REF AA-35F1 IVD CE

1. Intended Use

For In Vitro Diagnostic Use

The IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA kit is a liquid phase radioimmunoassay intended for the quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D (25-OH D) and other hydroxylated metabolites in human serum or plasma. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in the assessment of vitamin D sufficiency.

2. Summary and Explanation

Vitamin D is a commonly used collective term for a family of closely related seco-steroids. Upon exposure to sunlight, 7-dehydro-cholesterol, located deep in the actively growing layers of the epidermis, undergoes photolytic cleavage of the "B" ring to yield pre-vitamin D_3 which is isomerised to vitamin D_3 (cholecalciferol). Vitamin D_3 and vitamin D_2 (ergocalciferol) may also be obtained by dietary supplementation or from a limited number of foods. Vitamin D_2 is metabolised in a similar way to vitamin D_3.

Vitamin D is stored in adipose tissue and enters the circulation bound to vitamin D binding protein (VDBP) and albumin. In the liver, vitamin D is hydroxylated to give 25-hydroxyvitamin D which also circulates as a complex with VDBP. A small proportion of the 25-OH D is further hydroxylated in the kidney, under direct regulation by parathyroid hormone and ionised calcium levels, to form the biologically-active calcitropic hormone 1,25-dihydroxyvitamin D. Further hydroxylation and metabolism of vitamin D produces compounds that are water soluble and readily excreted.

Hepatic vitamin D 25-hydroxylase activity is not tightly regulated, and changes in cutaneous production of vitamin D_3, or ingestion of vitamin D (D_3 or D_2), will result in changes in circulating levels of 25-OH D [(1)].

Serum concentration of 25-OH D is considered to be the most reliable measure of overall vitamin D status and thus can be used to determine whether a patient is vitamin D sufficient [(2)]. Assessment of vitamin D status may be required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients.

3. Method Description

The IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA kit is a complete assay procedure for the extraction and quantitation of 25-OH D and other hydroxylated metabolites in serum or plasma. Addition of Extraction Reagents 1 and 2 to samples and calibrators, causes precipitation of serum proteins and extraction of 25-OH D. Following centrifugation, portions of the supernatant are incubated with ^{125}I-labelled 25-OH D and a highly-specific sheep antibody to 25-OH D. Separation of antibody-bound tracer from free is achieved by a short incubation with Sac-Cel® (anti-sheep IgG cellulose) followed by centrifugation and decanting. Bound radioactivity is inversely proportional to the concentration of 25-OH D.

4. Warnings and Precautions

The IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IDS Limited will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) howsoever caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: **this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.** Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Radioactive Materials

- This kit contains radioactive material (Iodine-125; $T_{½}$=60.14d; γ 35.5 KeV; X 27-32 KeV). Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in storage, handling and disposal of material. Radioactive material must be received, acquired, possessed and used only by physicians, clinical laboratories or hospitals, and only for in vitro laboratory tests. Its receipt, acquisition, possession, use and transfer are subject to local regulations.
- Store radioactive materials in the original container, in a specifically designated, properly labelled area. Access to radioactive materials must be limited to authorised personnel only.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in areas where radioactive materials are stored or handled. Do not pipette radioactive material by mouth.
- Always wear a protective laboratory coat and disposable gloves when handling radioactive materials. Wash hands thoroughly afterwards.

- Areas where spills occur should be wiped immediately with suitable absorbent material, which should then be disposed of as radioactive waste. The contaminated area should then be washed using an alkaline detergent or radiological decontamination solution.
- Disposal of radioactive material should be in accordance with local regulations.
- Persons under 18 should not be permitted to handle radioactive material or enter radioactive areas.
- Radioactive areas must be kept clean. Use disposable or easily decontaminated laboratory ware and absorbent covers on laboratory bench surfaces to minimise contamination.

Acetonitrile

Extraction Reagent 2 [REAG] [2] contains acetonitrile.

Classification under CLP:
Acute Tox. 4
Eye Irrit. 2
Flam. Liq. 2

Hazard statements:		Precautionary statements:	
H225:	Highly flammable liquid and vapour.	P260:	Do not breathe dust/fumes/gas/mist/vapours/spray.
H302+312+332:	Harmful if swallowed, in contact with skin or if inhaled.	P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
H319:	Causes serious eye irritation.	P303+361+353:	IF ON SKIN (or hair): Remove immediately all contaminated clothing.Rinse skin with water.
		P301+310:	IF SWALLOWED: Immediately call a POISON CENTER or doctor.
		P304+340:	IF INHALED: Remove victim to fresh air and keep at rest in a position comfortable for breathing.

Sodium Azide

Some reagents in this kit contain sodium azide as a preservative, which may react with lead, copper or brass plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build up.

Sodium Hydroxide solution (<1%)

Extraction Reagent 1 [REAG] [1] contains sodium hydroxide solution (<1%).

Classification under CLP:
Eye Irrit. 2
Skin Irrit. 2

Hazard statements:		Precautionary statements:	
H315:	Causes skin irritation.	P264:	Wash hands thoroughly after handling.
H319:	Causes serious eye irritation.	P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
		P305+351+338:	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
		P332+313:	If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
		P337+313:	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.
		P362:	Take off contaminated clothing and wash before reuse.

Human Serum

Calibrators [CAL] and Controls [CTRL]

Human material used in the preparation of this product has been tested by FDA recommended assays for the presence of antibody to Human Immunodeficiency Virus (HIV 1 and II), Hepatitis B surface antigen, antibody to Hepatitis C, and found negative. As no test can offer complete assurance that infectious agents are absent, the reagents should be handled in accordance at Biosafety Level 2.

5. Shelf Life and Storage of Reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C.

Indications of possible deterioration of kit reagents

- The presence of abnormal particulate matter in any of the reagents
- A decrease in the maximum binding.
- A high non-specific binding.
- A shift in the slope of the curve from its normal position.

6. Specimen Collection and Storage

The assay should be performed using serum or plasma (EDTA or heparin) specimens. Specimens should be separated as soon as possible after collection. For long term storage, store at -20°C. Avoid repeated freeze/thaw of samples.

The specimens storage and stability information stated above are general recommendations for use in a variety of settings of laboratories. Each laboratory should follow the guidelines or requirements of local, state, and/or federal regulations or accrediting organisations to establish its own specimens handling and storage stability. For guidance on appropriate practices, please refer to the CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline – Fourth Edition

7. Materials

Materials Provided

CAL 0-6 - Calibrators:	Human serum containing 25-hydroxyvitamin D and 0.09% sodium azide, 1 mL per bottle, 7 bottles per kit.
Ab - Antiserum:	Sheep anti-25-hydroxyvitamin D in phosphate buffer with 0.09% sodium azide, 52 mL per bottle, 2 bottles per kit.
Ag ^{125}I - ^{125}I 25-Hydroxy Vitamin D:	^{125}I 25-hydroxyvitamin D in phosphate buffer with 0.09% sodium azide and proprietary stabilisers. Radioactive content <185 kBq (5 µCi) per bottle, 10.5 mL per bottle.
Sac-Cel® :	Anti-sheep IgG coupled to cellulose suspended in buffer with 0.09% sodium azide, 11 mL per bottle.
CTRL 1 - 2 - Controls:	Human serum containing 25-hydroxyvitamin D and 0.09% sodium azide, 1 mL per bottle, 2 bottles per kit.
REAG 1 - Extraction Reagent 1:	Solution containing sodium hydroxide, <1%; 5 mL per bottle.
REAG 2 - Extraction Reagent 2:	Solution containing acetonitrile, 26 mL per bottle.
BUF - NSB Buffer:	Phosphate buffer containing 0.09% sodium azide, 8 mL per bottle.
WASHBUF 20x - Wash Concentrate:	Phosphate buffered saline containing Tween, 25 mL per bottle.

Materials Required but not Provided

- Disposable 12 x 75 mm borosilicate glass tubes.
- *Note: plastic tubes are not suitable. Do not reuse tubes.*
- Precision pipetting devices to deliver 50 µL, and 1 mL.
- Repeating pipettes to deliver 50 µL, 100 µL, 500 µL, 1 mL and 3 mL., e.g. Eppendorf Multipipette 4780, or similar.
- Vortex mixer.
- Centrifuge capable of achieving 2000 g. *A refrigerated centrifuge is preferred, but not required.*
- Decanting rack, e.g. Nalgene 5970-0013+5979-0013 or similar.
- Gamma counter capable of counting ^{125}I.

8. Preparation of Reagents

8.1 Allow all reagents to come to room temperature before use.

8.2 Reagents should be mixed by repeated inversion prior to use in the assay

8.3 **Wash Solution WASHBUF SOLN**

- Prepare by adding the contents of each bottle of **Wash Concentrate WASHBUF 20x** to 475 mL of distilled or de-ionised water. Store at 2-8°C.

8.4 All other reagents are supplied ready for use.

9. Extraction Procedure

9.1 Prepare labelled borosilicate glass tubes, one for each Calibrator CAL, Control CTRL and unknown sample SPE.

9.2 Add **50 µL** of each Calibrator CAL, Control CTRL or sample to appropriately labelled tubes.

9.3 Add **50 µL** of Extraction Reagent 1 REAG 1 to each tube. Vortex all tubes. Incubate at 18-25°C for 20 minutes.

9.4 Add **500 µL** of Extraction Reagent 2 [REAG] [2] to each tube. Vortex all tubes. Centrifuge all tubes at 2000 g for 10 minutes.

10. Assay Procedure

10.1 Prepare labelled borosilicate glass tubes, two for each; Total Counts, NSB, Calibrator, Control and unknown sample.

10.2 Add **50 µL** of Calibrator, Control, or sample extract supernatants to the appropriately labelled tubes. Add 50 µL of Calibrator "A" (0) extract supernatant to NSB tubes.

