 mm tubes and attaining 1800 x g\*.
- 8.7 Gamma counter capable of counting <sup>125</sup>I.
- 8.8 Vortex mixer.
- 8.9 Pipetting devices:
  - a. Micropipettors calibrated to deliver 75 µL, 300 µL and 500 µL.
  - b. Repeating dispensers capable of delivering 50 µL, 300 µL, and 500 µL.
  - c. Volumetric pipettes for reconstituting calibrators, 3.0 mL.
- 8.10 Deionized or distilled water.
- 8.11 Organic solvents:

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

**Use only HPLC-grade solvents.**

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

  - a. Acetonitrile.
  - b. Methanol.
  - c. Hexane. (IMPORTANT: n-hexane percentage must be greater than 95%)
  - d. Methylene chloride (must **not** contain alcohol as a preservative).
  - e. Isopropanol (2-propanol).
- 8.12 Recommended device for the C<sub>18</sub>OH cartridges:
  - a. Vac Elut sample processing station. Processes 24 columns per run. Available from Analytichem International or DiaSorin. To order from DiaSorin, use DiaSorin Cat. No. 11610.
- 8.13 Materials needed for drying samples:
  - a. Nitrogen gas.
  - b. Drying manifold with 37°C (±2°C) heating block or water bath: N-EVAP or MULTI-VAP available through Organomation Associates (Berlin, MA) or Reacti-Vap II and Reacti-Therm III available through Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

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

## 9. PREPARATION OF ORGANIC SOLVENTS FOR THE COLUMN EXTRACTION

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

### PRECAUTIONS:

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

### PRECAUTIONS:

Use distilled or deionized water where applicable.

**TABLE I**  
Solvent Preparation

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

## 10. PRELIMINARY EXTRACTION PROCEDURE

- 10.1** Reconstitute each lyophilized calibrator with 3.0 mL of calibrator zero. Mix the calibrators well and let stand for 15-20 minutes to ensure complete reconstitution. Thaw any frozen reagents completely. Allow all reagents to reach room temperature. Do not allow reagents to reach temperatures above 25°C. Mix all reagents well before use.
- 10.2** Pipette 500 µL of each calibrator (0-5), control and patient sample into labeled 12 x 75 mm borosilicate glass tubes.
- 10.3** Add 500 µL of acetonitrile to each sample; vortex intermittently, at least 3 times, during a time period of 10 minutes.
- 10.4** Centrifuge tubes at 760 x g\* for 10 minutes at 20-25°C.
- 10.5** Decant the sample supernatants into labeled 12 x 75 mm or 13 x 100 mm (if preferred) test tubes; discard pellets.
- 10.6** Add 500 µL of Pretreatment Solution to each tube and vortex.  
**NOTE:** This kit is designed to accommodate up to 48 extractions including the calibrators and controls plus 40 unknowns. This means that 24 samples can be extracted on the VacElut immediately and then the remaining set of 24 samples can be extracted afterwards. The column extractions should be done as soon as possible after the pretreatment addition. However, once column extracted, samples may be stored for 96 hours at -15°C or below.
- 10.7** The samples are now ready to be applied to the C<sub>18</sub>OH cartridges.

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

## 11. COLUMN PROCEDURE

- 11.1 For an explanation of the VAC ELUT, refer to the VAC ELUT User's Guide. Assemble the station as instructed.
- 11.2 Label a 13 x 100 mm borosilicate glass tube for each calibrator (0-5), control, and unknown sample. Place these tubes in the VAC ELUT. Make sure the VAC ELUT lid is in the "WASTE" position and the tubes are positioned to collect the desired eluates. Place the C<sub>18</sub>OH cartridges on to the VAC ELUT cover.
- 11.3 Add the solvent mixtures to the specified cartridge as described in TABLE II.

### IMPORTANT:

#### Vacuum Usage:

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

#### Sample Application:

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

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

#### C<sub>18</sub>OH Cartridge Pretreatment:

The C<sub>18</sub>OH cartridges should be washed with 5 mL of 90:10 (hexane: methylene chloride), 5 mL of IPA and 5 mL of methanol prior to first time usage. The 90:10 (hexane: methylene chloride) solvent mixture can be prepared by measuring 900 mL of hexane and 100 mL of methylene chloride. Place the new, unused cartridges on the VAC ELUT apparatus, set in the "WASTE" position, and add 5 mL of 90:10 (hexane: methylene chloride) followed by 5 mL of IPA to each column and then 5 mL of methanol. Allow each solvent mixture to pass entirely through the cartridges before proceeding to the next mixture. After this initial preparation, it will not be necessary to repeat this step since the cartridges will be regenerated during the extraction procedure.

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

**NOTE:** The C<sub>18</sub>OH Cartridge material is held in place using a porous fiber frit. Discard cartridges with dislodged or missing frits as the C<sub>18</sub>OH material may be lost.

**TABLE II**

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

**12. DRYING AND RECONSTITUTION OF ELUATES**

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

### 13. ASSAY PROCEDURE

- 13.1 Set up labeled 12 x 75 mm disposable borosilicate glass tubes in duplicate for each calibrator (0-5), control and sample according to scheme of the assay. Carefully add 75  $\mu$ L of the reconstituted calibrator, control, and sample extracts into the duplicate assay tubes.  
**CAUTION:** This step must be performed carefully since there is only 25  $\mu$ L excess in each tube.
- 13.2 Refer to "Drying and Reconstitution of Eluates" step number 4. Add 75  $\mu$ L from the TC (Total Count) tube into duplicate assay tubes. Repeat this step for the NSB duplicate assay tubes as well.
- 13.3 Add 300  $\mu$ L of NSB buffer into the NSB tubes.
- 13.4 Add 300  $\mu$ L of primary antibody into all tubes except the Total Counts and NSB tubes.
- 13.5 Mix well; incubate for 2 hours ( $\pm$ 15 minutes) at 20-25°C.  
**NOTE:** Reconstitute the GAR Precipitating Complex with 35 mL of distilled or deionized water, mix thoroughly until the suspension appears homogenous and then allow it to stand for a minimum of 30 minutes before use at room temperature with occasional mixing before and during use.
- 13.6 Add 500  $\mu$ L of well-mixed GAR Precipitating Complex into all tubes except the Total Count tubes. Incubate for 20 minutes ( $\pm$ 5 minutes) at 20-25°C.
- 13.7 Centrifuge all tubes for 20 minutes at 20-25°C at 1800 x g\*, except the Total Count tubes.
- 13.8 Decant the supernatants, except the Total Count tubes, using a foam rack tube holder or equivalent by inverting the rack into an appropriate waste container. Place the inverted rack onto absorbent paper for 2 - 3 minutes. Blot the tubes gently to ensure all liquid is removed.
- 13.9 Measure the radioactivity by counting all tubes for 1 minute on a gamma counter. Tubes should be counted for a minimum of 1 minute (see Limitations of Procedure section).

### 14. PROCEDURAL COMMENTS

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

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

**14.5** In order for a laboratory to completely monitor the consistent performance of an RIA assay, there are additional factors which may be checked. DiaSorin suggests a regular check of the following parameters to assure consistent kit performance.

**a. Total Counts**

**b. Maximum Binding**

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

**c. Nonspecific Binding**

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

**d. Slope of the Calibrator Curve**

The 50% suppression can be monitored.

**15. QUALITY CONTROL**

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

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

**16. CALCULATION OF RESULTS**

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

**16.1 Calculation of Percent B/B<sub>0</sub>**

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

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

**16.2 Use of Calibrator Curve Plot**

- a. Using 2 cycle log-logit or semi-log graph paper, plot percent B/B<sub>0</sub> (%) for the 1,25 (OH)2D calibrators on the ordinate (Y axis) versus the calibrator concentration on the abscissa (X axis).

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

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

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

**TABLE IV**  
DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D RIA Sample Data

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

DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D RIA Sample Calibrator Curve

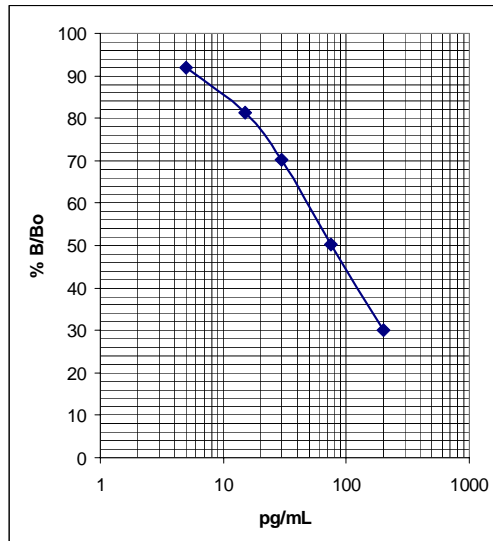


FIGURE 1

#### DATA REDUCTION

The DiaSorin QC lab uses a smoothed spline curve fit.

#### 17. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

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

#### 18. EXPECTED VALUES

##### Reference Interval for Normal Donors

It is important for each laboratory to establish its own reference interval representative of its typical population. However, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D values were collected from 123 apparently healthy volunteers from three Midwestern U.S.A cities in a clinical trial conducted at three sites during the summer and autumn months. These 123 healthy donors were composed of a racially diverse set of 37 males and 86 females, with an age range of 21-68 years. The mean 1,25-(OH)<sub>2</sub>D value for the entire sample (n=123) was 43.9 pg/mL. The 95% reference interval estimated by a nonparametric method (following NCCLS guideline C28-A2<sup>15</sup>) was 25.1-66.1 pg/mL.

##### End-stage renal disease patients

A clinical trial was conducted to evaluate the levels of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D that would be found in an adult population diagnosed with end-stage renal disease. A total of 87 such volunteers (49 males, 38 females, age range of 19-84) from three Midwestern U.S.A.

cities were collected and assayed. The observed range of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D values for this sample (n=87) was 1.6-17.3 pg/mL. The 95% upper reference limit estimated by the nonparametric procedure is 14.2 pg/mL.

## 19. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 19.1 Precision

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

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

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

#### Linearity (Parallelism)

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

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

### Recovery

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

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

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

### 19.3 Analytical Sensitivity

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

### 19.4 Analytical Specificity

Data on the cross-reactivity of the anti serum used in this kit is expressed as the ratio of 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> concentration to the cross-reacting substance concentration at 50% inhibition of maximum binding.

Analyte	Conc. At 50% B/Bo	% Cross Reactivity
1,25 D <sub>3</sub>	136 pg/mL	100
1,25 D <sub>2</sub>	125 pg/mL	109
24,25 D <sub>3</sub>	176,000 pg/mL	<0.08
25,26 D <sub>3</sub>	148,000 pg/mL	<0.08
25 D <sub>3</sub>	>>>1 mg/mL	<0.01

### 19.5 Interfering Substances

An interference study was conducted to determine whether elevated levels of common endogenous substances could negatively impact assay results. The evaluation was consistent with NCCLS guidelines (EP7-P).<sup>18</sup> Three human serum based samples containing low, medium or high levels of 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> were tested with either additions of the test substance or as controls spiked with identical volumes of test substance vehicle. Each sample was extracted twice generating four replicates. Results presented below demonstrate that there was no interference by any of the tested substances, as determined by statistical testing by ANOVA (95% confidence interval), or by the mean value of the spiked samples exceeding  $\pm 2$  calibrator deviation ranges found for the controls.

**Bilirubin**

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

**Cholesterol**

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

**Triglyceride**

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

**Hemoglobin**

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

**Urea**

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

**REFER TO LAST PAGE FOR REFERENCES**

### SCHEME OF THE ASSAY

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

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

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

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

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

## TROUSSE DE DOSAGE RADIO-IMMUNOLOGIQUE 1,25-DIHYDROXYVITAMINE D <sup>125</sup>I

### 1. INDICATION

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

La trousse de dosage radio-immunologique 1,25-Dihydroxyvitamine D <sup>125</sup>I est un dosage radio-immunologique de l'équilibre de compétition qui permet la détermination quantitative de la 1,25-dihydroxyvitamine D (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D) dans le sérum humain ou le plasma sur EDTA afin d'évaluer la carence en 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D qui est associée avec les maladies rénales. Les résultats du dosage doivent être utilisés avec d'autres données cliniques et d'analyse pour aider le clinicien à prendre des décisions individuelles de traitement de l'adulte.

### 2. RÉSUMÉ ET COMMENTAIRE

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

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

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

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

### 3. DESCRIPTION DE LA METHODE DE DOSAGE

Le dosage DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D est une procédure en deux temps. Le dosage comporte une extraction préliminaire suivie d'une purification des métabolites de la vitamine D dans le sérum ou le plasma sur EDTA en utilisant des cartouches

$C_{18}OH_{10}$ .<sup>10</sup> Suite à l'extraction, l'échantillon traité est ensuite dosé par RIA de compétition. La méthode RIA repose sur un anticorps polyclonal spécifique de  $1,25-(OH)_2D_2$  et  $1,25-(OH)_2D_3$ . L'échantillon, l'anticorps et le traceur sont incubés pendant 2 heures entre 20 et 25°C. La séparation en phases s'accomplit au bout de 20 minutes d'incubation entre 20 et 25°C produisant un second complexe d'anticorps précipitant. Après centrifugation et décantation, la fraction fixée restant dans le granulé est mesurée à l'aide d'un compteur gamma. Les valeurs sont calculées directement à l'aide d'une courbe d'étalonnage obtenue avec des concentrations connues. La concentration finale de  $1,25-(OH)_2D$  dans les échantillons de sérum et plasma sur EDTA est exprimée en pg/mL.

#### 4. RÉACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

TAMPON NSB $1,25-(OH)_2D$	1 tube / 3 mL
ÉTALON 0 $1,25-(OH)_2D$	1 tube / 20 mL
ÉTALON 1-5 $1,25-(OH)_2D_3$	5 tubes / 3 mL
ANTISÉRUM $1,25-(OH)_2D$	1 flacon / 35 mL
<sup>125</sup> I $1,25-(OH)_2D_3$	1 tube / 10 mL
SOLUTION DE PRÉTRAITEMENT $1,25-(OH)_2D_3$	1 flacon / 50 mL
COMPLEXE PRÉCIPITANT GAR $1,25-(OH)_2D$	2 tubes / 35 mL
SÉRUM DE CONTRÔLE $1,25-(OH)_2D$	2 tubes / 3 mL
ÉTHANOL 95%	1 tube / 7 mL
Nombre de dosages	100

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

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

##### 4.1 Tampon NSB $1,25-(OH)_2D$ : réactif prêt à l'emploi

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

##### 4.2 Étalons 0 $1,25-(OH)_2D$ : Réactif prêt à l'emploi

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

##### 4.3 Étalons (1-5) $1,25-(OH)_2D_3$ : Réactif lyophilisé

Cinq étalons lyophilisés ( $1,25-(OH)_2D_3$ ) à des concentrations comprises entre 5 et 200 pg/mL contenant du sérum humain et ProClin 300 (< 0,2%). Reconstituer chaque étalon avec 3,0 mL d'étalon zéro. Les concentrations exactes apparaissent sur les étiquettes des tubes. Les étalons de la trousse sont calibrés par quantification UV. Les étalons de la trousse démontrent leur commutabilité avec les échantillons patient lorsqu'ils sont utilisés avec les réactifs et selon le mode d'emploi de ce dosage diagnostique in vitro, comme recommandé.