10.3 Add **100 µL** of ^{125}I 25-Hydroxy Vitamin D [Ag] [^{125}I] to all tubes.

10.4 Add **1 mL** of Antiserum [Ab] to all tubes, except Total Count and NSB tubes. Add **1 mL** of NSB buffer [BUF] to NSB tubes.

- Vortex all tubes gently without foaming.
- Incubate at 18-25°C for 90 minutes.

10.5 Add **100 µL** of Sac-Cel® to all tubes (except Total Count tubes).

- *Note: mix well to re-suspend immediately before use.*
- Vortex all tubes gently without foaming. Incubate at 18-25°C for 20 minutes.

10.6 Add **3 mL** of dilute Wash Solution [WASHBUF] [SOLN] to all tubes (except Total Count tubes). Centrifuge at 2000 g for 10 minutes.

10.7 Decant supernatants (except Total Count tubes). Allow inverted tubes to drain on a pad of absorbent paper for 1 minute. Blot rims to remove remaining drops of liquid.

10.8 Count all tubes in a suitable gamma counter for at least 1 minute.

11. Calibration

25-OH D Calibrators are standardised using U.V. quantification.

12. Quality Control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Two kit controls are provided. The controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance. To ensure good precision it is important that the detectors in multi-well counters are well matched and not contaminated.

13. Calculation of Results

Calculate the percent binding (B/Bo%) of each calibrator, control and unknown sample as follows:

$$B/Bo\% = \frac{\text{(mean counts - NSB counts)}}{\text{(mean counts for '0' - NSB counts)}} \times 100$$

Prepare a calibration curve on semi-log graph paper by plotting B/Bo% on the ordinate against concentration of 25-hydroxy-vitamin D on the abscissa. Calculate B/Bo% for each unknown sample and read values off the curve in nmol/L (nM). Alternative data reduction techniques may be employed but users should confirm that the selected curve fit is appropriate and gives acceptable results. Smoothed spline or 4PL curve fits are recommended.

Conversion of Units:

$$X \text{ nmol/L} \quad \overset{\times 0.40 \Rightarrow}{\underset{\Leftarrow \times 2.5}{}} \quad Y \text{ ng/mL}$$

14. Limitations of Use

- Samples suspected of containing analyte concentrations in excess of the highest calibrator should be assayed in dilution.
- Samples that contain appreciable background radioactivity should not be used. Any suspect samples should be screened for radioactivity before performing the assay. The sample should be stored until the radioactivity has decayed, or a further sample obtained.
- As in the case of any diagnostic procedure results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The following substances have been tested and found not to interfere in the 25-Hydroxy Vitamin D assay:

Haemoglobin:	tested up to 200 mg/dL
Bilirubin:	tested up to 500 µmol/L
Lipid:	tested up to 3.7 mmol/L triglyceride

15. Expected Values

The following range has been determined using the IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA kit and is provided for guidance only. Each laboratory should determine ranges for their local population.

Normal adults 23 - 113 nmol/L (n = 24)

16. Performance Data

16.1 Accuracy

The IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA kit was compared against a recognised radioimmunoassay for the quantitative determination of 25-hydroxy-vitamin D and other hydroxylated metabolites. A population of 187 samples, selected to represent a wide range of 25-hydroxyvitamin D [11.8-105 nmol/L], were assayed by each method in three laboratories. Passing & Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

IDS = 0.87(x) + 3.00; correlation coefficient (r) = 0.95

16.2 Sensitivity

The sensitivity, defined as the concentration corresponding to the mean minus 2 standard deviations of 10 replicates of the zero calibrator, is <3 nmol/L.

16.3 Linearity

Linearity was assessed by diluting samples with buffer prior to extraction and assay.

Sample	Measured (nmol/L)	Expected (nmol/L)	% M/E
A	59.7		
A/2	27.7	28.9	92.9%
A/4	18.0	14.9	120.4%
B	43.6		
B/2	21.9	21.8	100.2%
B/4	13.0	10.9	119.1%
C	33.7		
C/2	15.2	16.8	90.3%
C/4	9.2	8.4	108.9%
		Mean	**105.3%**

16.4 Precision

Intra assay mean (nmol/L)	n=10 % CV	Inter assay mean (nmol/L)	n=25 % CV
26.5	5.3%	19.6	8.2%
58.4	5.0%	56.7	8.1%
151	6.1%	136	7.3%

16.5 Recovery

Recovery was assessed by adding 25-OH D_3 to samples prior to extraction and assay.

Sample conc. (nmol/L)	25-OH D_3 added (nmol/L)	Measured (nmol/L)	Recovery (nmol/L)	Recovery %
78.8	20	98.0	19.2	96.0%
	40	119.5	40.7	101.8%
32.0	20	51.7	19.7	98.5%
	40	75.3	43.3	108.3%
20.3	20	40.6	20.3	101.5%
	40	71.4	51.1	127.8%
32.4	20	50.2	17.8	89.0%
	40	69.2	36.8	92.0%
			Mean	**101.9%**

16.6 Specificity

The specificity of the antiserum was assessed with the following analytes at 50% binding of the zero calibrator.

Analyte	Cross-Reactivity
25-Hydroxyvitamin D_3	100%
25-Hydroxyvitamin D_2	75%
24,25-Dihydroxyvitamin D_3	>100%
Cholecalciferol D_3	<0.01%
Ergocalciferol (D_2)	<0.30%

1. Utilisation

Pour usage diagnostique in vitro

La trousse 25-Hydroxy Vitamin D RIA d'IDS est un dosage radioimmunologique en phase liquide destiné au dosage quantitatif de la 25-hydroxyvitamine D (25-OH D) et d'autres métabolites hydroxylés présents dans le sérum ou le plasma humain. Les résultats des dosages doivent être utilisés en conjonction avec d'autres données cliniques et de laboratoire pour aider le médecin à l'évaluation de la suffisance en vitamine D.

2. Résumé et explication

La vitamine D est un terme utilisé communément pour désigner une famille de séco-stéroïdes apparentés. A la suite de l'exposition au soleil, le 7-dihydrocholestérol, localisé au fond des couches de l'épiderme à croissance active, subit une coupure protéolytique de l'anneau « B » pour produire la pré-vitamine D_3 qui est ensuite transformée par isomérisation en vitamine D_3 (cholécalciférol). La vitamine D_3 et la vitamine D_2 (ergocalciférol) peuvent aussi être obtenues par apport diététique ou par un nombre limité de produits alimentaires. La vitamine D_2 est métabolisée de la même façon que la vitamine D_3.
La vitamine D est stockée dans les tissus adipeux et passe dans la circulation liée à une protéine porteuse, la VDBP ou *Vitamin D Binding Protein*, et à l'albumine. Dans le foie, la vitamine D est hydroxylée pour donner la 25-hydroxyvitamine D, qui circule aussi sous forme de complexe avec la VDBP. Une petite partie de la 25-OH D est hydrolysée ultérieurement dans les reins, sous régulation directe par les niveaux de l'hormone parathyroïde et du calcium ionisé, pour former l'hormone calciotrope biologiquement active 1,25-dihydroxy-vitamine D. L'hydroxylation et le métabolisme ultérieurs de la vitamine D produisent des composés solubles dans l'eau et aisément excrétés.

L'activité hépatique de la 25-hydroxylase de la vitamine D n'est pas régulée et des variations dans la production cutanée de vitamine D_3 ou l'ingestion de vitamine D (D_3 ou D_2) entraînent des variations du taux de 25-OH D dans la circulation[(1)].
On considère que la mesure de la concentration sérique en 25-OH D est la methode la plus fiable afin de mesurer le taux de vitamine D et peut donc être utilisée pour déterminer si un patient souffre ou non d'une insuffisance en vitamine D[(2)]. L'évaluation du taux de vitamine D peut être requis pour déterminer la cause d'une concentration en calcium sérique anormale chez les patients.

3. Description de la méthode

La trousse 25-Hydroxy Vitamin D RIA d'IDS offre une procédure complète de dosage pour effectuer l'extraction et le dosage de 25-OH D et d'autres métabolites hydroxylés présents dans le sérum ou le plasma. L'addition des réactifs d'extraction 1 et 2 aux échantillons et aux standards entraîne la précipitation des protéines sériques et l'extraction de la 25-OH D. Après centrifugation, une certaine quantité de surnageant est incubée en présence de 25-OH D marquée à l'iode 125 et d'un anticorps de mouton anti-25-OH D très spécifique. La séparation de la fraction libre du traceur de la fraction liée à l'anticorps est obtenue par une courte incubation en présence du Sac-Cel® (IgG anti-mouton fixé sur cellulose) suivie d'une centrifugation et d'une décantation. La radioactivité liée est inversement proportionnelle à la concentration de 25-OH D.

4. Mises en garde et précautions

La trousse 25-Hydroxy Vitamin D RIA d'IDS est pour l'usage diagnostique *in vitro* seulement et n'est pas pour l'usage interne chez les humains ou les animaux. Ce produit doit être employé strictement selon les instructions présentées dans la notice. IDS Limited ne pourra être tenue responsable d'aucune perte ou dommage (excepté selon les exigences du statut) quelle qu'en soit la cause, provenant du manque de conformité aux instructions fournies.

PRÉCAUTION : Cette trousse contient des matériaux d'origine humaine ou animale et doit être manipulé comme s'il pouvait être porteur de maladies et les transmettre. Manipuler les réactifs de trousse comme si capable de transmettre un agent infectieux.
Des précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées dans le stockage, la manipulation et la disposition des réactifs de trousse. II faut se débarrasser des réactifs de trousse inutilisé en suivant les recommandations des autorités compétentes locales et la réglementation en vigueur.

Matériaux radioactifs

- Cette trousse contient du matériel radioactif (Iode-125; $T_{½}$=60,14j; γ 35,5 KeV; X 27-32 KeV). Des précautions appropriées et les bonnes pratiques en matière de laboratoire doivent être utilisées dans le stockage, la manipulation et la disposition du matériel. Ce matériel radioactif peut être reçu, acquis, possédé, utilisé par des médecins dans les hôpitaux, des laboratoires, uniquement pour l'analyse *in*

vitro. Sa réception, son acquisition, sa possession, son utilisation et son transfert sont soumis aux lois et à la réglementation locale en vigueur.