##### 4.4 Antisérum $1,25-(OH)_2D$ : Réactif prêt à l'emploi

Du sérum de lapin anti- $1,25-(OH)_2D$  est dilué dans un tampon de gélatine de phosphate contenant ProClin 300 (< 0,2%).

**4.5<sup>125</sup>I 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** Réactif prêt à l'emploi

Analogue radio-iodé 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> dilué dans un tampon d'éthylène glycol-phosphate.

**4.6Solution de prétraitement 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** : Réactif prêt à l'emploi

Tampon potassium-phosphate.

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

Les échantillons de sérum humain analysés, contenant ProClin 300 (<0,2%), dopés avec les quantités appropriées de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D pour obtenir des concentrations de contrôle comprises dans les intervalles spécifiés. Le Contrôle 1 est compris dans l'intervalle normal et le Contrôle 2 est compris dans un intervalle élevé. Les intervalles escomptés, tels que déterminés par DiaSorin, apparaissent sur les étiquettes des tubes.

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

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

**4.9Éthanol 95%** : Réactif prêt à l'emploi

95% éthanol et 5% eau.

**REMARQUE** : Les cartouches C<sub>18</sub>OH sont également requises pour ce dosage.

**Commander ces cartouches séparément sous la référence DiaSorin 65101E.**

## 5. AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

POUR USAGE DIAGNOSTIQUE IN VITRO.

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

**ATTENTION** : Ce dispositif doit être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux et des centres de recherche.

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

## RÉACTIFS CONTENANT DES PRODUITS D'ORIGINE HUMAINE

**Traiter comme potentiellement infectieux.**

Chaque don de sérum/plasma intervenant dans la préparation de ce produit a été testé par une méthode agréée par la U.S.FDA et s'est avéré non réactif en présence de HBsAg, d'anticorps anti-VHC et d'anticorps anti-VIH1/2. Même si ces méthodes sont extrêmement précises, elles ne garantissent pas la détection de tous les dons infectés. Ce produit peut également contenir d'autres produits d'origine humaine pour lesquelles il n'existe aucun test agréé. Comme aucune méthode de test connue ne peut offrir l'assurance complète de l'absence du virus de l'hépatite B, de l'hépatite C (HCV), du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ou d'autres agents infectieux, tous les produits d'origine humaine doivent être manipulés conformément aux bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées décrites dans le document U.S. Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 4<sup>ème</sup> éd., mai 1999 ou dernière édition.

## RÉACTIFS CONTENANT DE L'AZIDE DE SODIUM

**ATTENTION** : Certains réactifs de cette trousse contiennent de l'azide de sodium. L'azide de sodium peut réagir avec la plomberie en plomb ou en cuivre et former des azotures ultra-explosifs. Pour leur mise au rebut, rincer à grande eau pour empêcher l'accumulation d'azide. Pour plus d'informations, consulter "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," dans le manuel Guide-Safety

Management No. CDC-22 publié par les Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, U.S. 1976.

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

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

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

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

**RÉACTIFS CONTENANT DE L'ÉTHANOL**

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

R11 - Hautement inflammable

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

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

**RÉACTIFS CONTENANT DE L'IODE 125**

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 5,5  $\mu\text{Ci}$  (204 kBq) d'iode 125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

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

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

1. Le produit radioactif doit être conservé dans un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radiologique. Tout article en verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles en verre du laboratoire.

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

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

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

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

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

- 6.1 Présence de particules anormales dans l'un quelconque des réactifs.
- 6.2 Écart de pente ou de position de la courbe d'étalonnage par rapport à la normale obtenue.

6.3 Diminution de la liaison maximale.

6.4 Haute liaison non spécifique

## 7. PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DU SÉRUM ET DU PLASMA

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

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

Conserver les échantillons de sérum ou de plasma à -15°C maximum. Ne pas congeler un échantillon qui a été décongelé. Cependant, une étude menée par DiaSorin n'a pas mis en évidence un changement significatif des valeurs après 3 cycles de congélation-décongélation des échantillons. Les échantillons ont été stockés à DiaSorin pendant 6 mois maximum à des températures inférieures ou égales à -15°C et les résultats obtenus n'ont pas été significativement différents.

## 8. MATÉRIEL ET PRODUITS REQUIS MAIS NON FOURNIS

8.1 Cartouches C<sub>18</sub>OH (24 cartouches) à commander séparément sous la référence DiaSorin 65101E.

8.2 Tubes en verre borosilicaté jetables, 12 x 75 mm et 13 x 100 mm.

8.3 Portoir de tubes à essai.

8.4 Parafilm ou équivalent pour couvrir les tubes à essai.

8.5 Râtelier en mousse ou équivalent pour décanter.

8.6 Centrifugeuse pour tubes 12 x 75 mm pouvant atteindre 1800 x g\*.

8.7 Compteur gamma capable de compter <sup>125</sup>I.

8.8 Agitateur-mélangeur vortex.

8.9 Pipettes :

a. Micropipettes calibrées pour distribuer 75 µL, 300 µL et 500 µL.

b. Distributeurs à répétition capables de distribuer 50 µL, 300 µL et 500 µL

c. Pipettes volumétriques pour la reconstitution des étalons, 3,0 mL.

8.10 Eau déminéralisée ou distillée.

8.11 Solvants organiques :

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

**Utiliser uniquement des solvants pour CLHP.**

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

a. Acétonitrile.

b. Méthanol.

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

- c. Hexane. (IMPORTANT: le n-hexane doit avoir un pourcentage supérieur à 95%)
  - d. Chlorure de méthylène (ne doit **pas** contenir un alcool comme conservateur).
  - e. Isopropanol (2-propanol).
- 8.12** Appareil recommandé pour les cartouches C<sub>18</sub>OH :
- a. Station de traitement de l'échantillon Vac Elut. Analyse 24 colonnes par dosage. Peut être commandée chez Analytichem International ou DiaSorin. Pour commander chez DiaSorin, utiliser la référence DiaSorin 11610.
- 8.13** Produits requis pour sécher les échantillons :
- a. Azote gazeux.
  - b. Chambre de séchage avec unité chauffante à 37°C (±2°C) ou un bain d'eau :  
N-EVAP ou MULTI-VAP commercialisé par Organomation Associates (Berlin, MA) ou Reacti-Vap II et Reacti-Therm III commercialisé par Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

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

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

### PRÉCAUTIONS :

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

### PRÉCAUTIONS :

Utiliser de l'eau distillée ou déminéralisée quand nécessaire.

**TABLEAU I**  
Préparation du solvant

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

## 10. EXTRACTION PRÉLIMINAIRE

- 10.1 Reconstituer chaque étalon lyophilisé avec 3,0 mL d'étalon zéro. Bien mélanger les étalons et laisser reposer entre 15 et 20 minutes pour garantir une reconstitution complète. Décongeler complètement les réactifs congelés. Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante. Ne pas laisser les réactifs atteindre une température supérieure à 25°C. Bien mélanger tous les réactifs avant de les utiliser.
- 10.2 Pipeter 500 µL de chaque étalon (0-5), contrôle et échantillon patient dans des tubes en verre borosilicaté et étiquetés de 12 x 75 mm.
- 10.3 Ajouter 500 µL d'acétonitrile dans chaque échantillon ; agiter par intermittence, au moins 3 fois, pendant 10 minutes.
- 10.4 Centrifuger les tubes à 760 x g\* pendant 10 minutes entre 20 et 25°C.
- 10.5 Décanter les surnageants dans des tubes à essai étiquetés de 12 x 75 mm ou 13 x 100 mm (selon la préférence) ; éliminer les granulés.
- 10.6 Ajouter 500 µL de solution de prétraitement dans chaque tube et agiter dans le Vortex.  
**REMARQUE** : Cette trousse permet d'effectuer jusqu'à 48 extractions y compris les étalons et contrôles plus 40 inconnus. 24 échantillons peuvent donc être extraits immédiatement sur le VacElut et les 24 échantillons restants peuvent être extraits après. Les extractions sur la colonne doivent être effectuées le plus rapidement possible après l'addition du prétraitement. Cependant, une fois que la colonne est extraite, les échantillons peuvent être stockés pendant 96 heures à des températures inférieures ou égales à -15°C.
- 10.7 Les échantillons sont maintenant prêts à être déposés sur les cartouches C<sub>18</sub>OH.

## 11. PROCÉDURE AVEC LA COLONNE

- 11.1 Pour une explication sur le fonctionnement de VAC ELUT, consulter le guide de l'utilisateur VAC ELUT. Assembler la station en suivant les instructions.
- 11.2 Étiqueter un tube en verre borosilicaté de 13 x 100 mm pour chaque étalon (0-5), contrôle et échantillon inconnu. Mettre ces tubes dans le VAC ELUT. Vérifier que le couvercle du VAC ELUT est en position "DÉCHETS" et que les tubes sont placés correctement pour récupérer les éluats souhaités. Mettre les cartouches C<sub>18</sub>OH sur le couvercle du VAC ELUT.
- 11.3 Ajouter les mélanges de solvants dans la cartouche indiquée conformément au TABLEAU II.

### IMPORTANT :

#### Utilisation du vide :

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

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

**Application à l'échantillon :**

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

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

**Prétraitement de la cartouche C<sub>18</sub>OH :**

Les cartouches C<sub>18</sub>OH doivent être lavées avec 5 mL de 90:10 (hexane : chlorure de méthylène), 5 mL d'IPA et 5 mL d'éthanol avant leur première utilisation. Le mélange de solvants 90:10 (hexane : chlorure de méthylène) peut être préparé en mesurant 900 mL d'hexane et 100 mL de chlorure de méthylène. Mettre les cartouches neuves sur le VAC ELUT, en position "DÉCHETS", et ajouter 5 mL de 90:10 (hexane : chlorure de méthylène) suivis de 5 mL d'IPA sur chaque colonne puis 5 mL de méthanol. Laisser chaque mélange de solvants traverser complètement les cartouches avant d'utiliser le mélange suivant. Après cette préparation initiale, il ne sera pas nécessaire de répéter cette étape puisque les cartouches seront régénérées pendant l'extraction.

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

**REMARQUE :** Le produit dans les cartouches C<sub>18</sub>OH est maintenu en place à l'aide d'une composition de fibres poreuses. Éliminer les cartouches avec des compositions déplacées ou manquantes car du produit C<sub>18</sub>OH peut avoir été perdu.

**TABLEAU II**

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

**12. SÉCHAGE ET RECONSTITUTION DES ÉLUATS**

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

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

### 13. PROCÉDURE DE DOSAGE

- 13.1 Installer des tubes en verre borosilicaté jetables de 12 x 75 mm étiquetés en doublets pour chaque étalon (0-5), contrôle et échantillon selon le profil de dosage. Ajouter lentement 75 µL d'étalon reconstitué, du contrôle et des extraits échantillons dans les tubes de dosage en doublets.  
**ATTENTION** Faire attention à cette étape car il n'y a que 25 µL de solution en excès dans chaque tube.
- 13.2 Se référer à l'étape numéro 4 "Séchage et reconstitution des éluats". Ajouter 75 µL du tube de NT (Numération totale) dans les tubes de dosage en doublets. Répéter cette étape avec les tubes de dosage NSB en doublets.
- 13.3 Ajouter 300 µL de tampon NSB dans les tubes NSB.
- 13.4 Ajouter 300 µL d'anticorps primaire dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale et NSB.
- 13.5 Bien mélanger ; incuber pendant 2 heures ( $\pm 15$  minutes) entre 20 et 25°C.  
**REMARQUE** : Reconstituer le complexe précipitant GAR avec 35 mL d'eau distillée ou déminéralisée, bien mélanger jusqu'à ce que la suspension apparaissent homogène puis laisser reposer pendant 30 minutes minimum avant de l'utiliser à température ambiante. Mélanger de temps en temps avant et pendant l'utilisation.
- 13.6 Ajouter 500 µL de complexe précipitant GAR bien mélangé dans tous les tubes à l'exception des tubes de numération totale. Incuber pendant 20 minutes ( $\pm 5$  minutes) entre 20 et 25°C.
- 13.7 Centrifuger tous les tubes pendant 20 minutes entre 20 et 25°C à 1800 x g\*, à l'exception des tubes de numération totale.
- 13.8 Décarter les surageants, à l'exception des tubes de numération totale, sur un râtelier en mousse ou équivalent en inversant le râtelier dans un récipient à déchets appropriés. Placer le râtelier inversé sur du papier absorbant pendant 2 à 3 minutes. Sécher délicatement les tubes au buvard pour garantir l'absorption de l'ensemble du liquide.
- 13.9 Mesurer la radioactivité en procédant à la numération de chaque tube pendant 1 minute dans un compteur gamma. Les tubes doivent être comptés pendant au moins 1 minute (voir la section : Limitations de la procédure).

### 14. COMMENTAIRES SUR LA PROCÉDURE

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

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

- 14.4 Aucun écart de dosage n'a été observé pendant la durée moyenne de dosage de 100 tubes.
- 14.5 Pour surveiller complètement la précision constante d'un dosage RIA, le laboratoire peut parfois vérifier d'autres facteurs. DiaSorin suggère un contrôle régulier des paramètres suivants pour garantir la précision constante de la trousse.
- a. **Numérations totales**
  - b. **Liaison maximale**  
Numérations moyennes par minute (CPM) des tubes de l'étalon 0/CPM moyenne des tubes de numération totale.
  - c. **Liaison non spécifique**  
CPM moyenne des tubes NSB/CPM moyenne des tubes de numération totale.
  - d. **Pente de la courbe d'étalonnage**  
On peut suivre l'inhibition de 50%.

## 15. CONTRÔLE QUALITÉ

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

Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus et dosés en doublets. Le laboratoire doit tenir à jour des tableaux de contrôle qualité pour suivre la précision des contrôles. Les limites acceptables de précision doivent être déterminées par chaque laboratoire pour chaque niveau de contrôle en utilisant des méthodes statistiques conçues pour dépister les erreurs systématiques et aléatoires. Les résultats de contrôle doivent être conformes aux critères d'acceptabilité du laboratoire avant d'être validés en tant que résultats.<sup>12,13,14</sup>

## 16. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe de nombreuses méthodes de calcul des résultats des dosages radio-immunologiques. Chacune est basée sur l'obtention d'une courbe d'étalonnage en traçant l'ampleur de la liaison par rapport aux concentrations indiquées pour les étalons. Ce graphe peut être à l'échelle linéaire ou logarithmique. Chacune de ces méthodes donne essentiellement les mêmes valeurs pour les contrôles et les échantillons, même si certains dosages peuvent être mieux "adaptés" à une méthode particulière que d'autres. Le laboratoire de contrôle qualité DiaSorin utilise la méthode de calcul avec programme d'ajustement de spline cubique (Spline Smoothed curve fit) % B/B0 par rapport à la concentration logarithmique .

### 16.1 Calcul du pourcentage B/B<sub>0</sub>

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

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

### 16.2 Utiliser le tracé de la courbe d'étalonnage

- a. En utilisant du papier semi-logarithmique ou logarithmique à 2 cycles, tracer le pourcentage B/B<sub>0</sub> (%) pour les étalons 1,25 (OH)<sub>2</sub>D portés en ordonnée (axe Y) par rapport à la concentration des étalons portée en abscisse (axe X).

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

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

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

**TABLEAU IV**  
Données d'échantillon RIA 1,25-(OH)<sub>2</sub>D DiaSorin

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

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

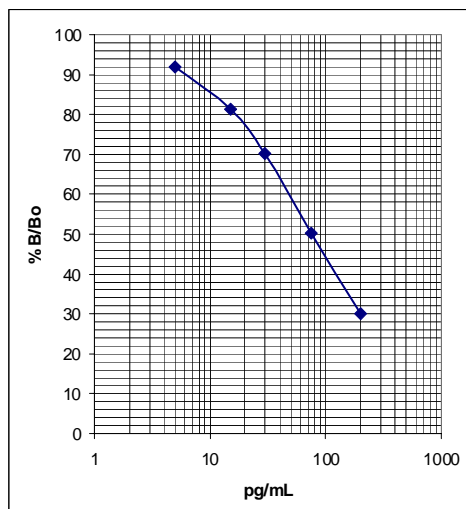


FIGURE 1

#### RÉDUCTION DES DONNÉES

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

#### 17. LIMITATIONS DE LA PROCÉDURE

- 17.1 Les temps de numération doivent être suffisamment long pour empêcher les erreurs dues à l'inefficacité du compteur (par exemple, 2000 CPM comporteront 5% d'erreur et 10000 CPM 1% d'erreur).
- 17.2 Les résultats de dosage doivent être utilisés avec d'autres données cliniques et de laboratoire pour aider le clinicien à prendre des décisions de traitement individualisées selon le patient.
- 17.3 Les caractéristiques de précision de ce dosage n'ont pas été établies chez l'enfant.

#### 18. VALEURS ESCOMPTÉES

##### Intervalle de référence pour des donneurs normaux

Il est important que chaque laboratoire établisse son propre intervalle de référence représentatif de sa population typique. Cependant, les valeurs de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D ont été obtenues au cours d'un essai clinique qui s'est déroulé pendant l'été et l'automne, et qui comptait 123 volontaires apparemment en bonne santé provenant de trois villes du Midwest des États-Unis. Ces 123 donneurs sains, 37 hommes et 86 femmes, étaient d'origine ethnique variée et âgés de 21 à 68 ans. La valeur moyenne de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D pour l'échantillon complet (n=123) était de 43,9 pg/mL. L'intervalle de référence de 95% estimé par une méthode non-paramétrique (conformément aux directives NCCLS C28-A2<sup>15</sup>) était compris entre 25,1 et 66,1 pg/mL.

##### Patients souffrant d'une maladie rénale terminale

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

## 19. CRITERES DE QUALITE

### 19.1 Précision

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

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

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

#### Linéarité (parallélisme)

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

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

## RÉCUPÉRATION

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

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

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

### 19.3 Sensibilité analytique

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

### 19.4 Spécificité analytique

Les données de réactivité croisée de l'antisérum utilisé dans cette trousse sont exprimées comme la concentration de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> rapportée à la réaction croisée de concentration de substance avec inhibition de 50 % de la liaison maximale.

Conc.	mesurée à 50% B/Bo	% Réactivité croisée
1,25 D <sub>3</sub>	136 pg/mL	100
1,25 D <sub>2</sub>	125 pg/mL	109
24,25 D <sub>3</sub>	176 000 pg/mL	<0,08
25,26 D <sub>3</sub>	148 000 pg/mL	<0,08
25 D <sub>3</sub>	>>>1 mg/mL	<0,01

### 19.5 Substances interférentes

Une étude de l'interférence a été faite pour déterminer si des taux élevés de substances endogènes courantes pouvaient avoir un effet négatif sur les résultats du dosage. L'évaluation était conforme aux directives NCCLS (EP7-P).<sup>18</sup> Trois échantillons de sérum humain contenant des taux faibles, moyens et élevés de 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> ont été dosés après addition de la substance analysée ou addition des contrôles dopés avec des volumes identiques du véhicule de la substance dosée. Chaque échantillon a été extrait deux fois ce qui a donné quatre résultats. Les résultats rassemblés ci-dessous montrent

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

#### Bilirubine

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

#### Cholestérol

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

#### Triglycéride

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

#### Hémoglobine

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

#### Urée

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

**VOIR LA DERNIÈRE PAGE POUR RÉFÉRENCE**

### PROCÉDURE DE DOSAGE

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

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

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

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

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

## 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D <sup>125</sup>I RIA-KIT

### 1. VERWENDUNGSZWECK

#### NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

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

### 2. ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

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

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

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

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

### 3. TESTPRINZIP

Der DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D Test wird in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst werden Vitamin-D-Metaboliten aus Serum oder EDTA-Plasma mit Hilfe von C<sub>18</sub>-OH-Kartuschen extrahiert und anschließend gereinigt.<sup>10</sup> Nach der Extraktion wird die vorbehandelte Probe in einem kompetitiven Radioimmunoassay untersucht. Der Radioimmunoassay basiert auf einem polyklonalen Antikörper, der sowohl für 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>2</sub> als auch 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> spezifisch ist. Die Probe, der Antikörper und der Tracer werden 2 Stunden lang bei 20-25°C inkubiert. Die Phasentrennung erfolgt nach 20-minütiger Inkubation bei 20-25°C mit einem zweiten präzipitierenden Antikörperkomplex. Nach der

Zentrifugation und Dekantierung wird die gebundene Fraktion im Pellet in einem Gammazähler gemessen. Die Werte werden direkt aus einer Eichkurve bekannter Konzentrationen berechnet. Die Endkonzentration des 1,25-(OH)<sub>2</sub>D in Serum- und EDTA-Plasmaproben wird in pg/mL ausgedrückt.

#### 4. KITREAGENZIEN

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

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

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

**4.11,25-(OH)<sub>2</sub>D NSB-Puffer:** gebrauchsfertiges Reagenz

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

**4.21,25-(OH)<sub>2</sub>D Nullkalibrator:** gebrauchsfertiges Reagenz

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

**4.31,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Kalibratoren (1-5):** lyophilisiertes Reagenz

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

**4.41,25-(OH)<sub>2</sub>D Antiserum:** gebrauchsfertiges Reagenz

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

**4.5<sup>125</sup>I 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** gebrauchsfertiges Reagenz

Radioiodiertes 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Analogon, verdünnt in einem Ethylenglykolphosphatpuffer.

**4.61,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Vorbehandlungslösung:** gebrauchsfertiges Reagenz

Kaliumphosphatpuffer.

#### **4.71,25-(OH)<sub>2</sub>D Kontrollen: Konzentration 1 (normal), Konzentration 2 (hoch):**

gebrauchsfertiges Reagenz

Vorbehandelter Humanserum-Pool mit ProClin 300 (<0,2%), versetzt mit den entsprechenden Mengen 1,25-(OH)<sub>2</sub>D, um Kontrollkonzentrationen innerhalb der angegebenen Bereiche zu erhalten. Kontrolle 1 liegt innerhalb des Normalbereichs, Kontrolle 2 innerhalb eines erhöhten Bereichs. Die erwarteten Bereiche, die von DiaSorin bestimmt wurden, sind auf den Fläschchenetiketten angegeben.

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

**4.995 % Ethanol:** gebrauchsfertiges Reagenz

95% Ethanol und 5% Wasser.

**HINWEIS:** Für dieses Verfahren werden ebenfalls C<sub>18</sub>OH-Kartuschen benötigt. Diese Kartuschen müssen gesondert unter der DiaSorin Kat. Nr. 65101E bestellt werden.

### **5. WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN**

NUR ZUR IN-VITRO-DIAGNOSTIK

Nicht für internen oder externen Gebrauch bei Menschen oder Tieren.

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

#### **REAGENZEN MIT MATERIAL HUMANEN URSPRUNGS**

**Dieses Produkt ist als potenzieller Infektionserreger zu behandeln.**

Alle in der Herstellung dieses Produktes verwendeten Serum- bzw. Plasmaspendeeinheiten wurden nach einer FDA-genehmigten Methode getestet und für nicht reaktiv auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAg), Hepatitis-C-Antikörper (HCV) und Antikörper für HIV-1/2 befunden. Obwohl diese Methode äußerst genau ist, bietet sie keine Gewähr dafür, dass alle infizierten Einheiten identifiziert werden können. Dieses Produkt kann auch Material humanen Ursprungs enthalten, für welches es noch kein genehmigtes Testverfahren gibt. Da keine der zur Zeit bekannten Testmethoden absolute Gewähr für die Abwesenheit des Hepatitis-B-Virus (HBV), Hepatitis-C-Virus (HCV), des Retrovirus (HIV) oder anderer Infektionserreger bieten kann, sind alle Produkte mit Komponenten humanen Ursprungs unter Einhaltung guter Laborpraktiken mit den geeigneten Vorsichtsmaßnahmen zu handhaben, wie im Handbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biosicherheit in mikrobiologischen und biomedizinischen Laboren) (4. Auflage, Mai 1999, oder aktuelle Auflage) der Centers for Disease Control and Prevention und der National Institutes of Health (amerikanische Krankheitsforschungszentren / Staatliche Gesundheitsinstitute) beschrieben.

#### **REAGENZEN MIT NATRIUMAZID**

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

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

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

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

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

**ETHANOL ENTHALTENDE REAGENZIEN**

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

R11 - Leichtzündlich

S16 - Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen

S43 - Zum Löschen Trockenlöschmittel oder Kohlendioxid verwenden

**REAGENZIEN MIT IOD-125**

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit nicht mehr als 5,5 µCi (204 kBq) Iod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

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

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

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

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

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

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

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

## 6. ANZEICHEN FÜR MÖGLICHEN VERFALL DER KITREAGENZIEN

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

## 7. ENTNAHME UND VORBEREITUNG VON SERUM UND PLASMA

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

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

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

## 8. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTE GERÄTE UND MATERIALIEN

- 8.1 C<sub>18</sub>OH-Kartuschen (24 Kartuschen), gesondert zu bestellen unter DiaSorin Kat. Nr. 65101E
- 8.2 Einweg-Borosilikatglasröhrchen, 12 x 75 mm und 13 x 100 mm
- 8.3 Röhrchenständer
- 8.4 Parafilm oder gleichwertige Abdeckung für Teströhrchen
- 8.5 Schaumstoffständer zum Dekantieren oder Gleichwertiges
- 8.6 Zentrifuge für 12 x 75 mm Röhrchen (1800 x g\*)
- 8.7 Gammazähler zur Messung von <sup>125</sup>I.
- 8.8 Vibrationsmischer (Vortex)
- 8.9 Pipettiergeräte:
  - a. Mikropipetten zur Abgabe von 75 µL, 300 µL und 500 µL
  - b. Multipipetten zur Abgabe von 50 µL, 300 µL und 500 µL
  - c. Messpipetten zur Rekonstitution von Kalibratoren, 3,0 mL
- 8.10 Destilliertes oder entionisiertes Wasser

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

**8.11 Organische Lösungsmittel:**

Die folgenden Lösungsmittel werden für die Probenvorbereitung und -extraktion benötigt.

**Nur HPLC-Lösungsmittel verwenden.**

**Die organischen Lösungsmittel dürfen nicht mit säuregewaschenen Glasbehältern oder anderen säurehaltigen Mitteln in Kontakt kommen.**

- a. Acetonitril
  - b. Methanol
  - c. Hexan (WICHTIG: Der Anteil von Hexan muss mehr als 95 % betragen.)
  - d. Methylenchlorid (darf **nicht** Alkohol als Konservierungsmittel enthalten)
  - e. Isopropanol (2-Propanol)
- 8.12** Empfohlenes Gerät für die C<sub>18</sub>OH-Kartuschen:
- a. Vac Elut Probenverarbeitungsstation. Verarbeitet 24 Säulen pro Serie. Erhältlich bei Analytichem International oder DiaSorin. Bestellung bei DiaSorin unter der DiaSorin Kat. Nr. 11610.
- 8.13** Zum Trocknen der Proben benötigte Materialien:
- a. Stickstoffgas
  - b. Mehrfach trocknen mit 37°C (±2°C) warmem Heizblock oder Wasserbad: N-EVAP oder MULTI-VAP, erhältlich bei Organomation Associates (Berlin, MA), oder Reacti-Vap II und Reacti-Therm III, erhältlich bei Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

**9. VORBEREITUNG ORGANISCHER LÖSUNGSMITTEL ZUR SÄULENEXTRAKTION**

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

**VORSICHTSMASSNAHMEN:**

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

**VORSICHTSMASSNAHMEN:**

Destilliertes oder entionisiertes Wasser verwenden.

**TABELLE I**  
Lösungsmittelvorbereitung

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

## 10. VORLÄUFIGES EXTRAKTIONSVERFAHREN

- 10.1 Jeden lyophilisierten Kalibrator mit 3,0 mL Nullkalibrator rekonstituieren. Die Kalibratoren gut mischen und 15-20 Minuten lang stehen lassen, um eine vollständige Rekonstitution zu gewährleisten. Gefrorene Reagenzien vollständig auftauen. Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen. Die Reagenzien dürfen nicht auf mehr als 25°C erwärmt werden. Alle Reagenzien vor Gebrauch gut mischen.
- 10.2 500 µL jedes Kalibrators (0-5), jeder Kontrolle und jeder Patientenprobe in 12 x 75 mm Borosilikatglasröhrchen pipettieren.
- 10.3 Zu jeder Probe 500 µL Acetonitril geben; intermittierend mindestens 3-mal in einem Zeitraum von 10 Minuten auf dem Vortex mischen.
- 10.4 Die Röhrchen mit 760 x g\* 10 Minuten lang bei 20-25°C zentrifugieren.
- 10.5 Die Probenüberstände in 12 x 75 mm oder 13 x 100 mm Teströhrchen dekantieren; die Pellets verwerfen.
- 10.6 Zu jedem Röhrchen 500 µL Vorbehandlungslösung geben und auf dem Vortex mischen.  
**Hinweis:** Dieser Kit ist für bis zu 48 Extraktionen einschließlich Kalibratoren und Kontrollen sowie 40 unbekanntes Proben ausgelegt. Das bedeutet, dass 24 Proben sofort mit dem VacElut und die übrigen 24 Proben anschließend extrahiert werden können. Die Säulenextraktionen sollten nach der Zugabe der Vorbehandlungslösung so bald wie möglich durchgeführt werden. Nach der Säulenextraktion können die Proben jedoch 96 Stunden lang bei -15°C oder darunter aufbewahrt werden.
- 10.7 Die Proben können jetzt auf die C<sub>18</sub>OH-Kartuschen appliziert werden.

## 11. SÄULENVERFAHREN

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

### WICHTIG:

#### Vakuumeinsatz:

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

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

**Probenapplikation:**

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

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

**Vorbehandlung der C<sub>18</sub>OH-Kartusche:**

Vor dem ersten Gebrauch sollten die C<sub>18</sub>OH-Kartuschen mit 5 mL 90:10 (Hexan: Methylenchlorid), 5 mL IPA und 5 mL Methanol gewaschen werden. Die 90:10 (Hexan: Methylenchlorid)-Lösungsmittelmischung kann vorbereitet werden, indem 900 mL Hexan und 100 mL Methylenchlorid abgemessen werden. Die neuen, ungebrauchten Kartuschen auf den VAC ELUT legen, die Position "WASTE" einstellen, zuerst 5 mL 90:10 (Hexan: Methylenchlorid) und dann 5 mL IPA zu jeder Säule und schließlich 5 mL Methanol zugeben. Jede Lösungsmittelmischung muss vollständig durch die Kartuschen fließen, bevor mit der nächsten Mischung fortgefahren wird. Nach dieser Vorbereitung ist es nicht notwendig, diesen Schritt zu wiederholen, da die Kartuschen während des Extraktionsverfahrens aufbereitet werden.