- Le matériel radioactif doit être gardé dans le récipient d'origine, dans un endroit spécialement prévu à cet effet. L'accès aux matériaux radioactifs doit être limité uniquement au personnel autorisé.
- Ne pas manger, ni boire, fumer ou appliquer des cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter les solutions radioactives à la bouche.
- Suivre les directives concernant les règles d'hygiène : Eviter le contact avec les substances radioactives en utilisant des gants jetables, des blouses de laboratoire et tout autre matériel de protection. Se laver les mains soigneusement après avoir manié les substances radioactives.
- Les zones de déversement doivent être essuyées immédiatement avec le matériel absorbant approprié, qui doit alors être rejeté en tant que déchet radioactif. La zone contaminée doit être nettoyée en utilisant un détergent alcalin ou la solution de décontamination radiologique.
- Il faut se débarrasser du matériel radioactif inutilisé en suivant les recommandations des autorités compétentes locales et la réglementation en vigueur.
- Les sujets de moins de 18 ans ne sont pas autorisés à manipuler les substances radioactives ni à pénétrer dans les zones radioactives.
- Les zones contrôlées doivent être tenues dans un très grand état de propreté. Il est habituellement possible d'éviter la contamination du laboratoire et de l'équipement en travaillant avec précaution, en utilisant des articles jetables ou facilement décontaminables, et en mettant du matériel absorbant sur les paillasses de laboratoire.

Acétonitrile

Le réactif d'extraction 2 REAG 2 contient de l'acétonitrile.

Classification under CLP:
Acute Tox. 4
Eye Irrit. 2
Flam. Liq. 2

Mentions de danger:		Conseils de prudence::	
H225:	Liquide et vapeurs très inflammables.	P260:	Ne pas respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
H302+312+332:	Nocif en cas d'ingestion, de contact cutané ou d'inhalation.	P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
H319:	Provoque une sévère irritation des yeux.	P301+310:	EN CAS D'INGESTION: appeler immédiatement un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin.
		P303+361+353:	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU (ou les cheveux): enlever immédiatement les vêtements contaminés.
		P304+340:	EN CAS D'INHALATION: transporter la victime à l'extérieur et la maintenir au repos dans une position où elle peut confortablement respirer.
		P305+351+338:	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

Azide de sodium

Certains réactifs contenus dans cette trousse renferment de l'azide de sodium. Ce sel peut réagir avec les installations sanitaires en plomb ou cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide.

Solution d'hydroxyde de sodium (<1 %)

Le réactif d'extraction 1 REAG 1 contient de l'hydroxyde de sodium (<1%).

Classification under CLP:
Eye Irrit. 2
Skin Irrit. 2

Mentions de danger:

H315:	Provoque une irritation cutanée.
H319:	Provoque une sévère irritation des yeux

Conseils de prudence:

P264:	Se laver les mains soigneusement après manipulation.
P280:	Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P305+351+338:	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P332+313:	En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.
P337+313:	Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.
P362:	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation

Sérum humain:

Standards CAL et Contrôles CTRL
Le sérum humain utilisé pour la fabrication des composants de cette trousse a été analysé selon les recommandations du FDA et s'est avéré négatif en anticorps anti-VIH 1/2, en Ag HBs, et en anticorps anti-VHC. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

5. Conservation des réactifs

Cette trousse est stable jusqu'à la date de péremption indiquée si conservée comme indiqué. Conserver la trousse entre 2 et 8 °C après réception.

Indices d'une détérioration des réactifs

- Présence anormale de particules en suspension dans l'un des réactifs. Diminution de la liaison maximale.
- Liaison non spécifique élevée.
- Pente ou courbe d'étalonnage différente de celles obtenue régulièrement.

6. Prélèvement et conservation des échantillons

On doit doser la 25-hydroxyvitamine D sur des échantillons de sérum, ou de plasma (EDTA ou héparine). On doit effectuer la séparation aussitôt après le prélèvement. Pour un stockage prolongé, ils devront être conservés à -20°C minimum. Eviter les congélations et décongélations répétées.

Les informations sur le stockage et la stabilité des échantillons mentionnées plus haut sont des recommandations générales destinées à être utilisées dans différents types de laboratoires. Chaque laboratoire doit se conformer aux directives ou aux exigences de la réglementation locale, nationale et/ou fédérale, ou bien à celles des organismes d'accréditation pour définir ses propres procédures de manipulation des échantillons et de stabilité de stockage. Pour plus de détails sur les pratiques appropriées, merci de vous référer à CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

7. Matériel

Matériel fourni

CAL 0-6 – Standards: Sérum humain contenant de la 25-hydroxy-vitamine D et de l'azide de sodium à 0,09 %, 1 ml par flacon, 7 flacons par trousse.

Ab - Antisérum: Anticorps de mouton anti-25-hydroxyvitamine D dans un tampon phosphate avec de l'azide de sodium à 0,09 %, 52 ml par flacon, 2 flacons par trousse.

Ag ^{125}I - 25-hydroxyvitamine D marquée à l'iode 125:
25-hydroxyvitamine D marquée à ^{125}I dans un tampon phosphate avec de l'azide de sodium à 0,09 % et des stabilisants. Chaque flacon a une activité < 185 kBq (5 µCi), 10,5 ml par flacon.

Sac-Cel®: Suspension de particules de cellulose sur lesquelles on a fixé un anticorps polyclonal anti-mouton, avec de l'azide de sodium à 0,09 %,11 ml par flacon.

CTRL 1 - 2 – Contrôles: Sérum humain contenant de la 25-hydroxy-vitamine D et de l'azide de sodium à 0,09 %, 1 ml par flacon, 2 flacons par trousse.

REAG 1 - Réactif d'extraction 1: Solution contenant de l'hydroxyde de sodium, < 1 % ; 5 ml par flacon.

REAG 2 - Réactif d'extraction 2: Solution contenant de l'acétonitrile, 26 ml par flacon.

BUF - Tampon de dosage: Tampon phosphate contenant de l'azide de sodium à 0,09 %, 8 ml par flacon.

WASHBUF 20x - Solution concentrée de lavage:
Solution tamponnée de phosphate contenant du Tween, 25 ml par flacon.

Matériel nécessaire mais non fourni

- Tubes en verre borosilicaté, à usage unique, 12 x 75 mm. (Ne pas utiliser de tubes en plastique).
- Pipettes de précision : 50 µl et 1 ml.
- Distributeur automatique : 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml et 3 ml.
- Agitateur type Vortex.
- Centrifugeuse capable d'atteindre 2000 x g de préférence réfrigérée.
- Support de décantation (Nalgene 5970-0013+5979-0013 ou équivalent).
- Compteur à scintillations gamma pouvant mesurer l'iode 125.

8. Préparation des réactifs

8.1 Amener les réactifs à température ambiante avant utilisation.

8.2 Les réactifs doivent être homogénéisés en retournant doucement le flacon avant usage.

8.3 **Solution de lavage WASHBUF SOLN**

- On prépare la solution de travail en ajoutant le contenu de chaque flacon de solution concentrée de lavage WASHBUF 20x à 475 ml d'eau distillée ou désionisée.
- Conserver entre 2 et 8°C.

8.4 Tous autres réactifs sont fournis prêts à l'emploi.

9. Procédure d'extraction

9.1 Préparer et marquer des tubes en verre borosilicaté, un pour chaque standard CAL, contrôle CTRL et échantillon inconnu SPE.

9.2 Ajouter **50 µl** de chaque standard CAL, contrôle CTRL ou échantillon inconnu dans le tube correspondant.

9.3 Ajouter **50 µl** de réactif d'extraction 1 REAG 1 dans chaque tube. Homogénéiser le contenu de tous les tubes à l'aide de l'agitateur type vortex. Incuber entre 18 et 25 °C pendant 20 minutes.

9.4 Ajouter **500 µl** de réactif d'extraction 2 REAG 2 dans chaque tube. Homogénéiser (vortex). Centrifuger tous les tubes à 2 000 x g pendant 10 minutes.

10. Procédure de dosage

10.1 Préparer et marquer des tubes en verre borosilicaté, en doublet, pour: Activité totale, LNS, standards, contrôles et échantillons inconnus.

10.2 Ajouter **50 µl** de surnageant d'extraction de standard, contrôle ou échantillon inconnu dans le tube correspondant.
Ajouter **50 µl** de surnageant d'extraction du standard « A » (0) aux tubes LNS.

10.3 Ajouter **100 µl** de 25-hydroxyvitamine D marquée à l'^{125}I Ag ^{125}I dans chaque tube.

10.4 Ajouter **1 ml** d'antisérum Ab dans chaque tube, sauf les tubes « activité totale » et « LNS ». Ajouter 1 ml de tampon de dosage BUF aux tubes LNS.

- Vortexer doucement tous les tubes, sans produire de mousse, le contenu de tous les tubes à l'aide de l'agitateur.
- Incuber entre 18 et 25 °C pendant 90 minutes.

10.5 Ajouter **100 µl** de Sac-Cel® dans tous les tubes (sauf les tubes « activité totale »).

- Remarque : bien mélanger le Sac-Cel immédiatement avant usage pour le remettre en suspension.

- Mélanger doucement tous les tubes, sans produire de mousse. Incuber entre 18 et 25 °C pendant 20 minutes.

10.6 Ajouter **3 ml** de solution de lavage diluée WASHBUF SOLN dans tous les tubes (sauf les tubes « activité totale »). Centrifuger à 2 000 x g pendant 10 minutes.

10.7 Décanter les surnageants (sauf les tubes « activité totale »).
Laisser les tubes inversés s'égoutter sur un buvard ou un papier absorbant pendant approximativement 1 minute. Sécher le rebord des tubes pour éliminer les gouttes de liquide restant.

10.8 Effectuer le comptage de tous les tubes dans un compteur gamma pendant au moins 1 minute.

11. Calibration

Les standards de 25-OH D sont standardisés par quantification UV.

12. Contrôle de qualité

L'utilisation régulière des échantillons de contrôle à plusieurs niveaux d'analyte est conseillée pour assurer la validité des résultats. Deux contrôles de trousse sont fournis. Les contrôles doivent être testés comme inconnus. Des tableaux de contrôle de qualité doivent être maintenus pour suivre la performance de dosage. Pour assurer la bonne précision, il est important que les détecteurs dans compteurs de multipuits soient bien égalés et ne soient pas contaminés.

13. Calcul des résultats

Calculer le pourcentage de fixation (B/Bo%) de chaque standard, contrôle et échantillon inconnu de la façon suivante :

$$B/Bo\% = \frac{\text{(moyenne des CPM - CPM LNS)}}{\text{(moyenne des CPM Std '0' - CPM LNS)}} \times 100$$

Tracer la courbe standard sur papier semi-logarithmique en reportant les B/Bo% correspondant à chaque standard sur l'axe des ordonnées et leur concentration en 25-hydroxyvitamine D sur l'axe des abscisses.
Calculer le B/Bo% correspondant à chaque échantillon inconnu et lire la concentration en nmol/l (nM) sur la courbe. D'autres techniques de traitement des données peuvent être employées, mais les utilisateurs devront s'assurer que la forme de la courbe sélectionnée est appropriée et offre des résultats acceptables. Il est recommandé de calculer les courbes en utilisant la fonction « spline » ou « 4PL ».

Conversion des unités :

$$X \text{ nmol/l} \quad \overset{\times\, 0{,}40 \;\Rightarrow}{\underset{\Leftarrow\; \times\, 2{,}5}{}} \quad Y \text{ ng/ml}$$

14. Limites du dosage

- Les échantillons de sérum dont les concentrations en 25 (OH) D sont supérieures à celle du standard le plus concentré seront dilués, extraits et redosés.
- On n'utilisera pas d'échantillons qui contiennent déjà une certaine quantité de radioactivité. On vérifiera les échantillons douteux avant d'effectuer le dosage. Garder ces échantillons jusqu'à ce que la radioactivité ait disparu ou qu'un autre échantillon soit disponible.
- Comme pour n'importe quelle procédure de diagnostic, les résultats doivent être interprétés en même temps que le contexte clinique et toute autre information du patient à la disposition du médecin.
- Les substances suivantes ont été testées. Elles n'interfèrent pas dans ce dosage 25-Hydroxy Vitamin D RIA:

Hémoglobine:	testée jusqu'à une concentration de 200 mg/dl
Bilirubine:	testée jusqu'à une concentration de 500 µmol/l
Lipides:	testés jusqu'à une concentration de 3,7 mmol/l de triglycérides

15. Valeurs attendues

Les valeurs suivantes ont été déterminées avec la trousse 25-Hydroxy Vitamin D RIA d'IDS et ne sont fournies ici qu'à titre indicatif. Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres normales.

Adultes normaux 23 - 113 nmol/l (n = 24)

16. Caractéristiques du dosage

16.1 Exactitude

La trousse 25-Hydroxy Vitamin D RIA d'IDS a été comparée à un dosage radioimmunologique identifié pour la détermination quantitative de la 25-hydroxyvitamine D et d'autres métabolites hydroxylés. On a analysé 187

échantillons, censés représenter un éventail de la 25-hydroxyvitamine D [11,8 - 105 nmol/l], par chaque méthode dans trois laboratoires. Les résultats ont été analysés par régression de Passing & Bablok:

IDS = 0,87(x) + 3,00 ; coefficient de corrélation (r) = 0,95

16.2 Sensibilité

La sensibilité, définie comme étant la concentration qui correspond à la moyenne moins deux déviations standards sur 10 dosages du standard zéro, est <3 nmol/l.

16.3 Test de parallélisme

Le parallélisme a été étudié en diluant des échantillons avec le tampon avant de faire l'extraction et le dosage.

Echantillon	Mesuré nmol/l	Attendu nmol/l	% M/A
A	59,7		
A/2	27,7	28,9	92,9 %
A/4	18	14,9	120,4 %
B	43,6		
B/2	21,9	21,8	100,2 %
B/4	13	10,9	119,1 %
C	33,7		
C/2	15,2	16,8	90,3 %
C/4	9,2	8,4	108,9 %
		Moyenne	**105,3 %**

16.4 Précision

Intra-essai moyenne (nmol/l)	n=10 % CV	Inter-essais moyenne (nmol/l)	n=25 % CV
26,5	5,3 %	19,6	8,2 %
58,4	5,0 %	56,7	8,1 %
151	6,1 %	136	7,3 %

16.5 Test de surcharge

Le pourcentage de récupération a été étudié en ajoutant 25-OH D3 à des échantillons avant de faire l'extraction et le dosage.

Echantillon nmol/l	25-OH D_3 ajoutée nmol/l	Mesuré nmol/l	Récupération nmol/l	Récupération %
78,8	20	98	19,2	96 %
	40	119,5	40,7	101,8 %
32	20	51,7	19,7	98,5 %
	40	75,3	43,3	108,3 %
20,3	20	40,6	20,3	101,5 %
	40	71,4	51,1	127,8 %
32,4	20	50,2	17,8	89 %
	40	69,2	36,8	92 %
			Moyenne	**101,9 %**

16.6 Spécificité

La spécificité de l'antisérum a été étudiée en ajoutant au sérum des quantités connues de la substance à analyser et en mesurant la réaction croisée pour 50 % de B/Bo.

Substance à analyser	Réaction croisée
25-Hydroxyvitamine D_3	100 %
25-Hydroxyvitamine D_2	75 %
24,25-Dihydroxyvitamine D_3	$\geq$ 100 %
Cholécalciférol (D_3)	< 0,01 %
Ergocalciférol (D_2)	< 0,3 %

1. Verwendungszweck

Nur zur in-vitro Diagnostik

Der IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA Kit ist ein Flüssigphasenradioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin D (25-OH D) und anderen hydroxylierten Metaboliten in menschlichem Serum oder Plasma. Die Testergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen und labordiagnostischen Daten verwendet werden, um den Arzt in der Einschätzung des Vitamins D Status zu unterstützen.

2. Zusammenfassung und Erklärung

Vitamin D ist ein allgemein gebräuchlicher Sammelbegriff für eine Familie nah verwandter Moleküle. Sonnenlicht induziert die photolytische Spaltung des "B" Ringes des tief in den aktiv wachsenden Schichten der Epidermis gelegenen 7-Dehydrocholesterins zum Provitamin D_3, welches weiter zum Vitamin D_3 (Cholecalciferol) isomerisiert. Vitamin D_3 und Vitamin D_2 (Ergocalciferol) können alternativ durch die Ernährung von gewissen Nahrungsmitteln aufgenommen werden. Vitamin D_2 wird in diesem Fall in ähnlicher Weise zum Vitamin D_3 metabolisiert.

Vitamin D wird im Fettgewebe gespeichert und nach Bindung an das Vitamin-D bindendes Protein (VDBP) und Albumin in die Blutzirkulation abgegeben. In der Leber wird Vitamin D zum 25-Hydroxyvitamin D hydroxyliert, welches ebenfalls als Komplex mit VDBP zirkuliert. Ein kleiner Anteil des 25-OH D wird in der Niere, unter direkter Regelung durch das Parathormon (PTH) und des Serum-Kalziumspiegels weiter hydroxyliert, um das biologisch aktive kalziotrophe Hormon 1,25-Dihydroxy-vitamin D zu bilden. Die Ausscheidung erfolgt nach weiterer Hydroxylierung und Metabolisierung zu wasserlöslichen Derivaten.

Die hepatische Vitamin D 25-Hydroxylase Aktivität unterliegt keiner stringenten Regulierung. Die Produktion von Vitamin D_3 in der Haut oder die Einnahme von Vitamin D (D_3 oder D_2) durch die Nahrung beeinflussen somit den Spiegel an zirkulierendem 25-OH D[(1)].

Die Serumkonzentration von 25-OH D wird als das zuverlässigste Maß zur Bestimmung des gesamten Vitamin D-Status betrachtet und kann folglich zur Abklärung eines möglichen Vitamin D Mangels eines Patienten verwendet werden[(2)]. Die Bestimmung des Vitamin D-Status kann indiziert sein, um die Ursache einer anormalen Serumkalzium-konzentrationen eines Patienten abzuklären.

3. Beschreibung der Methode

Der IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA Kit ist ein komplettes Messverfahren für die Extraktion und die quantitative Bestimmung von 25-OH D und anderer hydroxylierter Metaboliten im Serum oder Plasma. Die Zugabe der Extraktionsreagenzien 1 und 2 zu den Proben und Kalibratoren verursacht die Präzipitation der Serumproteine und die Extraktion von 25-OH D. Nach einem Zentrifugationsschritt wird ein Teil des Überstandes mit ^{125}J markiertem 25-OH D Tracer und einem hoch-spezifischen polyklonalen anti-25-OH D Schafantikörper inkubiert. Die Abtrennung des antikörpergebundenen von freiem Tracer erfolgt durch eine kurze Inkubation mit Sac-Cel® (Anti-Schaf IgG Zellulose) und darauffolgender Zentrifugation und anschließendem Dekantieren. Die gebundene Radioaktivität ist umgekehrt proportional zur Konzentration von 25-OH D.

4. Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA Kit ist nur für In-Vitro Diagnostik und nicht zur inneren Anwendung an Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben eingesetzt werden. IDS Limited kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthlt Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien behandeln, als ob sie zum bertragen eines Infektionserregers fhig sind.

Angemessene Vorsichtsmanahmen und die Regeln der guten Laborpraxis mssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung der Kitreagenzien eingehalten werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien sollte nach den rtlichen Vorschriften erfolgen.