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

**HINWEIS:** Das Material der C<sub>18</sub>OH-Kartusche wird mit einer porösen Glasfaserfritte in Position gehalten. Kartuschen mit dislozierten oder fehlenden Fritten verwerfen, da das C<sub>18</sub>OH-Material verloren gehen kann.

**TABELLE II**

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

## 12. TROCKNEN UND REKONSTITUIEREN VON ELUATEN

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

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

### 13. TESTVERFAHREN

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

### 14. ANMERKUNGEN ZUM VERFAHREN

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

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

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

## 15. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Die Kontrollen sollten als unbekannte Proben behandelt und doppelt untersucht werden. Um die Leistung der Kontrollen zu überwachen, sollten vom Labor Qualitätskontrolltabellen geführt werden. Jedes Labor sollte mit Hilfe von statistischen Methoden, mit denen sowohl systematische als auch zufällige Fehler erkannt werden können, für jede Kontrollkonzentration akzeptable Leistungsgrenzen festlegen. Die Kontrolleergebnisse müssen den Akzeptabilitätskriterien des Labors entsprechen, bevor die Testergebnisse des Patienten mitgeteilt werden können.<sup>12,13,14</sup>

## 16. ERGEBNISBERECHNUNG

Es gibt viele Möglichkeiten, die Ergebnisse von Radioimmunoassays zu berechnen. Bei jeder Methode wird eine Eichkurve angelegt, indem die prozentualen Bindungen gegen die angegebenen Konzentrationen der Kalibratoren aufgetragen werden. Die Kurve kann entweder eine lineare oder eine logarithmische Skala haben. Jede dieser Methoden

führt im Wesentlichen zu denselben Werten für Kontrollen und Proben; bei einigen Assays ist die eine Methode jedoch möglicherweise besser geeignet als die andere. Die Umrechnungsmethode für das DiaSorin Qualitätskontrolllabor ist %B/B<sub>0</sub> gegen log Konzentration. Sie basiert auf einem Smoothed-Spline-Kurvenanpassungsprogramm.

### 16.1 Berechnung des Anteils B/B<sub>0</sub>

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

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

## 16.2 Eichkurve

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

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

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

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

**TABELLE IV**  
DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D RIA Probanddaten

Röhrchen	Doppelte I/M	Durchschn. I/M	Korrigierte I/M	Prozent Gebunden (B/T)	Prozent (B/B <sub>0</sub> )	Konz. (pg/mL)
Totalaktivität	40.792 40.578	40.685				
NSB	1.438 1.439	1.439		3,5		
Nullkalibrator	18.006 18.119	18.063	16.624	44,4	100,0	
Kalibratoren (pg/mL)						
1 (5,0)	16.710 16.770	16.740	15.302		92,0	
2 (15,0)	14.941 14.916	14.929	13.490		81,2	
3 (30,0)	13.087 13.124	13.106	11.667		70,2	
4 (75,0)	9.820 9.765	9.793	8.354		50,2	
5 (200)	6.412 6.464	6.438	5.000		30,0	
Kontrollen						
Stufe 1:	13.275	13.403	11.964		72,0	27,3
Normalbereich	13.530					
Stufe 2:	8.206	8.165	6.727		40,5	119
Hoher Bereich:	8.124					

DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D RIA Proben-Eichkurve

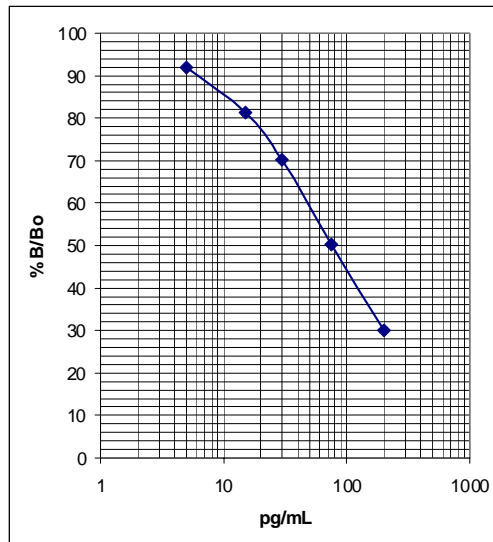


ABBILDUNG 1

#### DATENREDUKTION

Das Qualitätskontrolllabor von DiaSorin verwendet eine geglättete Spline-Kurvenanpassung.

#### 17. GRENZEN DES VERFAHRENS

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

#### 18. ERWARTETE WERTE

##### Referenzintervall bei normalen Spendern

Es ist wichtig, dass jedes Labor sein eigenes Referenzintervall festlegt, das für seine typische Population repräsentativ ist. Die 1,25-(OH)<sub>2</sub>D-Werte wurden jedoch von 123 scheinbar gesunden Freiwilligen aus drei Städten des mittleren Westens der USA in einer klinischen Studie gewonnen, die in den Sommer- und Herbstmonaten an drei Zentren durchgeführt wurde. 37 dieser 123 gesunden Spender unterschiedlicher Rasse waren männlich, 86 waren weiblich. Der Altersbereich betrug 21-68 Jahre. Der mittlere 1,25-(OH)<sub>2</sub>D-Wert für die gesamte Probe (n=123) war 43,9 pg/mL. Das mit einer nichtparametrischen Methode geschätzte 95%-Referenzintervall (nach NCCLS-Richtlinie C28-A2<sup>15</sup>) war 25,1-66,1 pg/mL.

### Patienten mit Niereninsuffizienz im Endstadium

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

## 19. TESTCHARAKTERISTIKA

### 19.1 Präzision

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

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

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

#### Linearität (Parallelität)

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

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

#### WIEDERFINDUNG

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

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

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

#### 19.3 Analytische Sensitivität

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

#### 19.4 Analytische Spezifität

Die Kreuzreaktivität des in diesem Kit verwendeten Antiserums wird ausgedrückt als das Verhältnis der 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Konzentration zur Konzentration der kreuzreaktiven Substanz bei 50%iger Inhibierung der maximalen Bindung.

Analyt	Konz. bei 50% B/Bo	% Kreuzreaktivität
1,25 D <sub>3</sub>	136 pg/mL	100
1,25 D <sub>2</sub>	125 pg/mL	109
24,25 D <sub>3</sub>	176.000 pg/mL	<0,08
25,26 D <sub>3</sub>	148.000 pg/mL	<0,08
25 D <sub>3</sub>	>>>1 mg/mL	<0,01

#### 19.5 Störende Substanzen

Es wurde eine Interferenzstudie durchgeführt, um zu bestimmen, ob erhöhte Konzentrationen häufig vorkommender endogener Substanzen die Assay-Ergebnisse negativ beeinflussen können. Die Evaluierung erfolgte in Übereinstimmung mit den NCCLS-Richtlinien (EP7-P).<sup>18</sup> Es wurden drei Proben auf Humanserumbasis mit niedrigen, mittleren oder hohen Konzentrationen von 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> entweder mit Zusätzen der Testsubstanz oder als mit identischen Volumen der Testsubstanz versetzten Kontrollen untersucht. Jede Probe wurde zweimal extrahiert und ergab vier Replikate. Die unten dargestellten Ergebnisse zeigen, dass es keine Interferenzen durch eine der getesteten Substanzen gab. Die Bestimmung erfolgte durch statistisches Testen mit ANOVA (95%-Konfidenzintervall) oder über den Mittelwert der versetzten Proben, die den für die Kontrollen ermittelten Standardabweichungsbereich um mehr als ± 2 überschritten.

##### Bilirubin

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

##### Cholesterin

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

##### Triglycerid

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

### Hämoglobin

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

### Harnstoff

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

## LITERATURANGABEN FINDEN SIE AUF DER LETZTEN SEITE

### TESTSCHEMA

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

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

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

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

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

## EQUIPO RIA PARA 1,25-DIHIIDROXIVITAMINA D <sup>125</sup>I

### 1. USO INDICADO

#### PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

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

### 2. RESUMEN Y EXPLICACIÓN

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

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

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

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

### 3. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El ensayo DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D es un procedimiento de dos pasos. Incluye una extracción preliminar y la subsiguiente purificación de los metabolitos de vitamina D del suero o plasma EDTA mediante cartuchos C<sub>18</sub> OH.<sup>10</sup> Tras la extracción, la muestra tratada se somete a un ensayo con un competitivo procedimiento RIA. El método RIA se basa en un anticuerpo policlonal específico tanto para 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> y 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. La muestra, el anticuerpo y el trazador, se incuban durante 2 horas entre 20 y 25°C. La fase de separación se alcanza tras una incubación de 20 minutos entre 20 y 25°C con un segundo complejo de precipitación de anticuerpos. Tras la centrifugación y decantación, la parte unida remanente en la pastilla se cuenta en un contador gamma.

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

#### 4. REACTIVOS SUMINISTRADOS CON EL EQUIPO

TAMPÓN NSD 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	1 vial / 3 mL
CALIBRADOR 0 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	1 vial / 20 mL
CALIBRADOR 1 - 5 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	5 viales / 3 mL
ANTISUERO 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	1 frasco / 35 mL
<sup>125</sup> I 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 vial / 10 mL
SOLUCIÓN DE TRATAMIENTO PREVIO 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 frasco / 50 mL
COMPLEJO DE PRECIPITACIÓN GAR 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	2 viales / 35 mL
SUERO DE CONTROL 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	2 viales / 3 mL
ETANOL 95%	1 vial / 7 mL
Número de pruebas	100

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

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

##### 4.1 Tampón NSB 1,25-(OH)<sub>2</sub>D: reactivo listo para utilizar

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

##### 4.2 Calibrador 0 1,25-(OH)<sub>2</sub>D: reactivo listo para utilizar

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

##### 4.3 Calibrador (1-5) 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: reactivo liofilizado

Cinco calibradores liofilizados (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) en concentraciones entre 5 y 200 pg/mL que contienen suero humano y ProClin 300 (<0,2%). Reconstituya cada calibrador con 3,0 mL de calibrador 0. La concentración exacta se indica en la etiqueta del vial. Los calibradores del equipo están ajustados con cuantificación UV. Los calibradores del equipo han demostrado tener conmutabilidad con muestras de pacientes cuando se utilizan con los reactivos y el procedimiento recomendados para esta prueba de diagnóstico in vitro.

##### 4.4 Antisuero 1,25-(OH)<sub>2</sub>D: reactivo listo para utilizar

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

##### 4.5 <sup>125</sup>I 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> reactivo listo para utilizar

1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> radio yodado análogo diluido en un tampón de etileno glicol fosfato.

##### 4.6 Solución de tratamiento previo 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: reactivo listo para utilizar

Tampón de fosfato de potasio.

**4.7 Controles 1,25-(OH)<sub>2</sub>D: nivel 1 (Normal), nivel 2 (Elevado):** reactivo listo para utilizar

Mezcla de suero humano procesado que contiene ProClin 300 (<0,2%), con las cantidades apropiadas de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D para obtener concentraciones de control dentro de los rangos especificados. El control 1 está dentro del rango normal y el control 2 está dentro de un rango elevado. Los rangos previstos, determinados por DiaSorin, se indican en las etiquetas de los viales.

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

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

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

**NOTA: También son necesarios cartuchos C<sub>18</sub>OH para este procedimiento. Dichos cartuchos deben solicitarse por separado con el número de pedido de DiaSorin 65101E.**

## 5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

PARA UTILIZACIÓN EN DIAGNÓSTICOS IN VITRO

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

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

### REACTIVOS QUE CONTIENEN MATERIAL DE ORIGEN HUMANO

**Trátase como potencialmente infeccioso.**

Todas las unidades de donantes de suero/plasma se han probado en conformidad con un método aprobado por la FDA estadounidense y han dado resultados negativos para la presencia de AgsHB, anticuerpos de VHC y anticuerpos de VIH 1/2. Aunque estos métodos son altamente precisos, no garantizan que se detecten todas las unidades infectadas. Este producto también puede contener otros materiales de origen humano para los cuales no existe prueba homologada. Dado que ningún método de prueba puede ofrecer una seguridad total de la ausencia del virus de la hepatitis B, de la hepatitis C (VHC), el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) u otros agentes infecciosos, todos los productos que contengan material de origen humano se deben manejar de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas utilizando las precauciones adecuadas que se describen en el manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 4<sup>a</sup> ed., mayo 1999 o actual, por Centers for Disease Control and Prevention/National Institutes of Health.

### REACTIVOS CON CONTENIDO DE AZIDA SÓDICA

**PRECAUCIÓN:** Algunos reactivos de este equipo contienen azida sódica. La azida sódica puede reaccionar con las cañerías de plomo y cobre y formar azidas metálicas altamente explosivas. Al desecharlo, enjuague con abundante agua para evitar que se acumule la azida. Para obtener información adicional, consulte "Decontamination of Laboratory Sink Drains to Remove Azide Salts," en el manual Guide-Safety Management N° CDC-22 publicado por Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, EE.UU. 1976.

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

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

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

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

**REACTIVOS CON CONTENIDO DE ETANOL**

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

R11 - Altamente inflamable

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

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

**REACTIVOS CON CONTENIDO DE YODO-125**

Este equipo contiene material radiactivo que no supera 5,5  $\mu\text{Ci}$  (204 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

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

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjuagarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorios.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

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

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

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

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

- 6.1 Presencia de partículas anómalas en alguno de los reactivos.
- 6.2 Desviación en la pendiente o posición de la curva del calibrador con respecto al resultado habitual.
- 6.3 Disminución de la unión máxima.
- 6.4 Alto nivel de uniones no específicas.

## 7. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE SUERO Y PLASMA

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

Con este equipo puede utilizarse suero o plasma humanos. Con este ensayo puede utilizarse el anticoagulante EDTA. Es recomendable tomar la muestra en ayunas, pero no es imprescindible. La sangre debe recolectarse asépticamente por punción venosa en un tubo de vidrio vacío de 5 ó 10 mL. Para el suero, deje que la sangre coagule a temperatura ambiente (15-25°C). Centrifugue durante 15 minutos con aproximadamente 760 x g\* para obtener suero no hemolizado. Para mantener la integridad de la muestra no se requieren aditivos ni conservantes. Todos los materiales de plástico, vidrio u otros que entren en contacto con la muestra deben estar completamente limpios de contaminación.

Almacene las muestras de suero o plasma a -15°C o menos. No debe congelar y descongelar las muestras de forma reiterada. No obstante, un estudio realizado por DiaSorin mostró que no se produce un cambio significativo en los valores en muestras que se han congelado y descongelado 3 veces. Se han conservado muestras hasta 6 meses a 15°C o menos sin que se produzcan cambios significativos en los resultados.

## 8. EQUIPO Y MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- 8.1 Cartuchos C<sub>18</sub>OH (24 unidades) pedidos por separado con el número de pedido DiaSorin 65101E.
- 8.2 12 tubos desechables de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm y 13 x 100 mm.
- 8.3 Portatubos.
- 8.4 Parafilm o un equivalente para cubrir los tubos de ensayo.
- 8.5 Portatubos de espuma o equivalente.
- 8.6 Centrifuga con capacidad para 12 tubos de 75 mm a 1800 x g\*.
- 8.7 Contador gamma válido para yodo <sup>125</sup>.
- 8.8 Mezclador vórtex.
- 8.9 Utensilios de dosificación:
  - a. Micropipetas calibradas para suministrar 75 µL, 300 µL y 500 µL.
  - b. Dispensadores de repetición para suministrar 50 µL, 300 µL, y 500 µL.
  - c. Pipetas volumétricas para reconstituir calibradores, 3,0 mL.

8.10 Agua desionizada o destilada.

8.11 Disolventes orgánicos:

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

**Utilice solo disolventes de grado HPLC.**

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

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

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

- 8.12** Dispositivo recomendado para los cartuchos C<sub>18</sub> OH:
- Estación de procesamiento de muestras Vac Elut. Procesa 24 columnas en cada ciclo. Puede solicitarse a Analytichem International o a DiaSorin. Para pedirla a DiaSorin, utilice el número de pedido DiaSorin 11610.
- 8.13** Material necesario para secar muestras:
- Nitrógeno gaseoso.
  - Colector de secado con baño de agua o bloque calentador a 37°C (±2°C): N-EVAP o MULTI-VAP disponible a través de Organomation Associates (Berlín, MA) o Reacti-Vap II y Reacti-Therm III disponibles a través Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

## 9. PREPARACIÓN DE DISOLVENTES ORGÁNICOS PARA LA EXTRACCIÓN DE COLUMNAS

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

### PRECAUCIONES:

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

### PRECAUCIONES:

Utilice agua destilada o desionizada cuando proceda.

**TABLA I**  
Preparación disolvente

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

## 10. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN PRELIMINAR

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

- 10.4 Centrifugue los tubos a 760 x g\* durante 10 minutos a 20 - 25°C.
- 10.5 Decante los sobrenadantes de la muestra en los 12 tubos etiquetados de 75 mm o los 13 de 100 mm (si lo prefiere); deseche las pastillas.
- 10.6 Añada 500 µL de disolución de tratamiento previo a cada tubo y al mezclador vórtex.
- NOTA:** Este equipo está diseñado para colocar hasta 48 extracciones incluidos los controladores y controles y 40 desconocidos. Esto quiere decir que pueden extraerse 24 muestras en el VacElut de forma inmediata y las 24 restantes pueden extraerse más adelante. Las extracciones de columna deberían realizarse tan pronto como sea posible tras la adición del tratamiento previo. Sin embargo, una vez extraída la columna, las muestras pueden almacenarse durante 96 horas a -15°C o menos.
- 10.7 Ahora, las muestras están listas para aplicarlas a los cartuchos C<sub>18</sub>OH.

## 11. PROCEDIMIENTO DE COLUMNA

- 11.1 Para obtener una descripción del VAC ELUT, consulte su Manual de usuario. Monte la estación tal como se indica.
- 11.2 Etiquete un tubo de vidrio de borosilicato de 13 x 100 mm para cada calibrador (0-5), control y muestra desconocida. Coloque dichos tubos en el VAC ELUT. Compruebe que la tapa del VAC ELUT está en la posición "WASTE" y que los tubos están colocados para recoger los eluatos deseados. Coloque los cartuchos C<sub>18</sub>OH en la cubierta del VAC ELUT.
- 11.3 Añada las mezclas de disolventes a los cartuchos específicos tal como se describe en la TABLA II.

### IMPORTANTE:

#### Utilización del vacío:

Accione el vacío tras cada adición de disolvente y permita que la mezcla de disolvente fluya **por completo** a través del cartucho antes de pasar al siguiente disolvente. Active y desactive el vacío en los pasos recomendados en la TABLA II (si se prefiere, el vacío puede desactivarse tras cada adición de disolvente). El vacío debe ajustarse a 10 pulgadas (254 mm de Hg) o menos. Deje salir cada mezcla de disolvente a través de la salida "WASTE" a contenedores apropiados hasta el paso de recolección final.

#### Aplicación de muestra:

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

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

#### Tratamiento previo con cartucho C<sub>18</sub>OH:

Los cartuchos C<sub>18</sub>OH deben lavarse con 5 mL de disolución 90:10 (hexano: cloruro de metileno), 5 mL de alcohol isopropílico y 5 mL de metanol antes de utilizarlos por primera vez. Para preparar la mezcla de disolventes 90:10 (hexano: cloruro de metileno) mida 900 mL de hexano y 100 mL de cloruro de metileno. Coloque los cartuchos nuevos, sin utilizar, en el aparato VAC ELUT, ajuste la posición "WASTE" y añada 5 mL de disolución 90:10 (hexano: cloruro de metileno) seguido

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

de 5 mL de alcohol isopropílico y, a continuación, 5 mL metanol. Deje que cada mezcla de disolventes pasa por completo a través de los cartuchos antes de comenzar con la mezcla siguiente. Tras esta preparación inicial no será necesario repetir este paso ya que los cartuchos se regeneran durante el procedimiento de extracción.

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

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

**TABLA II**

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

## 12. SECADO Y RECONSTITUCIÓN DE ELUATOS

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

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

### 13. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

- 13.1 Disponga 12 tubos etiquetados de vidrio de borosilicato de 75 mm en duplicado para cada calibrador (0-5), control y muestra de acuerdo con el esquema del ensayo. Añada con cuidado 75 µL del calibrador reconstituido, extractos de muestras y control en los tubos de ensayo duplicados.  
**PRECAUCIÓN:** Este paso debe realizarse con cuidado ya que solo se dispone de 25 µL de excedente en cada tubo.
- 13.2 Consulte "Secado y reconstitución de eluatos", paso número 4. Añada 75 µL del tubo TC (cuentas totales) en los tubos de ensayo duplicados. Repita este paso para los tubos de ensayo duplicados de NSB.
- 13.3 Añada 300 µL de tampón NSB a los tubos NSB.
- 13.4 Añada 300 µL de anticuerpo primario en todos los tubos excepto los tubos de cuentas totales y de NSB.
- 13.5 Mezcle bien; incube durante 2 horas ( $\pm 15$  minutos) a 20 - 25°C.  
**NOTA:** Reconstituya el complejo de precipitación GAR con 35 mL de agua destilada o desionizada, mezcle bien hasta que la suspensión aparezca homogénea y deje que repose durante un mínimo de 30 minutos antes de utilizar a temperatura ambiente mezclando ocasionalmente antes y durante la utilización.
- 13.6 Añada 500 µL de complejo de precipitación GAR bien mezclado en todos los tubos excepto en los de cuentas totales. Incube durante 20 minutos ( $\pm 5$  minutos) a 20 - 25°C.
- 13.7 Centrifugue todos los tubos durante 20 minutos a 20 - 25°C a 1800 x g\*, salvo los tubos de cuentas totales.
- 13.8 Decante los sobrenadantes (salvo los tubos de cuentas totales) con un portatubos de espuma o equivalente volcando el portatubos en un depósito de residuos adecuado. Coloque el portatubos invertido sobre papel absorbente durante 2-3 minutos. Seque los tubos con cuidado con papel absorbente para asegurar la eliminación de todo el líquido.
- 13.9 Mida la radioactividad contando todos los tubos durante 1 minuto en un contador gamma. Los tubos deben contarse durante al menos 1 minuto (vea la sección Limitaciones del procedimiento).

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

#### 14. COMENTARIOS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

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

#### 15. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe incluir al menos dos controles (uno de rango normal y otro de rango elevado) en cada ensayo para supervisar sus resultados. Pueden utilizarse controles disponibles en el mercado o los dos controles de referencia que se suministran con el equipo.

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

#### 16. CÁLCULO DE RESULTADOS

Hay numerosos métodos para calcular los resultados de los ensayos RIA. Todos tienen como finalidad obtener una curva de calibrado que relacione el alcance de la unión con diferentes concentraciones de los calibradores de calibrado. El gráfico puede tener una escala lineal o logarítmica. Cada uno de estos métodos indica básicamente los mismos valores para controles y muestras, aunque algunos ensayos pueden "ajustarse" mejor a un método determinado que a otro. El método de cálculo del Laboratorio de Control de Calidad de DiaSorin es  $B/B_0$  frente a un método de concentración logarítmica basado en un programa de ajuste de línea estriada alisada.

### 16.1 Cálculo de porcentaje B/B<sub>0</sub>

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

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

### 16.2 Utilización del trazado de la curva de calibrador

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

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

**TABLA IV**  
 Datos de muestras de ensayo RIA 1,25-(OH)<sub>2</sub>D de DiaSorin

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

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

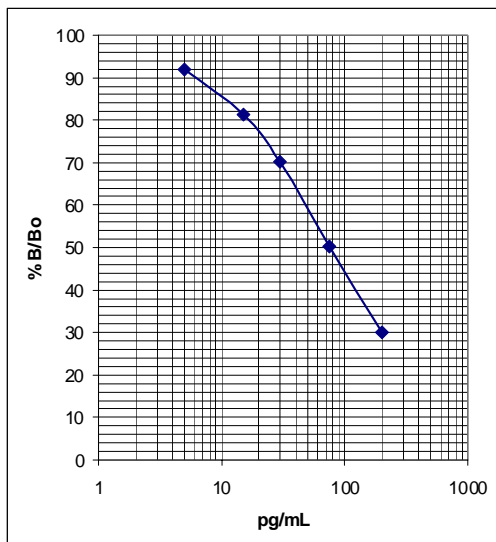


FIGURA 1

#### REDUCCIÓN DE DATOS

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

#### 17. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- 17.1 La frecuencia de las cuentas debería bastar para evitar errores debido a ineficacia del contador (por ejemplo, la acumulación de 2.000 CPM dará como resultado un error del 5%, 10.000 CPM dará como resultado un error del 1%).
- 17.2 Los resultados del ensayo deben utilizarse en combinación con otros datos clínicos y de laboratorio para ayudar al médico a decidir el tratamiento adecuado para cada paciente.
- 17.3 No se han establecido las características del desempeño de este ensayo en poblaciones pediátricas.

#### 18. VALORES PREVISTOS

##### Intervalo de referencia para donantes normales

Es importante que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia con respecto a la población a la que atiende. No obstante, se recogieron valores de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D de 123 voluntarios aparentemente sanos en tres ciudades de la región central de EE.UU. en unos exámenes clínicos realizados en tres lugares durante los meses de verano y otoño. Estos 123 donantes sanos se componían de 37 hombres y 86 mujeres de diferentes razas con edades comprendidas entre los 21 y los 68 años. La media del valor de 1,25-(OH)<sub>2</sub>D de la muestra total (n=123) fue de 43,9 pg/mL. El intervalo de referencia de 95% estimado con un método no paramétrico (siguiendo la directriz C28-A2 de NCCLS<sup>15</sup>) fue 25,1-66,1 pg/mL.

### Pacientes con enfermedad renal en estado terminal

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

## 19. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO ESPECÍFICAS

### 19.1 Precisión

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

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

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

**Linealidad (paralelismo)**

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

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

**RECUPERACIÓN**

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

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

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

### 19.3 Sensibilidad analítica

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

### 19.4 Especificidad analítica

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

Analizado	Conc. a 50% B/Bo	% reactividad cruzada
1,25 D <sub>3</sub>	136 pg/mL	100
1,25 D <sub>2</sub>	125 pg/mL	109
24,25 D <sub>3</sub>	176.000 pg/mL	<0,08
25,26 D <sub>3</sub>	148.000 pg/mL	<0,08
25 D <sub>3</sub>	>>>1 mg/mL	<0,01

### 19.5 SUSTANCIAS QUE INTERFIEREN

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

#### Bilirrubina

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

#### Colesterol

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

**Triglicéridos**

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

**Hemoglobina**

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

**Urea**

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

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

### PROGRAMA DEL ENSAYO

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

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

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

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

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

## KIT <sup>125</sup>I RIA 1,25-DIIDROSSIVITAMINA D

### 1. USO PREVISTO

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Il kit <sup>125</sup>I RIA 1,25-Diidrossivitamina D per l'analisi radioimmunologica ad equilibrio competitivo serve per la determinazione quantitativa di 1,25-diidrossivitamina D (1,25-(OH)<sub>2</sub>-D) nel siero umano o plasma EDTA, nonché per la valutazione della carenza di 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D nei casi di affezioni renali. I risultati delle analisi, unitamente ad altri dati clinici e di laboratorio, serviranno al medico specialista per prendere decisioni per la scelta terapeutica del singolo paziente, facente parte di una popolazione adulta.

### 2. SOMMARIO E SPIEGAZIONI

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

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

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

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

### 3. PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'analisi DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D prevede una procedura a due fasi. È prevista una estrazione preliminare e successiva purificazione dei metaboliti della vitamina D dal siero o dal plasma EDTA mediante l'impiego di cartucce C<sub>18</sub> OH.<sup>10</sup> Dopo l'estrazione, il campione trattato viene analizzato usando una procedura RIA competitiva. Il metodo RIA si basa su un anticorpo policlonale che è specifico sia per 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>2</sub> sia per 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>. Il campione, l'anticorpo e il tracciante vengono incubati per due ore alla temperatura di 20 - 25°C. La separazione di fase avviene dopo un'incubazione di 20 minuti a 20 - 25°C mediante un secondo complesso precipitante gli anticorpi. Dopo

la centrifugazione e la decantazione, la frazione legata che rimane nel precipitato viene misurata con un contatore a raggi gamma. I valori sono calcolati direttamente con una curva di calibrazione di concentrazioni note. La concentrazione finale di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D nei campioni di siero e plasma EDTA è espressa in pg/mL.

#### 4. REAGENTI FORNITI CON IL KIT

TAMPONE NSB 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	1 fiala/ 3 mL
CALIBRATORE 0 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	1 fiala/ 20 mL
CALIBRATORI 1-5 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	5 fiale/3 mL
ANTISIERO 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	1 flacone/35 mL
<sup>125</sup> I 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 fiala/ 10 mL
SOLUZIONE PRETRATTANTE 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 flacone/50 mL
COMPLESSO PRECIPITANTE 1,25-(OH) <sub>2</sub> D GAR	2 fiale/35 mL
SIERO DI CONTROLLO 1,25-(OH) <sub>2</sub> D	2 fiale/3 mL
ETANOLO AL 95%	1 fiala/ 7 mL
Numero di test	100

**CONSERVAZIONE:** Il kit deve essere conservato a 2-8°C. Dopo l'apertura, conservare ogni reagente a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e si riferisce alla data di scadenza del tracciante. Durante la ricostituzione del contenuto delle fiale, mescolare delicatamente al fine di evitare la formazione di schiuma. Conservare tutti i reagenti ricostituiti a -15°C o a temperatura inferiore immediatamente dopo l'uso. Non si devono mescolare reagenti di lotti diversi.

##### 4.1 Tampone NSB 1,25-(OH)<sub>2</sub>D: Reagente pronto all'uso

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

##### 4.2 Calibratore 0 1,25-(OH)<sub>2</sub>D: Reagente pronto all'uso

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

##### 4.3 Calibratori (1-5) 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: Reagente liofilizzato

Cinque calibratori liofilizzati (1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) a concentrazioni varianti fra 5 - 200 pg/mL contenenti siero umano e ProClin 300 (<0,2%). Ricostituire ogni calibratore con 3,0 mL di calibratore zero. Le concentrazioni esatte sono indicate sulle etichette delle fiale. I calibratori di questo kit sono calibrati mediante determinazione quantitativa UV. I calibratori del kit dimostrano commutabilità con i campioni del paziente quando usati con reagenti e con la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, come consigliato.