Umgang mit radioaktivem Material

- Dieser Kit enthält radioaktives Material (^{125}J; $T_{½}$=60,14T; γ 35,5 KeV; X 27-32 KeV). Angemessene Vorsichtmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis müssen bei Lagerung, Gebrauch und Entsorgung des Materials eingehalten werden. Radioaktives Material darf nur von Ärzten, klinischen Labors oder Kliniken in Empfang genommen werden und nur für In-Vitro Tests verwendet werden. Annahme, Kauf, Besitz, Verwendung und Weitergabe unterliegen den örtlichen Vorschriften.

- Radioaktives Material ist im Originalbehälter in einem besonders ausgewiesenen, besonders gekennzeichneten Bereich zu lagern. Der Zugriff auf radioaktives Material darf nur durch dazu ermächtigtes Personal erfolgen.
- In Bereichen, in denen radioaktives Material gelagert oder verwendet wird, ist essen, trinken, rauchen und Verwenden von Kosmetika verboten. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
- Beim Umgang mit radioaktivem Material immer Labormantel und Einweghandschuhe tragen. Nach Abschluß der Arbeiten Hände sorgfältig waschen.
- Verschüttetes Material sollte umgehend mit einem geeigneten saugfähigen Material aufgenommen werden, welches dann als radioaktiver Abfall entsorgt werden muß. Der kontaminierte Bereich sollte dazu mit einem alkalischen Reinigungsmittel oder einer Dekontaminationslösung gereinigt werden.
- Die Entsorgung radioaktiven Materials sollte nach den örtlichen Vorschriften erfolgen.
- Personen unter 18 Jahren ist der Umgang mit radioaktivem Material oder das Betreten radioaktiver Bereiche zu untersagen.
- Bereiche, in denen mit radioaktivem Material gearbeitet wird, müssen saubergehalten werden, Einwegmaterial oder leicht dekontaminierbare Materialien sowie absorbierende Schutzfolien für den Labortisch sind zu verwenden um Kontaminationen zu verringern.

Acetonitril

Extraktionreagens 2 REAG 2 enthält Acetonitril.

Einstufung (CLP):

Acute Tox. 4
Eye Irrit. 2
Flam. Liq. 2

Gefahrenhinweise:

H225:	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.
H302+312+332:	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.
H319:	Verursacht schwere Augenreizung.

Sicherheitshinweise:

P260:	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
P280:	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P301+310:	BEI VERSCHLUCKEN: Sofort IFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
P303+361+353:	BEI KONTAKT MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.
P304+340:	BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.
P305+351+338:	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.

Natriumazid

Einige Reagenzien in diesem Kit enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel, welches mit Blei, Kupfer oder Messing hochexplosive Metallazide bilden kann; Zum Beseitigen der Reagenzien mit viel Wasser nachspülen, um die Azidbildung zu vermeiden.

Natriumhydroxidlösung (<1%)

Extraktionreagens 1 REAG 1 enthält Natriumhydr-oxidlösung (<1%).

Einstufung (CLP):

Eye Irrit. 2
Skin Irrit. 2

Gefahrenhinweise:

H315:	Verursacht Hautreizungen.
H319:	Verursacht schwere Augenreizung

Sicherheitshinweise:

P264:	Nach Gebrauch Hände gründlich waschen.
P280:	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen.
P305+351+338:	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
P332+313:	Bei Hautreizung.
P337+313:	Bei anhaltender Augenreizung.
P362:	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Menschliches Serum
Kalibratoren CAL und Kontrollen CTRL
Das menschliche Material, das für die Präparation dieses Produktes verwendet wird, ist durch FDA-empfohlene Nachweisverfahren auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das humane AIDS-Virus (HIV 1 und II), gegen das Oberflächenantigen des Hepatitis B Virus und gegen das Hepatitis C Virus geprüft und für negativ befunden worden. Da kein Test das Vorhandensein von infektiösen Erregern völlig ausschließen kann, sollten die Reagenzien gemäß Vorgabe der Biosicherheitsstufe 2 behandelt werden.

5. Verfall und Lagerung der Reagenzien

Der Kit ist bei vorschriftsgemäßer Lagerung bis zum Ablauf des Verfalldatums verwendbar. Nach Erhalt sind die Reagenzien bei 2-8°C zu lagern.

Anzeichen für mögliche Unbrauchbarkeit der Kitreagenzien

- Das Vorhandensein von anormalen Feststoffteilchen in irgendwelchen der Reagenzien.
- Eine Verringerung der maximalen Bindung.
- Eine hohe unspezifische Bindung.
- Eine Verschiebung in der Steigung der Kurve aus ihrer Normalstellung.

6. Probenvorbereitung und –lagerung

Der Assay sollte mit Serum- oder Plasmaproben (EDTA oder Heparin) durchgeführt werden. Die Proben sollten so schnell wie möglich nach Abnahme abgetrennt werden. Für Langzeitlagerung sollte man die Proben bei -20°C einfrieren. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren ist zu vermeiden.

Die oben genannten Informationen zur Probenlagerung und Probenstabilität sind allgemeine Empfehlungen für die Verwendung in verschiedenen Laborumgebungen. Jedes Labor muss die Richtlinien bzw. Anforderungen der geltenden lokalen, staatlichen und/oder bundesstaatlichen Bestimmungen oder Akkreditierungsstellen beachten, um ein eigenes Verfahren für den Umgang mit Probenmaterial und Lagerstabilität zu erreichen. Informationen zu angemessenen Praktiken sind in folgender Richtlinie enthalten: CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

7. Material

Im Kit enthaltenes Material

CAL 0 - 6 – Kalibratoren:	Menschliches Serum, das 25-Hydroxyvitamin D und 0,09% Natriumazid enthält. 1 mL pro Flasche. 7 Flaschen pro Kit.
Ab - Antiserum:	Schaf Anti-25-Hydroxyvitamin D in Phosphatpuffer mit 0,09% Natriumazid. 52 mL pro Flasche. 2 Flaschen pro Kit.
Ag ^{125}I - ^{125}J 25-Hydroxy-Vitamin D:	^{125}J 25-Hydroxy-Vitamin D in Phosphatpuffer mit 0,09% Natriumazid und Stabilisatoren. Radioaktivität pro Flasche <185 kBq (5 µCi). 10,5 mL pro Flasche.
Sac-Cel®:	Anti-Schaf IgG an Zellulose gekoppelt, als Lösung in BSA-Phosphatpuffer mit 0,09% Natriumazid, 11 mL pro Flasche.
CTRL 1 - 2 - Kontrollen:	Menschliches Serum, das 25-Hydroxyvitamin D und 0,09% Natriumazid enthält. 1 mL pro Flasche. 2 Flaschen pro Kit.
REAG 1 - Extraktionsreagens 1:	Lösung, die <1% Natriumhydroxid enthält, 5 mL pro Flasche.
REAG 2 - Extraktionsreagens 2:	Lösung, die Acetonitril enthält, 26 mL pro Flasche.
BUF - NSB-Puffer :	Phosphatpuffer mit 0,09% Natriumazid, 8 mL pro Flasche.
WASHBUF 20x - Waschlösung, Konzentrat:	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung mit Tween, 25 mL pro Flasche.

Benötigte, jedoch nicht mitgelieferte Materialien

- 12x75 mm Einweg-Borosilikatglasröhrchen.
  Hinweis: Plastikröhrchen sind nicht verwendbar. Röhrchen nicht wiederverwenden.
- Präzisionspipetten für Volumina von 50 µL und 1 mL.
- Mehrfachpipetten für Volumina von 50 µL, 100 µL, 500 µL, 1 mL und 3 mL., z.B. Eppendorf Multipipette 4780, oder ähnliche.
- Vortex-Mischer.
- Zentrifuge mit einer Leistungsfähigkeit von 2000 g. *Eine gekühlte Zentrifuge ist von Vorteil, aber nicht unbedingt nötig.*

- Dekantiergestell, z.B. Nalgene 5970-0013+5979-0013 oder ähnliche.
- Gammacounter für ^{125}J.

8. Präparation der Reagenzien

8.1 Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

8.2 Vor jedem Gebrauch Reagenzien durch mehrmaliges Wenden mischen.

8.3 **Waschlösung** **WASHBUF** **SOLN**

- Jede Flasche Waschkonzentrat WASHBUF 20x mit 475 mL destilliertem Wasser verdünnen.
- Bei 2-8°C lagern.

8.4 Alle anderen Reagenzien werden gebrauchsfertig geliefert.

9. Extraktionsverfahren

9.1 Beschriftete Borosilikatglasröhrchen vorbereiten; eines pro Kalibrator CAL, Kontrolle CTRL und unbekannter Probe SPE.

9.2 **50 µL** jedes Kalibrator CAL, Kontrolle CTRL oder Probe in das passend beschriftete Röhrchen pipettieren.

9.3 **50 µL** von Extraktionsreagens 1 REAG 1 jedem Röhrchen hinzufügen. Alle Röhrchen vortexen. Bei 18-25°C für 20 Minuten inkubieren.

9.4 **500 µL** von Extraktionsreagens 2 REAG 2 jedem Röhrchen hinzufügen. Alle Röhrchen vortexen. Alle Röhrchen bei 2000 g für 10 Minuten zentrifugieren.

10. Immunoassay-Verfahren

10.1 Beschriftete Borosilikatglasröhrchen vorbereiten; jeweils zwei für Totaltaktivität, NSB, Kalibrator, Kontrolle und Probe.

10.2 **50 µL** Kalibrator-, Kontroll- oder Proben-extrakte in das entsprechende Röhrchen pipettieren. 50 µL Kalibrator “A” (0)-Extrakt in die NSB-Röhrchen pipettieren.

10.3 **100 µL** ^{125}J markiertes 25-Hydroxy Vitamin D Ag ^{125}I zu allen Röhrchen pipettieren.

10.4 **1 mL** Antiserum Ab zu allen Röhrchen, außer Totalaktivität und NSB-Röhrchen pipettieren. 1 mL NSB-Puffer BUF in die NSB-Röhrchen hinzupipettieren.