##### 4.4 Antisiero 1,25-(OH)<sub>2</sub>D: Reagente pronto all'uso

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

##### 4.5 <sup>125</sup>I 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Reagente pronto all'uso

Analogo radio-iodato 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> diluito in un tampone fosfato-glicole etilenico.

##### 4.6 Soluzione pretrattante 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>: Reagente pronto all'uso

Tampone potassio fosfato.

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

Pool di siero umano elaborato, contenente ProClin 300 (<0,2%), a cui sono state aggiunte le quantità necessarie di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D per ottenere concentrazioni di controllo nei range specificati. Il Controllo 1 indica un range normale, mentre il Controllo 2 indica un range elevato. I range previsti, come stabilito da DiaSorin, sono indicati sulle etichette delle fiale.

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

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

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

**NOTA: Per questa procedura è necessario anche l'uso delle cartucce C<sub>18</sub>OH. Le cartucce devono essere ordinate separatamente alla DiaSorin facendo riferimento al numero di catalogo 65101E.**

## 5. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO.

Non per uso interno o esterno su animali o persone.

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

## REAGENTI CONTENENTI MATERIALE DI PROVENIENZA UMANA

### Trattare come potenzialmente infettivi.

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

## REAGENTI CONTENENTI SODIO AZIDE

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

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

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

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

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

**REAGENTI CONTENENTI ETANOLO**

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

R11 - Highly Flammable (altamente infiammabile)

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

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

**REAGENTI CONTENENTI IODIO-125**

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 5,5  $\mu\text{Ci}$  (204kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

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

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

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

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

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

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

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

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

- 6.1 La presenza di particolato anomalo in uno qualsiasi dei reagenti.
- 6.2 Uno sfasamento nella pendenza o posizione della curva di calibrazione rispetto a quella che normalmente si ottiene.
- 6.3 Una diminuzione del legame massimo.
- 6.4 Un legame altamente non specifico.

## 7. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL SIERO E DEL PLASMA

Per l'utilizzo del kit 1,25-Diidrossivitamina D sono richiesti 500 µL di siero o plasma EDTA per eseguire l'estrazione; un volume di 1,5 mL consentirà di ripetere le analisi e di fornire un volume adeguato per le operazioni con la pipetta.

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

Conservare i campioni di siero o plasma a -15°C o a temperatura inferiore. I campioni non devono essere congelati e scongelati più volte. Tuttavia, uno studio eseguito da DiaSorin non ha indicato alcun cambiamento significativo nei valori dopo 3 cicli di congelamento-scongelo dei campioni. I campioni sono stati conservati per un periodo di 6 mesi a -15°C o temperature inferiori senza presentare cambiamenti significativi nei risultati.

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

- 8.1 Cartucce C<sub>18</sub>OH (24 cartucce) ordinabili separatamente con riferimento al numero di catalogo 65101E.
- 8.2 Provette in vetro borosilicato monouso, 12 x 75 mm e 13 x 100 mm.
- 8.3 Portaprovette.
- 8.4 Pellicola o equivalente per coprire le provette.
- 8.5 Portaprovette con alloggiamento in schiuma per la decantazione (o materiale equivalente).
- 8.6 Centrifuga in grado di contenere 12 provette da 75 mm e raggiungere 1800 x g\*.
- 8.7 Contatore a raggi gamma in grado di contare <sup>125</sup>I.
- 8.8 Mixer Vortex.
- 8.9 Dispositivi per operazioni con pipetta:
  - a. Micropipette dosatrici calibrate per inviare 75 µL, 300 µL e 500 µL.
  - b. Dosatori a ripetizione in grado di inviare 50 µL, 300 µL e 500 µL.
  - c. Pipette volumetriche per la ricostituzione dei calibratori, 3,0 mL.
- 8.10 Acqua distillata o deionizzata.

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

**8.11 Solventi organici:**

Sono richiesti i seguenti solventi per la preparazione e l'estrazione dei campioni.

**Usare solo solventi di grado HPLC.**

Non esporre nessun solvente organico ad oggetti in vetro lavati in acidi o a qualsiasi altra condizione acida.

- a. Acetonitrile.
  - b. Metanolo.
  - c. Esano. (IMPORTANTE: la percentuale di n-esano deve essere superiore del 95%)
  - d. Cloruro di metilene (**non** deve contenere alcool come conservante).
  - e. Isopropanolo (2-propanolo).
- 8.12** Dispositivo consigliato per le cartucce C<sub>18</sub>OH:
- a. Stazione di trattamento dei campioni Vac Elut. Tratta 24 colonne per analisi. Disponibile presso Analytichem International o DiaSorin. Per ordinare da DiaSorin, indicare il numero di catalogo 11610.
- 8.13** Materiali necessari per asciugare i campioni:
- a. Azoto.
  - b. Collettore essiccante completo di blocco riscaldante a 37°C (±2°C) o bagno di acqua:  
N-EVAP o MULTI-VAP disponibile presso Organomation Associates (Berlin, MA) o Reacti-Vap II e Reacti-Therm III disponibile presso Pierce Chemical Company (Rockford, IL).

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

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

**PRECAUZIONI:**

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

**PRECAUZIONI:**

Dove richiesto, usare acqua distillata o deionizzata.

**TABELLA I**  
Preparazione del solvente

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

## 10. PROCEDURA DI ESTRAZIONE PRELIMINARE

- 10.1 Ricostituire ogni calibratore liofilizzato con 3,0 mL di calibratore zero. Mescolare bene i calibratori e lasciar riposare per 15 - 20 minuti per garantire la completa ricostituzione. Scongela completamente eventuali reagenti congelati. Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Evitare che i reagenti raggiungano temperature superiori a 25°C. Mescolare bene tutti i reagenti prima dell'uso.
- 10.2 Iniettare con pipetta 500 µL di calibratore (0-5), controllo e campione in 12 provette da 75 mm in vetro borosilicato etichettate.
- 10.3 Aggiungere 500 µL di acetonitrile in ogni campione; agitare ad intermittenza nel Vortex, almeno 3 volte, per un tempo di 10 minuti.
- 10.4 Centrifugare le provette a 760 x g\* per 10 minuti a 20 - 25°C.
- 10.5 Far decantare i liquidi superficiali del campione in 12 provette etichettate da 75 mm o 13 provette da 100 mm (a seconda delle preferenze); scartare i precipitati.
- 10.6 Aggiungere 500 µL di soluzione pretrattante in ogni provetta e agitare nel Vortex.  
**NOTA:** Questo kit serve per eseguire fino a 48 estrazioni complete con calibratori e controlli, più 40 campioni non noti. Ciò significa che si possono estrarre 24 campioni immediatamente su VacElut e la serie rimanente di 24 campioni può essere estratta successivamente. Le estrazioni in colonna devono essere eseguite al più presto possibile dopo l'aggiunta del pretrattante. Tuttavia, una volta estratti in colonna, i campioni possono essere conservati per 96 ore a -15°C o a temperatura inferiore.
- 10.7 I campioni sono pronti per essere versati nelle cartucce C<sub>18</sub>OH.

## 11. PROCEDURA PER LA COLONNA

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

### IMPORTANTE:

#### Uso del vuoto:

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

\*g = (1118 x 10<sup>-8</sup>) (raggio in cm) (rpm)<sup>2</sup>

**Applicazione dei campioni:**

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

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

**Pretrattamento della cartuccia C<sub>18</sub>OH:**

Le cartucce C<sub>18</sub>OH devono essere lavate con 5 mL di 90:10 (esano: cloruro di metilene), 5 mL di IPA e 5 mL di metanolo prima del primo utilizzo. La miscela di solvente 90:10 (esano: cloruro di metilene) può essere preparata misurando 900 mL di esano e 100 mL di cloruro di metilene. Inserire le nuove cartucce intatte nel dispositivo VAC ELUT, regolare sulla posizione "WASTE" ed aggiungere 5 mL di 90:10 (esano: cloruro di metilene) e quindi 5 mL di IPA in ogni colonna, infine 5 mL di metanolo. Lasciare che ogni miscela di solvente passi completamente attraverso le cartucce prima di procedere con la miscela successiva. Dopo questa preparazione iniziale, non sarà più necessario ripetere questa operazione in quanto le cartucce verranno rigenerate durante la procedura di estrazione.

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

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

**TABELLA II**

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

## 12. ESSICCAZIONE E RICOSTITUZIONE DEGLI ELUATI

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

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

### 13. PROCEDURA DI ANALISI

**13.1** Preparare ed etichettare due serie di 12 provette da 75 mm in vetro borosilicato monouso per ogni calibratore (0-5), controllo e campione in base allo schema di analisi. Con cautela, aggiungere 75 µL il calibratore ricostituito, controllo ed estratti di campione nella seconda serie di provette.

**ATTENZIONE:** Questa fase deve essere eseguita con cautela, in quanto ci sono solo 25 µL di eccedenza in ogni provetta.

**13.2** Fare riferimento alla fase 4 di "Essiccazione e ricostituzione degli eluati". Aggiungere 75 µL dalla provetta TC (Total Count, Conteggio totale) nella seconda serie di provette. Ripetere questa operazione anche per la seconda serie di provette NSB.

**13.3** Aggiungere 300 µL di tampone NSB nelle provette NSB.

**13.4** Aggiungere 300 µL di anticorpo primario in tutte le provette, eccetto per le provette per i conteggi totali e NSB.

**13.5** Mescolare bene; lasciare in incubazione per 2 ore ( $\pm 15$  minuti) a 20 - 25°C.

**NOTA:** Ricostituire il complesso precipitante GAR con 35 mL di acqua distillata o deionizzata, mescolare completamente fino a quando la sospensione si presenta omogenea, quindi lasciar riposare per almeno 30 minuti a temperatura ambiente prima dell'uso mescolando occasionalmente prima e durante l'uso.

**13.6** Aggiungere 500 µL di complesso precipitante GAR ben mescolato in tutte le provette, eccetto le provette per il Conteggio totale. Lasciare in incubazione per 20 minuti ( $\pm 5$  minuti) a 20 - 25°C.

**13.7** Centrifugare tutte le provette per 20 minuti a 20 - 25°C a 1800 x g\*, eccetto le provette per il Conteggio totale.

**13.8** Far decantare i liquidi superficiali, eccetto le provette per il Conteggio totale, usando un portaprovette con alloggiamento in schiuma o materiale simile, capovolgendo l'alloggiamento in un contenitore adeguato per i rifiuti. Porre l'alloggiamento capovolto su carta assorbente per 2-3 minuti. Asciugare delicatamente le provette per rimuovere tutto il liquido.

**13.9** Misurare con un contatore a raggi gamma la radioattività contando tutte le provette per 1 minuto. Le provette devono essere contate per almeno 1 minuto (vedere la sezione: Limiti della procedura).

### 14. COMMENTI ALLA PROCEDURA

**14.1** Aggiungere ogni aliquota di reagente al terzo inferiore della provetta di analisi al fine di garantire una miscela completa di reagenti.

**14.2** Proporzioni corrette di solvente sono indispensabili per un buon recupero. Preparare le soluzioni in volumi sufficientemente abbondanti in modo da ridurre errori di misurazione.

**14.3** Se un campione dà una lettura maggiore rispetto al calibratore superiore, il campione dovrà essere analizzato nuovamente diluendolo con il calibratore 0 prima dell'estrazione. I risultati dovranno essere moltiplicati per il fattore di diluizione appropriato. Ad esempio, mescolare 500 µL di campione con 500 µL di calibratore 0, quindi analizzare 500 µL della miscela come da istruzioni allegate.

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

- 14.4** Non è stata osservata alcun drift nel tempo medio necessario per eseguire l'analisi di 100 provette.
- 14.5** Per monitorare completamente la costanza e la validità di un'analisi RIA, si possono controllare altri fattori. DiaSorin consiglia di controllare regolarmente i seguenti parametri per garantire prestazioni costanti del kit.
- a. Conteggi totali
  - b. Legame massimo  
Conteggi medi al minuto (CPM) delle provette del calibratore 0/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
  - c. Legame non specifico  
CPM medio delle provette NSB/CPM medio delle provette per il conteggio totale.
  - d. Pendenza della curva di calibrazione  
Si può monitorare la soppressione al 50%.

## 15. CONTROLLO DI QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe includere almeno due controlli (uno a livello normale ed uno a livello elevato) in ogni analisi per monitorare le performance. Si possono utilizzare i controlli disponibili in commercio o i due controlli di riferimento forniti con il kit.

I controlli devono essere considerati come campioni non noti e analizzati in duplice copia. Conservare le tabelle per il controllo della qualità al fine di verificare le performance dei controlli. Limiti accettabili per le performance verranno stabiliti da ogni singolo laboratorio per ogni livello di controllo utilizzando metodi basati su statistiche ideati per rilevare errori sistematici e casuali. I risultati dei controlli devono corrispondere ai criteri del laboratorio per quanto concerne l'accettabilità prima di riferire i risultati dei test ai pazienti.<sup>12, 13, 14</sup>

## 16. CALCOLO DEI RISULTATI

Esistono molti metodi per calcolare i risultati di analisi RIA, ognuno tende ad ottenere una curva di calibrazione mediante tracciamento dell'estensione del legame rispetto alle concentrazioni indicate dei calibratori per la calibrazione. Il grafico può essere su scala lineare o logaritmica. Ciascun metodo dà essenzialmente gli stessi valori per i controlli e i campioni, anche se certe analisi possono essere più "adatte" per un particolare metodo rispetto ad un altro. Il metodo di calcolo del Laboratorio di controllo qualità di DiaSorin è % di  $B/B_0$  rispetto alla concentrazione logaritmica basata su un programma di retta curvilinea uniforme.

### 16.1 Calcolo della percentuale $B/B_0$

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

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

### 16.2 Uso della curva del calibratore

- a. Utilizzando carta millimetrata per modello log-logit o semi-logaritmica a due cicli, tracciare la percentuale di  $B/B_0$  (%) per i calibratori 1,25 (OH)<sub>2</sub>D sull'asse delle ordinate (asse Y) e la concentrazione del calibratore sull'asse delle ascisse (asse X).

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

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

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

**TABELLA IV**  
Dati campione DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D RIA

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

Curva campione di calibratore DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D RIA

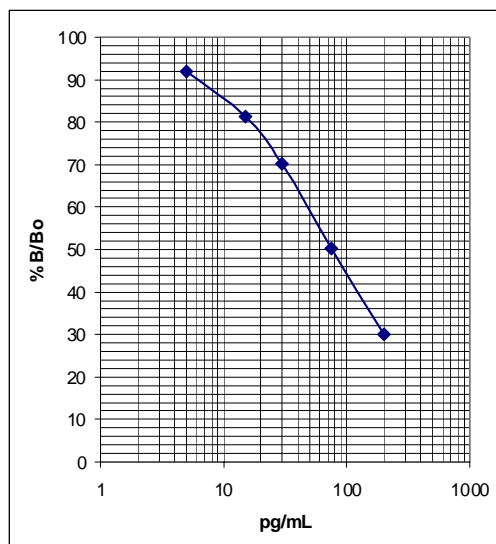


FIGURA 1

#### RIDUZIONE DEI DATI

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

#### 17. LIMITI DELLA PROCEDURA

- 17.1 Il conteggio delle volte dovrebbe essere sufficiente per prevenire l'introduzione di un errore dovuto ad inaccuratezza del contatore (ad esempio, l'accumulo di 2.000 CPM produrrà un errore del 5%, 10.000 CPM produrrà un errore dell'1%).
- 17.2 I risultati delle analisi devono essere usati unitamente ad altri dati clinici e di laboratorio al fine di aiutare il medico specialista a prendere decisioni per la scelta terapeutica del singolo paziente.
- 17.3 Le caratteristiche di efficacia di questa analisi non sono state studiate sulla popolazione pediatrica.

#### 18. VALORI PREVISTI

##### Intervallo di riferimento per donatori normali

È importante che ogni laboratorio stabilisca un intervallo di riferimento proprio, rappresentativo della sua popolazione tipica. Tuttavia, sono stati raccolti valori di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D sulla base di 123 volontari apparentemente sani di tre città centro-occidentali degli Stati Uniti in un trial clinico condotto in tre siti nei mesi estivi e autunnali. Questi 123 donatori sani erano composti da un gruppo di 37 uomini e 86 donne di razze diverse, di età media fra 21 e 68 anni. Il valore medio di 1,25-(OH)<sub>2</sub>D dell'intero campione (n=123) è stato di 43,9 pg/mL. Il 95% dell'intervallo di riferimento valutato con metodo non parametrico (in base alle linee guida NCCLS C28-A2<sup>15</sup>) è stato di 25,1-66,1 pg/mL.

##### Pazienti con insufficienza renale allo stadio finale

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

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

## 19. CARATTERISTICHE SPECIFICHE DELLE PERFORMANCE

### 19.1 Precisione

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

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

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

#### Linearità (Parallelismo)

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

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

## RECUPERO

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

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

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

### 19.3 Sensibilità analitica

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

### 19.4 Specificità analitica

I dati sulla reattività incrociata dell'antisiero utilizzato in questo kit sono espressi come rapporto di concentrazione di 25-OH<sub>2</sub>D<sub>3</sub> rispetto alla concentrazione della sostanza reagente incrociata al 50% di inibizione del legame massimo.

Analita	Conc. A 50% B/Bo	% di reattività incrociata
1,25 D <sub>3</sub>	136 pg/mL	100
1,25 D <sub>2</sub>	125 pg/mL	109
24,25 D <sub>3</sub>	176.000 pg/mL	<0,08
25,26 D <sub>3</sub>	148.000 pg/mL	<0,08
25 D <sub>3</sub>	>>>1 mg/mL	<0,01

### 19.5 Sostanze interferenti

È stato eseguito uno studio sull'interferenza per stabilire se livelli elevati di sostanze endogene comuni possono influire negativamente sui risultati dell'analisi. La valutazione si è basata sulle Linee guida NCCLS (EP7-P).<sup>18</sup> Sono stati testati tre campioni di siero umano contenenti livelli bassi, medi o elevati di 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> con aggiunta o di una sostanza di prova o controllo a cui sono stati aggiunti volumi identici di una sostanza veicolo di prova. Ogni campione è stato estratto due volte ottenendo così quattro replicati. I risultati indicati di seguito dimostrano che non c'è stata alcuna interferenza da parte di nessuna delle sostanze testate, come stabilito da prove statistiche ANOVA (95% di intervallo di certezza), o dal valore medio dei campioni che superava  $\pm 2$  intervalli di deviazione del calibratore trovati per i controlli.

**Bilirubina**

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

**Colesterolo**

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

**Trigliceridi**

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

**Emoglobina**

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

**Urea**

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

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

### SCHEMA DI ANALISI

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

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

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

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

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

## 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D <sup>125</sup>I RIA KIT

### 1. AVSEDD ANVÄNDNING

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

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

### 2. SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING

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

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

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

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

### 3. ANALYSPRINCIP

DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D-testet består av två steg. Först utförs en förberedande extraktion och en rening av D-vitaminmetaboliter från serum eller EDTA-plasma med hjälp av C<sub>18</sub>-OH-kassetter.<sup>10</sup> Efter extraktionssteget testas det behandlade provet med hjälp av ett kompetitivt RIA-test. baserat på en polyklonal antikropp som är specifik för både 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>2</sub> och 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>. Prov, antikroppar och spårämne inkuberas i 2 timmar vid 20 - 25°C. Därefter åstadkommer man en fassetparation genom att inkubera 20 minuter vid 20-25°C i närvaro av ett utfällningskomplex med en sekundär antikropp. Efter centrifugering och dekantering räknas den kvarvarande bundna fraktionen i pelleten i gammarräknare. Värdena beräknas direkt från en kalibreringskurva med kända halter. Den slutliga halten 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D i proverna anges i pg/mL.

#### 4. REAGENS I FÖRPACKNINGEN

1,25-(OH) <sub>2</sub> D NSB-BUFFERT	1 flaska à 3 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D KALIBRERINGSLÖSNING O	1 flaska à 20 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> KALIBRERINGSLÖSNING 1-5	5 flaskor à 3 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D ANTISERUM	1 flaska à 35 mL
<sup>125</sup> I 1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1 flaska à 10 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> FÖRBEHANDLINGSLÖSNING	1 flaska à 50 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D GAR UTFÄLLNINGSKOMPLEX	2 flaskor à 35 mL
1,25-(OH) <sub>2</sub> D KONTROLLSERUM	2 flaskor à 3 mL
95 % ETANOL	1 flaska à 7 mL
Antal test	100

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

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

**4.11,25-(OH)<sub>2</sub>D NSB-buffert:** Reagens färdigt för användning

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

**4.21,25-(OH)<sub>2</sub>D O Kalibreringslösning:** §§Reagens färdigt för användning

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

**4.31,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Kalibreringslösningar (1-5):** Frystorkade reagens

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

**4.41,25-(OH)<sub>2</sub>D Antiserum:** Reagens färdigt för användning

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

**4.5<sup>125</sup>I 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** Reagens färdigt för användning

1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-analog inmärkt med radioaktivt jod och upplöst i en etylenglykolfosfatbuffert.

**4.61,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> Förbehandlingslösning:** Reagens färdigt för användning

Kaliumfosfatbuffert.

**4.71,25-(OH)<sub>2</sub>D-kontroller: Nivå 1 (normal), Nivå 2 (förhöjd):** Reagens färdigt för användning

En behandlad humanserumpool som innehåller ProClin 300 (<0,2%) och till vilken tillsats skett av lämpliga mängder 1,25-(OH)<sub>2</sub>D för att erhålla kontrollhalter inom de angivna gränserna. Kontroll 1 ligger inom normalområdet, medan kontroll 2 har ett förhöjt värde. Områden för förväntat mätresultat vid bestämning med DiaSorin anges på etiketten till varje flaska.

**4.8Fällningskomplex av typen anti-kaninserum från get (GAR):** Frystorkat reagens Normalt kaninserum, som förutfällts med anti-kaninserum från get och polyetylen glykol (PEG), späds med BSA-boratbuffert med tillsats av 0,1% natriumazid och andra konserveringsmedel (frystorkat). Rekonstituera flaskans innehåll med 35 mL destillerat eller avjoniserat vatten; blanda grundligt tills suspensionen verkar homogen och låt det sedan stå minst 30 minuter i rumstemperatur. Blanda om då och då.

**4.995% etanol:** Reagens färdigt för användning  
95% etanol och 5% vatten.

**OBS! C<sub>18</sub> Även OH-kassetter krävs för denna testprocedur, och måste beställas separat. Ange DiaSorins katalognummer 65101E.**

## 5. VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

FÖR DIAGNOSTISKT BRUK IN VITRO.

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

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

### REAGENS SOM INNEHÅLLER MATERIAL AV HUMANT URSPRUNG

**Behandlas som potentiellt smittfarligt.**

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

### REAGENS SOM INNEHÅLLER NATRIUMAZID

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

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

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

R32 - Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

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

## REAGENS SOM INNEHÅLLER ETANOL

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

R11 - Mycket brandfarligt

S16 - Förvaras åtskilt från antändningskällor - Rökning förbjuden

S43 - Vid brandsläckning använd pulver eller koldioxid

## REAGENS SOM INNEHÅLLER JOD-125

Satsen innehåller radioaktivt material som ej överstiger 5,5  $\mu\text{Ci}$  (204 kBq) jod-125. Adekvata försiktighetsåtgärder måste vidtas och god laboratoriepraxis följas vid förvaring, hantering och kassering av detta material.

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

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

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

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

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

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

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

## 6. TECKEN SOM KAN TYDA PÅ EN KVALITETFÖRSÄMRING HOS

### REAGENSEN I SATSEN

- 6.1 Förekomst av onormalt partikelformigt material i något av reagensen.
- 6.2 En förändring av kalibreringskurvans läge eller lutning jämfört med vad som erhålls normalt.
- 6.3 En sänkning av maximal bindning.
- 6.4 En hög ospecifik bindning

## 7. PROVTAGNING OCH HANTERING AV SERUM OCH PLASMA

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

Satsen kan användas både med humant serum och human plasma. EDTA kan användas som antikoagulanstillägg med denna assay. Fasteprov rekommenderas men är ej ett krav. Blodprovet bör tas med aseptisk teknik genom venpunktion med ett 5 eller 10 mL rör av vacutainertyp. För att få serum låter man blodet koagulera i rumstemperatur (15-25°C). Centrifugera i 15 minuter vid cirka 760 x g\* så att hemolysfria serumprover erhålles. Inga tillsatser eller konserveringsmedel behövs för att bibehålla intakta prover. Alla plastartiklar, glasvaror och annan materiel som kommer i kontakt med provet måste vara fullkomligt fria från kontaminerande material.

Serum- eller plasmaprover kan lagras vid -15°C eller lägre. Proverna får ej frysas och tinas flera gånger; ingen signifikant förändring av värdena sågs dock i en studie genomförd av DiaSorin, där proverna genomgick 3 cykler med frysning-upptining. DiaSorin har lagrat prover i upp till 6 månader vid -15°C eller lägre utan någon signifikant förändring av resultaten.

## 8. EJ TILLHANDAHÅLLEN MEN NÖDVÄNDIG UTRUSTNING OCH MATERIEL

- 8.1 C<sub>18</sub>OH-kassetter (24 kassetter), som beställs separat med DiaSorins katalognummer 65101E.
- 8.2 Engångs borosilikatglasrör, 12 x 75 mm och 13 x 100 mm.
- 8.3 Provrörsställ.
- 8.4 Parafilm eller motsvarande för att täcka över provrören.
- 8.5 Frigolitställ eller motsvarande för dekantering.
- 8.6 Centrifug med plats för 12 x 75 mm-rör och möjlighet att uppnå 1800 x g\*.
- 8.7 Gammaräknare som kan räkna <sup>125</sup>I.
- 8.8 Vortex-blandare.
- 8.9 Pipetteringshjälpmedel:
  - a. Mikropipetter kalibrerade för 75 µL, 300 µL och 500 µL.
  - b. Repeterande dispensorer för 50 µL, 300 µL och 500 µL.
  - c. Mätpipetter för rekonstituering av kalibreringslösningar; 3,0 mL.
- 8.10 Avjoniserat eller destillerat vatten.
- 8.11 Organiska lösningsmedel:

Följande lösningsmedel behövs för att förbereda och extrahera proverna.

**Använd endast lösningsmedel av HPLC-kvalitet.**

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

  - a. Acetonitril.
  - b. Metanol.
  - c. Hexan. (VIKTIGT! halten n-hexan måste vara minst 95%)
  - d. Metylenklorid (får ej innehålla alkohol som konserveringsmedel).
  - e. Isopropanol (2-propanol).
- 8.12 Rekommenderad apparat för C<sub>18</sub>OH-kassetterna:
  - a. Vac Elut provbehandlingsstation. Behandlar 24 kolonner per körning. Kan beställas från Analytichem International eller DiaSorin. Vid beställning från DiaSorin används DiaSorins katalognummer 11610.

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

8.13 Erforderlig materiel för torkning av prover:

- a. Kvävgas.
- b. Torkgrenrör med 37°C (±2°C) värmeblock eller vattenbad:  
N-EVAP eller MULTI-VAP som kan beställas från Organomation Associates (Berlin, Massachusetts, USA) eller Reacti-Vap II och Reacti-Therm III som kan beställas genom Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois, USA).

## 9. BEREDNING AV ORGANISKA LÖSNINGSMEDEL FÖR KOLONNEXTRAKTIONEN

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

### FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

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

### FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER:

Använd destillerat eller avjoniserat vatten i förekommande fall.

**TABELL I**  
Beredning av lösningsmedel

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

## 10. FÖRBEREDANDE EXTRAKTIONSPROCEDUR

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

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

- 10.6** Tillsätt 500 µL förbehandlingslösning till varje rör och vortexa.  
OBS! Satsen räcker till maximalt 48 extraktioner, vilket innebär 40 okända prover förutom kalibreringslösningar och kontroller. Således kan 24 prover extraheras genast på VacElut-enheten och de återstående 24 senare. Kolonnextraktionerna skall utföras så snart som möjligt efter det att förbehandlingslösningen tillsatts. När kolonnextraktionen väl har utförts kan dock proverna lagras i 96 timmar vid -15°C eller lägre.
- 10.7** Proverna är nu klara att applicera på C<sub>18</sub>OH-kassetterna.

## 11. KOLONNPROCEDUR

- 11.1** I bruksanvisningen till VAC ELUT finns en beskrivning av hur den fungerar. Sätt ihop stationen enligt anvisningarna.
- 11.2** Märk upp ett 13 x 100 mm borosilikatglasrör för varje kalibreringslösning (0-5), kontroll och okänt prov. Sätt i rören i VAC ELUT. Kontrollera att locket på VAC ELUT är i läge "WASTE" och att rören är placerade så att de samlar upp rätt eluat. Placera C<sub>18</sub>OH-kassetterna på VAC ELUT-locket.
- 11.3** Tillsätt lösningsmedelsblandningarna till angiven kassett enligt tabell II.

### VIKTIGT!

#### Användning av vakuüm:

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

#### Applicering av prov:

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

#### Förbehandling av C<sub>18</sub>OH-kassetterna:

C<sub>18</sub>OH-kassetterna skall tvättas med 5 mL hexan-metylenklorid (90:10), 5 mL IPA och 5 mL metanol innan de används första gången. Hexan-metylenkloridblandningen (90:10) kan beredas genom att man mäter upp 900 mL hexan och 100 mL metylenklorid. Placera de nya, oanvända kassetterna på VAC ELUT-apparaten, ställ den i läge "WASTE" och tillsätt 5 mL hexan-metylenklorid (90:10) till varje kolonn, följt av 5 mL IPA och slutligen 5 mL metanol. Låt varje lösningsmedelsblandning passera helt genom kassetterna innan du går vidare med nästa blandning. När man på detta sätt förberett de nya kassetterna behöver man i fortsättningen inte upprepa detta steg, eftersom kassetterna regenereras under extraktionen.

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

**OBS!** Materialet i C<sub>18</sub>OH-kassetterna hålls på plats av en porös fiberfrita. Kassera kassetter där fibrer i frittan är lösa eller saknas eftersom C<sub>18</sub>OH-material kan gå förlorat.