- Vorsichtig vortexen, um Schaumbildung zu vermeiden.
- Bei 18-25°C für 90 Minuten inkubieren.

10.5 **100 µL** Sac-Cel® zu allen Röhrchen (außer Totalaktivität-Röhrchen) pipettieren.

- *Hinweis: zur Resuspendierung unmittelbar vor Gebrauch gut mischen.*
- Vorsichtig vortexen, um Schaumbildung zu vermeiden. Bei 18-25°C für 20 Minuten inkubieren.

10.6 **3 mL** verdünnte Waschlösung WASHBUF SOLN in alle Röhrchen (außer Totalaktivität-Röhrchen) hinzufügen. Bei 2000 g für 10 Minuten zentrifugieren.

10.7 Überstände abgießen (außer Totalaktivität-Röhrchen). Röhrchen umgedreht auf einem Blatt saugfähigen Materials austropfen lassen. Ränder abtupfen, um zurückgebliebene Flüssigkeit zu entfernen.

10.8 Alle Röhrchen in einem geeigneten Gamma-Counter für mindestens 1 Minute messen.

11. Kalibrierung

25-OH D Kalibratoren werden mit U.V.-Quantifikation standardisiert.

12. Qualitätskontrolle

Es ist ratsam, regelmäßig Kontrollproben unterschiedlicher Konzentrationen einzusetzen, um sicherzustellen, daß man reproduzierbare Ergebnisse erzielt. Zwei Kontrollen werden zur Verfügung gestellt. Die Kontrollen sollten wie unbekannte Proben behandelt werden. Um die Leistung des Assays zu überwachen, sollten Qualitätskontroll-tabellen geführt werden. Zur Sicherstellung einer hohen Präzision ist es am wichtigsten, daß die Detektoren des Counters exakt justiert und nicht kontaminiert sind.

13. Ergebnisberechnung

Berechnung der prozentualen Bindungen (B/Bo%) für jeden Kalibrator, Kontrolle und unbekannte Probe:

$$B/Bo\% = \frac{\text{(durchschnittliche Counts-durchschnittliche NSB Counts)}}{\text{(durchschnittliche Counts für "0"-durchschnittliche NSB Counts)}} \times 100$$

Eine Eichkurve auf halb-logarithmischem Papier anlegen, indem B/Bo % auf der Ordinate gegen die 25-OH D Konzentration auf der Abszisse aufgetragen wird. B/Bo % für jede unbekannte Probe berechnen und die Konzentration in nmol/L an der Kurve ablesen.

Alternative Umrechnungsmethoden können verwendet werden, allerdings sollte beachtet werden, ob der gewählte Kurvenverlauf geeignet ist und akzeptable Ergebnisse liefert.

"Smoothed Spline" oder eine 4-Parameter Auswertung werden empfohlen.

Einheiten-Umrechnung

x 0,40 ⇒

X nmol/L Y ng/mL

⇐ x 2,5

14. Gebrauchseinschränkungen

- Proben, von denen anzunehmen ist, daß sie eine höhere Konzentration als der höchste Standard aufweisen, sollten verdünnt untersucht werden.
- Radioaktive Proben dürfen nicht verwendet werden. Eventuell radioaktive Proben müssen vor der Versuchsdurchführung daraufhin untersucht werden. Eine radioaktive Probe sollte bis zum Abklingen der Radioaktivität gelagert oder stattdessen eine andere, nicht radioaktive Probe verwendet werden.
- Die Ergebnisse sollten immer gemeinsam mit dem klinischem Bild und anderen für den Arzt zur Verfügung stehenden Informationen über den Patienten gedeutet werden.
- Die folgenden Substanzen wurden auf Abwesenheit störender Interferenzen in der IDS 25-Hydroxy Vitamin D-Bestimmung geprüft:

Hämoglobin	geprüft bis 200 mg/dL
Bilirubin	geprüft bis 500 µmol/L
Lipid	geprüft bis 3,7 mmol/l Triglyzerid

15. Normalwerte

Die folgenden Werte wurden mit dem IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA Kit bestimmt und sind nur als Richtlinie angeführt. Jedes Labor sollte seinen eigenen Normalbereich für die lokale Bevölkerung festlegen.

Gesunde Erwachsene 23 - 113 nmol/L (n = 24)

16. Daten zum Test

16.1 Richtigkeit

Der IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA Kit wurde gegen einen anerkannten Radioimmunoassay für die quantitative Bestimmung von 25-Hydroxyvitamin D und anderer hydroxylierter Metaboliten verglichen. Eine Auswahl von 187 Proben wurde herangezogen, um einen großen Wertebereich von 25-Hydroxyvitamin D [11,8 - 105 nmol/L] zu überprüfen. Die Proben wurden durch beide Methoden in drei Labors geprüft. Passing & Bablok Regressionsanalyse wurde an den vergleichbaren Daten durchgeführt:

IDS = 0,87(x) + 3,00; Korrelationskoeffizient (R) = 0,95.

16.2 Sensitivität

Die Sensitivität ist definiert als jene Konzentration, die dem Mittelwert minus 2 Standardabweichungen von 10 Doppelbestimmungen des Nullkalibrators entspricht. Sie wurde als <3 nmol/L bestimmt.

16.3 Linearität

Die Linearität wurde durch Verdünnung der Proben mit Puffer vor Extraktion und Messung bestimmt.

Probe	Gemessen nmol/L	Erwartet nmol/L	Gemessen/ Erwartet %
A	59,7		
A/2	27,7	28,9	92,9%
A/4	18,0	14,9	120,4%
B	43,6		
B/2	21,9	21,8	100,2%
B/4	13,0	10,9	119,1%
C	33,7		
C/2	15,2	16,8	90,3%
C/4	9,2	8,4	108,9%
		Mittelwert	**105,3%**

16.4 Präzision

Intra-assay Mittelwert (nmol/L)	n=10 % CV	Inter-assay Mittelwert (nmol/L)	n=25 % CV
26,5	5,3%	19,6	8,2%
58,4	5,0%	56,7	8,1%
151	6,1%	136	7,3%

16.5 Wiederfindung

Die Wiederfindung wurde durch Zugabe von 25-OH D_3 vor Extraktion und Messung bestimmt.

Proben-konzentration nmol/L	25-OH D_3 zugefügt nmol/L	Gemessen nmol/L	Wieder-findung nmol/L	Wieder-findung %
78,8	20	98,0	19,2	96,0%
	40	119,5	40,7	101,8%
32,0	20	51,7	19,7	98,5%
	40	75,3	43,3	108,3%
20,3	20	40,6	20,3	101,5%
	40	71,4	51,1	127,8%
32,4	20	50,2	17,8	89,0%
	40	69,2	36,8	92,0%
			Mittelwert	**101,9%**

16.5 Spezifität

Die Spezifität des Antiserums wurde mit den folgenden Analyten bei 50% Bindung des Nullkalibrators ermittelt.

Analyt	Kreuzreaktivität
25-Hydroxyvitamin D_3	100%
25-Hydroxyvitamin D_2	75%
24,25-Dihydroxyvitamin D_3	$\geq$100%
Cholecalciferol (D_3)	<0,01%
Ergocalciferol (D_2)	<0,30%

1. Uso Previsto

Per uso diagnostico in vitro

Il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA è un dosaggio radioimmunologico in fase liquida previsto per la determinazione quantitativa della 25-idrossivitamina D (25-OH D) e di altri metaboliti idrossilati nel siero o plasma umano. I risultati di questo dosaggio vanno usati dal medico, unitamente ad altri dati di laboratorio e clinici, per la valutazione della sufficienza di vitamina D nel paziente.

2. Sommario e spiegazione

Il nome vitamina D è un termine generale comunemente usato per identificare i componenti di una famiglia di secosteroidi. A seguito dell'esposizione alla luce solare, il 7-deidrocolesterolo, situato in profondità negli strati epidermici in fase di proliferazione attiva, subisce la segmentazione fotolitica dell'anello "B" dando luogo alla formazione di previtamina D_3 che si trasforma quindi spontaneamente nel suo isomero vitamina D_3 (colecalciferolo). La vitamina D_3 e la vitamina D_2 (ergocalciferolo) possono anche venire assunte tramite integratori del regime alimentare o il consumo di determinati cibi. La vitamina D_2 viene metabolizzata in maniera simile alla D_3.

La vitamina D viene immagazzinata nel tessuto adiposo ed entra nel circolo ematico associata alla proteina di legame della vitamina D (VDBP) e all'albumina. Nel fegato avviene una prima idrossilazione della vitamina D a 25-idrossivitamina D (25-OH D), che viene anch'essa messa in circolo associata alla proteina di legame. Si assiste quindi all'ulteriore idrossilazione di una piccola parte di 25-OH D ad opera dei reni (processo regolato in modo diretto dall'ormone paratiroideo e dai livelli di calcio ionizzato), che genera l'ormone calcitropico biologicamente attivo 1,25-diidrossivitamina D. L'ulteriore idrossilazione e il metabolismo della vitamina D produce composti idrosolubili e prontamente escreti.

Poiché l'attività dell'enzima epatico vitamina D 25-idrossilasi non è rigorosamente regolata, gli aumenti e le riduzioni nella produzione cutanea di vitamina D_3 o l'assunzione di vitamina D (D_2 o D_3) attraverso la dieta provocano fluttuazioni nei livelli di 25-OH D nel circolo ematico[(1)].

La misurazione dei livelli sierici di 25-OH D è considerata il metodo più attendibile per la determinazione dello stato vitaminico D del paziente e può essere quindi utilizzata per valutare la sufficienza dell'apporto di vitamina D del paziente[(2)]. La valutazione dello stato della vitamina D può inoltre essere necessaria per la determinazione delle possibili cause di concentrazioni anormali di calcio nel siero.

3. Descrizione del metodo

The Il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA è un metodo completo per l'estrazione e la determinazione quantitativa della 25-OH D e altri metaboliti idrossilati nel siero o plasma umano. L'aggiunta dei reagenti di estrazione 1 e 2 ai campioni e agli standard provoca la precipitazione delle proteine sieriche e l'estrazione della 25-OH D. Dopo la centrifugazione, determinate quantità di super-natante vengono incubate con 25-OH D marcata con ^{125}I e un anticorpo ovino anti-25-OH D altamente specifico. La separazione del tracciante legato all'anticorpo dal tracciante libero viene ottenuta grazie ad una breve incubazione con Sac-Cel® (anticorpi anti-IgG ovini legati a cellulosa) seguita da centrifugazione e decantazione. La radioattività residua (di legame) è inversamente proporzionale alla concentrazione di 25-OH D.

4. Precauzioni e avvertenze

Il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA è esclusivamente per uso diagnostico in vitro e non è concepito per l'uso interno in esseri umani o animali. Questo prodotto va utilizzato in ottemperanza alle istruzioni per l'uso allegate. La IDS Limited non risponderà di eventuali perdite o danni (ad eccezione di quanto predisposto dalla legge), indipend-entemente dalla loro natura, sorti dal non corretto utilizzo del kit in base alle istruzioni fornite.

ATTENZIONE: il presente kit contiene materiali di origine umana e/o animale. I reagenti del kit vanno pertanto trattati come potenziali vettori di agenti infettivi.
Per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento dei reagenti del kit è necessario adottare le opportune precauzioni e attenersi alle corrette prassi di laboratorio. Lo smaltimento dei reagenti del kit va eseguito nel rispetto delle normative vigenti.

Materiali radioattivi

- Il kit contiene materiale radioattivo (iodio-125; T½=60,14g; γ 35,5 KeV; X 27-32 KeV). Per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento del materiale radioattivo è necessario adottare le opportune precauzioni e attenersi alle corrette prassi di laboratorio. Il materiale radioattivo va acquistato, ricevuto, posseduto e utilizzato solo da parte di medici, laboratori clinici o ospedali, ed

esclusivamente a scopo di analisi in vitro. L'acquisto, il ricevimento, il possesso, l'uso e il trasferimento di materiali radioattivi è soggetto alle disposizioni delle normative vigenti.

- Il materiale radioattivo va conservato nel contenitore originale in locali appositi di un'area specificatamente designata. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato al solo personale autorizzato.
- Non consumare cibi o bevande, fumare o applicare cosmetici nelle aree destinate alla conservazione e alla manipolazione dei materiali radioattivi. Non pipettare i materiali radioattivi con pipette a bocca.
- Durante la manipolazione dei materiali radioattivi, indossare sempre un camice e dei guanti protettivi. Al termine delle operazioni, lavarsi sempre accuratamente le mani.
- Nel caso di versamento di materiali radioattivi, pulire immediatamente le superfici contaminate con del materiale assorbente, che va quindi eliminato come rifiuto radioattivo. L'area contaminata va successivamente lavata con un detergente alcalino o con una soluzione per la decontaminazione dai materiali radioattivi.
- Lo smaltimento dei materiali radioattivi va eseguito in ottemperanza alle normative vigenti a livello locale.
- Il trasporto e la manipolazione dei materiali radioattivi non devono essere consentiti ai minori di 18 anni.
- Le aree dedicate ai materiali radioattivi vanno tenute pulite. Per minimizzare la contaminazione, utilizzare contenitori e utensili di laboratorio monouso o facilmente decontaminabili. Dotare inoltre i banchi di laboratorio di coperture protettive assorbenti.

Acetonitrile

Il reagente di estrazione 2 REAG 2 contiene acetonitrile.

Classificazione (CLP):
Acute Tox. 4
Eye Irrit. 2
Flam. Liq. 2

Indicazioni di pericolo:

H225:	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H302+312+332:	Nocivo se ingerito, a contatto con la pelle o se inalato.
H319:	Provoca grave irritazione oculare.

Consigli di prudenza:

P260:	Non respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.
P301+310:	IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI o un medico
P303+361+353:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati.
P304+340:	IN CASO DI INALAZIONE: trasportare l'infortunato all'aria aperta e mantenerlo a riposo in posizione che favorisca la respirazione.
P305+351+338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare..

Sodio azide

Alcuni reagenti del kit contengono sodio azide come conservante. Tale sostanza può reagire con il piombo, il rame e l'ottone utilizzati nelle tubature di scarico, formando azoturi altamente esplosivi. Durante lo smaltimento attraverso i normali scarichi, per evitare l'accumulo di azoturi pericolosi, fare scorrere abbondanti volumi d'acqua.

Soluzione di idrossido di sodio (<1%)

Il reagente di estrazione 1 REAG 1 contiene soluzione di idrossido di sodio (<1%).

Classificazione (CLP):
Eye Irrit. 2
Skin Irrit. 2

Indicazioni di pericolo:

H315: Provoca irritazione cutanea.
H319: Provoca grave irritazione oculare

Consigli di prudenza:

P264: Lavare accuratamente mani dopo l'uso.
P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/il viso.
P305+351+338: IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare asciacquare.
P332+313: In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P337+313: Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.
P362: Togliersi di dosso gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

Siero umano

Standard CAL e controllo CTRL

I materiali di origine umana utilizzati nella preparazione di questi prodotti sono stati testati mediante dosaggi approvati dalla FDA per quanto riguarda la presenza di anticorpi anti-HIV (HIV 1 e HIV 2), di antigeni di superficie del virus dell'epatite B, di anticorpi anti-epatite B e hanno dato risultati negativi. Poiché nessun metodo di indagine è in grado di garantire l'assenza di agenti infettivi dai reagenti, questi vanno maneggiati come materiali potenzialmente infettivi (livello 2 di biosicurezza).

5. Durata e conservazione dei reagenti

Il presente kit, se correttamente conservato, è stabile fino alla data di scadenza indicata. Dopo il ricevimento, conservare tutti i reagenti a 2-8 °C.

Possibili segni di deterioramento dei reagenti del kit

- Presenza di materia particolata anomala in qualsiasi reagente.
- Diminuzione della capacità di legame massima.
- Elevato livello di legame non specifico.
- Traslazione della pendenza della curva dalla sua posizione normale.

6. Raccolta e conservazione dei campioni

Il dosaggio va eseguito su campioni di siero o plasma (EDTA o eparina). I campioni vanno separati il più presto possibile dopo il prelievo. Per la conservazione a lungo termine, riporli a -20°C. Non sottoporli a cicli ripetuti di congelamento/scongelamento.

Le suddette informazioni sulla stabilità e sulla conservazione dei campioni sono raccomandazioni generali per l'utilizzo in una vasta gamma di applicazioni di laboratorio. Per definire la propria gestione dei campioni e la stabilità di immagazzinaggio, ogni laboratorio deve attenersi alle linee guida o ai requisiti delle normative regionali, nazionali e/o federali oppure stabiliti da organismi di accreditamento. Per informazioni sulle prassi più appropriate, fare riferimento a CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

7. Materiali

Materiali forniti

CAL 0 - 6 - Standard:	Siero umano contenente 25-idrossivitamina D e sodio azide allo 0,09%, 1 mL/flacone, 7 flaconi per kit.
Ab - Antisiero:	Anticorpo ovino anti-25-idrossivitamina D in tampone fosfato, con sodio azide allo 0,09%, 52 mL/flacone, 2 flaconi per kit.
Ag ^{125}I - ^{125}I 25-Hydroxy Vitamin D:	25-idrossivitamina D marcata con ^{125}I in tampone fosfato, con sodio azide allo 0,09% e sostanze stabilizzanti brevettate. Contenuto radioattivo <185 kBq (5 µCi) per flacone, 10,5 mL/flacone.
Sac-Cel® :	Anticorpi anti-IgG ovini legati a cellulosa in tampone, con sodio azide allo 0,09%, 11 mL/flacone.
CTRL 1 - 2 - Controlli :	Siero umano contenente 25-idrossivitamina D e sodio azide allo 0,09%, 1 mL/flacone, 2 flaconi per kit.
REAG 1 - Reagente di estrazione 1:	Soluzione contenente idrossido di sodio (<1%), 5 mL/flacone.
REAG 2 - Reagente di estrazione 2:	Soluzione contenente acetonitrile, 26 mL/flacone.
BUF - Tampone per NSB:	Tampone fosfato contenente sodio azide allo 0,09%, 8 mL/flacone.

WASHBUF **20x** **- Soluzione di lavaggio concentrata:**
Soluzione salina tamponata al fosfato contenente Tween, 25 mL/flacone.

Materiali richiesti, ma non forniti

- Provette (12 x 75 mm) di vetro borosilicato a perdere.
  Nota: le provette di plastica non sono idonee. Le provette non vanno riutilizzate.
- Pipette automatiche di precisione per dispensare 50 µL, e 1 mL.
- Pipette a ripetizione (come Eppendorf Multipipette 4780 o equivalenti) per dispensare 50 µL, 100 µL, 500 µL, 1 mL e 3 mL.
- Agitatore vortex.
- Centrifuga da 2000 g. *È preferibile, ma non obbligatorio, l'uso di una centrifuga refrigerata.*
- Rastrelliera per la decantazione (come Nalgene 5970-0013+5979-0013 o equivalente).
- Contatore gamma per la rilevazione di ^{125}I.

8. Preparazione dei reagenti

8.1 Prima dell'uso, consentire la stabilizzazione a temperatura ambiente di tutti i reagenti.

8.2 Prima dell'uso, i reagenti vanno miscelati capovolgendo ripetutamente i rispettivi flaconi.

8.3 **Soluzione di lavaggio** **WASHBUF** **SOLN**

- Aggiungere il contenuto di ogni flacone della Soluzione di lavaggio concentrata WASHBUF 20x a 475 mL di acqua distillata o deionizzata.
- Conservare a 2-8 °C.