**TABELL II**

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

## 12. TORKNING OCH REKONSTITUERING AV ELUATEN

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

### 13. TESTPROCEDUR

- 13.1 Gör i ordning märkta 12 x 75 mm engångs borosilikatglasrör för dubbelprover för varje kalibreringslösning (0-5), kontroll och prov enligt testschemat. Pipettera noggrant 75 µL rekonstituerat extrakt av kalibreringslösning, kontroll eller prov till respektive rör.  
**FÖRSIKTIGT!**: Var mycket noggrann vid detta steg, eftersom det bara finns 25 µL extra i varje rör.
- 13.2 Se "Torkning och rekonstituering av eluaten" steg 4. Pipettera 75 µL från röret för TA (total aktivitet) till motsvarande dubbla assayrör. Gör på motsvarande sätt med NSB-rören.
- 13.3 Tillsätt 300 µL NSB-buffert till NSB-rören.
- 13.4 Tillsätt 300 µL primär antikropp till alla rör utom rören för total aktivitet och NSB.
- 13.5 Blanda väl; inkubera 2 timmar ( $\pm 15$  minuter) vid 20 - 25°C.  
**OBS!** Rekonstituera GAR utfällningskomplex med 35 mL destillerat eller avjoniserat vatten, blanda grundligt tills suspensionen ser homogen ut och låt den sedan stå i minst 30 minuter i rumstemperatur innan den används. Blanda om då och då före och under användning.
- 13.6 Tillsätt 500 µL välblandat GAR utfällningskomplex till alla rör utom totalaktivitetsrören. Inkubera 20 minuter ( $\pm 5$  minuter) vid 20 - 25°C.
- 13.7 Centrifugera alla rör i 20 minuter vid 20 - 25°C och 1800 x g\*, utom totalaktivitetsrören.
- 13.8 Dekanterar supernatanterna, utom från totalaktivitetsrören. Använd ett frigolitställ eller liknande och vänd det upp-och-ner över lämpligt avfallskärl. Ställ det upp-och-ner-vända stället på absorberande papper i 2-3 minuter. Tryck försiktigt ett filterpapper mot mynningen på rören så att all vätska säkert sugs upp.
- 13.9 Mät radioaktiviteten genom att räkna alla rör 1 minut i en gammarräknare. Rören måste räknas i minst 1 minut (se avsnittet Metodbegränsningar).

### 14. KOMMENTARER TILL PROCEDURERNA

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

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

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

**a. Totalaktivitet**

**b. Maximal bindning**

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

**c. Ospecifik bindning**

CPM-medelvärdet för NSB-rören/CPM-medelvärdet för totalaktivitetsrören.

**d. Kalibreringskurvans lutning**

Nivån för 50 % hämning kan följas.

**15. KVALITETSKONTROLL**

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

Kontrollerna ska behandlas exakt som okända prover och köras som duplikat. Man bör kontinuerligt föra in kontrollvärdena i diagram för att kunna följa hur väl kontrollerna ligger. Godtagbara områden för varje kontroll bör fastställas av varje enskilt laboratorium med hjälp av statistiska metoder för att påvisa både slumpmässiga och systematiska fel. Resultaten för kontrollerna måste uppfylla laboratoriets kriterier för godkännande innan patientprovresultaten rapporteras.<sup>12,13,14</sup>

**16. RESULTATBERÄKNING**

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

**16.1 Beräkning av procent B/B<sub>0</sub>**

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

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

**16.2 Den uppritade kalibreringskurvan**

- Använd ett lin-log-papper över två tiopotenser eller log-log-papper och plotta procent B/B<sub>0</sub> (%) förkalibreringslösningarna på den lodräta axeln (y-axeln) mot kalibreringslösningarnas koncentration på den vågräta axeln (x-axeln).

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

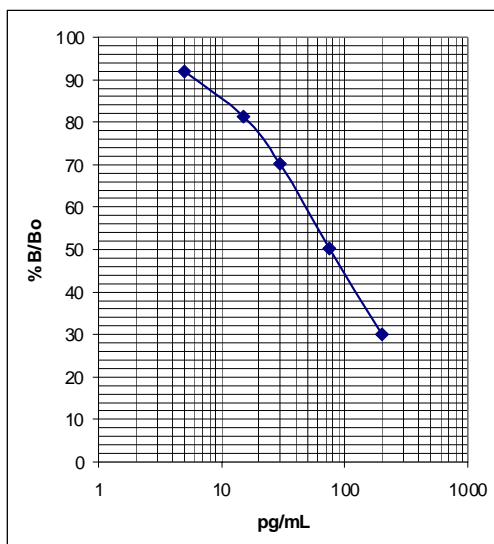
- b. Rita en bästa anpassad linje genom punkterna.
- c. Använd kurvan för att avläsa 1,25-(OH)<sub>2</sub>D-halterna i proverna.
- d. Om ett okänt prov har späts, korrigerar man för spädningsfaktorn.
- e. Det rapporterbara området för assayen är 5,0 pg/mL - 200 pg/mL. Eventuella värden som ligger under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

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

**TABELL IV**  
Exempeldata för DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D-RIA

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

Exempel på kalibreringskurva för DiaSorin 1,25-(OH)<sub>2</sub>D-RIA



FIGUR 1

#### DATAREDUKTION

DiaSorins kvalitetskontrolllaboratorium använder en mjuk anpassning till SPLINE-funktioner.

#### 17. METODBEGRÄNSNINGAR

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

#### 18. FÖRVÄNTADE VÄRDEN

##### Referensområde för friska blodgivare

Det är viktigt att varje laboratorium upprättar ett eget referensområde som är representativt för det typiska patientunderlaget vid laboratoriet. Det har dock genomförts en klinisk studie där man under sommar- och höstmånaderna samlade 1,25-(OH)<sub>2</sub>D-värden från 123 friska frivilliga i tre städer i amerikanska Mellanvästern.

Dessa

123 friska blodgivare utgjorde en rasmässigt blandad grupp med 37 män och 86 kvinnor mellan 21 och 68 år. Medelvärdet för 1,25-(OH)<sub>2</sub>D-halten för hela gruppen (n=123) låg på 43,9 pg/mL. Det 95-procentiga referensintervallet, uppskattat med en icke-parametrisk metod (enligt NCCLS:s riktlinje C28-A2<sup>15</sup>), var 25,1-66,1 pg/mL.

### Patienter med terminal njursjukdom

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

## 19. SPECIFIKA PRESTANDA

### 19.1 Precision

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

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

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

#### Linearitet (parallellitet)

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

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

#### UTBYTE

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

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

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

### 19.3 Analytisk känslighet

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

### 19.4 Analytisk specificitet

Data för korsreaktiviteten för det antiserum som används i satsen uttrycks som kvoten mellan koncentrationen av 1,25-OH<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> och koncentrationen av det korsreagerande ämnet vid 50 % hämning av maximal bindning.

Analyt	Konc. Vid 50% B/Bo	% korsreaktivitet
1,25 D <sub>3</sub>	136 pg/mL	100
1,25 D <sub>2</sub>	125 pg/mL	109
24,25 D <sub>3</sub>	176.000 pg/mL	<0,08
25,26 D <sub>3</sub>	148.000 pg/mL	<0,08
25 D <sub>3</sub>	>>>1 mg/mL	<0,01

### 19.5 Interfererande ämnen

En studie av potentiella interfererande ämnen genomfördes för att fastställa om höga halter av vanliga endogena substanser kan påverka assayresultaten negativt. Utvärderingen följde NCCLS:s riktlinjer (EP7-P).<sup>18</sup> Tre prover baserade på humant serum och med låga, medelhöga eller höga halter av 1,25-(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub> testades antingen med tillsats av det testade ämnet eller som kontroller med tillsats av samma volym av den buffert som det testade ämnet var löst i. Varje prov extraherades två gånger, vilket gav fyrdubbla assayprover. Resultaten nedan visar att det inte föreligger någon interferens från något av de testade ämnena, vilket fastställdes genom statistisk analys med ANOVA (95% konfidensintervall), eller genom att medelvärdet för proverna med tillsats avvek från kontrollerna med mer än  $\pm 2$  standardavvikelser för kalibreringslösningarna.

#### Bilirubin

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

#### Kolesterol

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

**Triglycerider**

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

**Hemoglobin**

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

**Urea**

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

**FÖR REFERENSER HÄNVISAS TILL SISTA SIDAN**

### LATHUND FÖR TESTET

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

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

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










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

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

**REFERENCES/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAFIA/  
REFERENSER**











1. Haddad, J.G. and T.C.B. Stamp, "Circulating 25-Hydroxyvitamin D in Man," **American Journal of Medicine**, 57: 57, (1974).
2. Holick, M.F., "The Cutaneous Photosynthesis of Previtamin D<sub>3</sub>: A Unique Photo-endocrine System," **Journal of Investigative Dermatology**, 76: 51, (1981).
3. Harrison, J.E., A.J.W. Hitchman, G. Jones, C.S. Tam and J.N.M. Heersche, "Plasma Vitamin D Metabolite Levels in Phosphorus Deficient Rats During the Development of Vitamin D Deficient Rickets," **Metabolism**, 31 (11): 1121, (1982).
4. DeLuca, H.F., "The Vitamin D Systems: A View From Basic Science to the Clinic," **Clinical Biochemistry**, 14: 213, (1981).
5. Norman, A.W. and F.P. Roos, "Vitamin D Seco-Steroids: Unique Molecules with Both Hormone and Possible Membranophilic Properties," **Life Science**, 24: 759, (1979).
6. DeLuca, H.F. and H.K. Schnoes, "Metabolism and Mechanism of Action of Vitamin D," **Annual Reviews Biochemistry**, 45: 631, (1976).
7. Aarskog, D., L. Aksnes and T. Markestad, "Effect of Parathyroid Hormone on Vitamin D Metabolism in Osteoporosis," **Pediatrics**, 68 (1): 109, (1981).
8. Chesney, R.W., "Current Clinical Applications of Vitamin D Metabolite Research," **Clinical Orthopedics and Related Research**, 161: 285, (1981).
9. Sorensen, O.H., B. Lumholtz, B. Lund, I. Hjelmstrand, L. Mosekilde, F. Melsen, J.E. Bishop and A.W. Norman, "Acute Effects of Parathyroid Hormone on Vitamin D Metabolism in Patients with the Bone Loss of Aging," **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 54 (6): 1258, (1982).
10. Hollis, B.W., "Assay of Circulating 1,25-dihydroxyvitamin D Involving a Novel Single-Cartridge Extraction and Purification Procedure," **Clinical Chemistry**, 32 (11): 2060, (1986).
11. Lissner, D., R.S. Mason and S. Posen, "Stability of Vitamin D Metabolites in Human Blood Serum and Plasma," **Clinical Chemistry**, 27 (5): 773, (1981).
12. Tonks, D.B., "A Study of the Accuracy and Precision of Clinical Chemistry Determinations in 170 Canadian Laboratories," **Clinical Chemistry**, 9: 217, (1963).
13. Rodbard, D., et. al., "Statistical Quality Control of Radioimmunoassays," **The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, 28: 1412, (1968).
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Internal Quality Control Testing: Principles and Definitions, Approved Guideline, **NCCLS** document C24-A (ISBN 1-56238-112-1), NCCLS, 771 East Lancaster Avenue, Villanova, PA, 19085, (1991).
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory, 2<sup>nd</sup> ed." **NCCLS** Document C28-A2, 20(13) Approved Guideline, (2000).
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices," **NCCLS** Document EP5-A, 19(2), Approved Guideline, (1999).
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Analytical Methods: Performance of Clinical Chemistry Devices," **NCCLS** Document EP6-P, 6(18), Proposed Guideline, (1996).
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards, "Interference Testing in Clinical Chemistry," **NCCLS** Document EP7-P, 6(13), Proposed Guideline, (1986).

### SYMBOLS USED WITH DEVICES

	English	Français	Deutsch	Español	Italiano
	European Conformity	Conformité aux normes européennes	CE – Konformitätskennzeichnung	Conformidad europea	Conformità europea
	Expiration Date	Date limite d'utilisation	Mindesthaltbarkeitsdatum	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Fabricant	Hersteller	Fabricante	Fabbricante
	Consult Instructions for Use	Consulter les instructions d'utilisation	Gebrauchsanweisung beachten	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
<b>IVD</b>	In vitro diagnostic.	Diagnostic in vitro.	In-vitro-Diagnostikum.	Diagnóstico in vitro.	Diagnostica in vitro.
<b>LOT</b>	Lot No.	No. de lot	Chargen-Nr.	Número de lote	Lotto n°
	Maximum temperature	Température maximale	Höchsttemperatur	Temperatura máxima	Temperatura massima
	Temperature limitation.	Limitation de température.	Temperaturbereich	Limitación de temperatura	Limite della temperatura
<b>Ab</b>	Antiserum	Antisérum	Antiserum	Antisero	Antisiero
<b>Ab PEG</b>	Precipitating reagent	Réactif précipitant	Fällungsreagenz	Reactivo precipitante	Reagente precipitante
<b>Ag</b> <sup>125</sup> I	Tracer: antigen labelled with <sup>125</sup> I	Traceur : antigène marqué à l'iode <sup>125</sup>	Tracer: <sup>125</sup> I-markiertes Antigen	Trazador: antígeno etiquetado con <sup>125</sup> I	Tracciatore: antigene etichettato con <sup>125</sup> I
<b>BUF</b>	Buffer	Tampon	Puffer	Tampón	Tampone
<b>CAL</b>	Calibrator	Étalon	Kalibrator	Calibrador	Calibratore
<b>CONTROL</b>	Control serum	Sérum de contrôle	Kontrollserum	Suero de control	Siero di controllo
<b>REAG</b>	Reagent	Réactif	Reagenz	Reactivo	Reagente
	Radioactive	Radioactif	Radioaktiv	Radioactivo	Radioattivo
	Highly flammable	Facilement inflammable	Leichtentzündlich	Fácilment inflamable	Facilment infiammabile
	Harmful	Nocif	Mindergiftig	Nocivo	Nocivo

SYMBOLS USED WITH DEVICES CONTINUED ON NEXT PAGE.

CONTINUED FROM PREVIOUS PAGE - SYMBOLS USED WITH DEVICES

	Svenska
	Europeisk överensstämmelse
	Utgångsdatum
	Tilverkare
	Se bruksanvisningen
<b>LOT</b>	Diagnostik in vitro.
	Batch-nummer
	Max. temperatur
<b>Ab</b>	Temperaturbegränsning.
<b>Ab</b>   <b>PEG</b>	Antiserum
<b>Ag</b> <sup>125</sup> I	Utfällningsreagens
<b>BUF</b>	Spårelement: antigen betecknad med <sup>125</sup> I
<b>CAL</b>	Buffert
<b>CONTROL</b>	Kalibrator
<b>REAG</b>	Kontrollserum
	Reagens
	Radioaktiv
	Mycket brandfarligt
	Skadligt



DiaSorin Inc.  
1951 Northwestern Avenue  
P.O. Box 285  
Stillwater, MN 55082-0285



DiaSorin S.p.A.,  
13040 Saluggia (VC) Italy

Phone: 651-439-9710  
FAX: 651-351-5669

For Customer Service in the  
U.S. and Canada Call Toll Free:  
800-328-1482

In the United Kingdom Call:  
44 118 9364200  
FAX: 44 118 9792061

13161E

27735  
1/04

PRINTED IN U.S.A.