8.4 Tutti gli altri reagenti sono forniti pronti per l'uso.

9 Procedura di estrazione

9.1 Preparare le provette di vetro borosilicato etichettandole rispettivamente per standard CAL, controllo CTRL e campione SPE.

9.2 Aggiungere **50 µL** di standard CAL, controllo CTRL e campione nelle relative provette.

9.3 Aggiungere **50 µL** di reagente di estrazione 1 REAG 1 a tutte le provette. Agitare su vortex tutte le provette. Incubare a 18-25°C per 20 minuti.

9.4 Aggiungere **500 µL** di reagente di estrazione 2 REAG 2 a tutte le provette. Agitare su vortex tutte le provette. Centrifugare tutte le provette a 2000 g per 10 minuti.

10. Procedura del dosaggio

10.1 Preparare le provette di vetro borosilicato per i attività totale, per l'NSB (legame non specifico), per gli standard, gli controlli e i campioni (due provette ciascuno).

10.2 Aggiungere **50 µL** di supernatante estratto di standard, controllo o campione alle relative provette. Aggiungere 50 µL di supernatante estratto dello standard "A" (0) alle provette per l'NSB.

10.3 Aggiungere **100 µL** di ^{125}I 25-Hydroxy Vitamin D Ag ^{125}I a tutte le provette.

10.4 Aggiungere **1 mL** di antisiero Ab a tutte le provette, eccetto quelle per l'NSB e il attività totale. Aggiungere 1 mL di tampone per NSB BUF alle provette per l'NSB.

- Agitare delicatamente su vortex tutte le provette, senza però provocare la formazione di schiuma.
- Incubare a 18-25 °C per 90 minuti.

10.5 Aggiungere **100 µL** di Sac-Cel® a tutte le provette (ad eccezione di quelle dei attività totale).

- *Nota: immediatamente prima dell'uso, miscelare bene per risospendere la sostanza.*
- Agitare delicatamente su vortex tutte le provette, senza però provocare la formazione di schiuma. Incubare a 18-25 °C per 20 minuti.

10.6 Aggiungere **3 mL** di soluzione di lavaggio diluita WASHBUF SOLN a tutte le provette (ad eccezione di quelle dei attività totale). Centrifugare a 2000 g per 10 minuti.

10.7 Decantare i supernatanti (ad eccezione di quelle dei attività totale). Lasciare colare le provette su un tampone assorbente per 1 minuto; tamponare i bordi delle provette per rimuovere eventuali gocce residue.

10.8 Sottoporre tutte le provette al conteggio mediante contatore gamma idoneo per almeno 1 minuto.

11. Calibrazione

Gli standard per 25-OH D sono standardizzati mediante la quantificazione ai raggi ultravioletti.

12. Controllo di qualità

Per garantire la validità dei risultati nelle analisi di tutti i giorni, usare regolarmente dei campioni di controllo a diversa concentrazione di analita. Il kit fornisce due controlli che vanno analizzati come campioni sconosciuti. I valori ottenuti dagli controllo vanno inseriti in apposite tabelle di controllo della qualità, concepite per tracciare nel tempo il rendimento del metodo. A garanzia della precisione, è importante che i rivelatori dei contatori multipozzetto siano correttamente disposti e non contaminati.

13. Calcolo dei risultati

Calcolare la percentuale di legame (B/Bo%) di ogni standard, controllo e campione in base alla seguente formula:

$$B/Bo\% = \frac{\text{(conteggi medi - conteggi NSB)}}{\text{(conteggi medi per '0' - conteggi NSB)}} \times 100$$

Tracciare una curva di calibrazione su carta semilogaritmica, ponendo B/Bo% in ordinata e le concentrazioni di 25-idrossivitamina D in ascissa. Calcolare B/Bo% per ciascun campione sconosciuto e leggere i valori dalla curva in nmol/L (nM). Per l'interpolazione dei dati è possibile utilizzati vari algoritmi di calcolo; l'operatore deve comunque sempre accertarsi che la curva scelta sia appropriata e che sia in grado di fornire risultati affidabili. Si consiglia l'uso di una curva spline approssimata o di una curva logistica a 4 parametri.

Per la conversione delle unità, utilizzare la seguente formula:

$$X \text{ nmol/L} \underset{\Leftarrow \times 2,5}{\overset{\times 0,40 \Rightarrow}{\rightleftarrows}} Y \text{ ng/mL}$$

14. Limitazioni d'uso

- Qualora si sospetti che i campioni contengano concentrazioni di analita superiori a quelle dello standard, sarà necessario diluirli.
- I campioni con radioattività di fondo rilevabile non vanno utilizzati. I campioni eventualmente sospetti vanno sottoposti a screening per rilevarne l'eventuale radioattività prima di sottoporli ad analisi. In alternativa, è possibile riporre i campioni fino al raggiungimento di valori normali di radioattività, o prelevare e utilizzare nuovi campioni.
- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati vanno interpretati unitamente ai dati clinici presenti nella cartella del paziente e ad altre informazioni a disposizione del medico.
- Le seguenti sostanze sono state analizzate e non hanno dato adito a interferenze nell'ambito del dosaggio 25-Hydroxy Vitamin D:

Emoglobina:	testata fino a 200 mg/dL
Bilirubina:	testata fino a 500 µmol/L
Lipidi:	testati fino a 3,7 nmol/L di triglicerldi

15. Valori attesi

A titolo informativo vengono forniti i seguenti intervalli di riferimento ottenuti con il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA. Ogni laboratorio deve determinare i propri intervalli di riferimento in base alla popolazione locale.

Adulti normali 23 - 113 nmol/L (n = 24)

16. Caratteristiche del dosaggio

16.1 Accuratezza

Il kit IDS 25-Hydroxy Vitamin D RIA è stato messo a confronto con un dosaggio radioimmunologico noto per la determinazione quantitativa della 25-idrossivitamina D e di altri metaboliti idrossilati. Una popolazione di 187 campioni, selezionati per rappresentare un vasto spettro di valori di 25-idrossivitamina D [11,8 - 105 nmol/L], sono stati analizzati con entrambi i metodi in tre laboratori. L'analisi della regressione Passing & Bablok è stata effettuata sui dati comparativi:

IDS = 0,87(x) + 3,00; coefficiente di correlazione (r) = 0,95.

16.2 Sensibilità

La sensibilità, calcolata come la concentrazione corrispondente alla media meno 2 deviazioni standard di 10 replicati dello standard zero, è risultata <3 nmo/L.

16.3 Linearità

La linearità è stata valutata diluendo i campioni con tampone prima dell'estrazione e del dosaggio.

Campioni	Osservato nmol/L	Atteso nmol/L	% O/A
A	59,7		
A/2	27,7	28,9	92,9%
A/4	18,0	14,9	120,4%
B	43,6		
B/2	21,9	21,8	100,2%
B/4	13,0	10,9	119,1%
C	33,7		
C/2	15,2	16,8	90,3%
C/4	9,2	8,4	108,9%
		Media	**105,3%**

16.4 Precisione

Intra-dosaggio	n=10	Inter-dosaggio	n=25
media (nmol/L)	% CV	media (nmol/L)	% CV
26,5	5,3%	19,6	8,2%
58,4	5,0%	56,7	8,1%
151	6,1%	136	7,3%

16.5 Recupero

Il recupero è stato valutato aggiungendo ai campioni 25-OH D_3 prima dell'estrazione e del dosaggio.

Concentrazione del campione nmol/L	25-OH D_3 aggiunta nmol/L	Osservata nmol/L	Recupero nmol/L	Recupero %
78,8	20	98,0	19,2	96,0%
	40	119,5	40,7	101,8%
32,0	20	51,7	19,7	98,5%
	40	75,3	43,3	108,3%
20,3	20	40,6	20,3	101,5%
	40	71,4	51,1	127,8%
32,4	20	50,2	17,8	89,0%
	40	69,2	36,8	92,0%
			Media	**101,9%**

16. 6 Specificità

La specificità dell'antisiero è stata valutata con i seguenti analiti al 50% di legame dello standard zero.

Analita	Reattività crociata
25-idrossivitamina D_3	100%
25-idrossivitamina D_2	75%
24,25-diidrossivitamina D_3	$\geq$100%
colecalciferolo (D_3)	<0,01%
ergocalciferolo (D_2)	<0,30%

1. Uso previsto

Para diagnóstico in vitro

El kit 25-Hydroxy Vitamin D RIA de IDS es un radioinmunoensayo de fase líquida destinado a la determinación cuantitativa de 25-hidroxivitamina D (25-OH D) y otros metabolitos hidroxilados en suero o plasma humanos. El ensayo tiene la finalidad de ayudar al facultativo en la valoración de suficiencia de vitamina D, dentro del contexto de la información clínica y otras pruebas de laboratorio del paciente.

2. Resumen y explicación

"Vitamina D" es un término colectivo empleado comúnmente para hacer referencia a un grupo de *seco* esteroides estrechamente relacionados entre sí. En presencia de luz solar, el 7-dehidrocolesterol, que se encuentra en el interior de las capas epidérmicas de crecimiento activo, sufre la degradación fotolítica del anillo "B" para producir previtamina D_3, la cual se isomeriza a la vitamina D_3 (colecalciferol). Esta última y la vitamina D_2 (ergocalciferol) pueden obtenerse también por suplemento de la dieta o de un escaso número de alimentos. El metabolismo de la vitamina D_2 se comporta de forma similar al de la vitamina D_3.

La vitamina D se almacena en el tejido adiposo y entra en el torrente circulatorio ligada a su proteína de unión (VDBP) y a la albúmina. En el hígado, la vitamina D se hidroxila para formar 25-hidroxi-vitamina D, la cual también circula en forma de complejo con la VDBP. Una pequeña proporción de la 25-OH D sufre una hidroxilación adicional en el riñón, bajo regulación directa de la hormona paratiroidea y las concentraciones de ion calcio, para formar 1,25-dihidroxivitamina D, una hormona calciotrópica biológicamente activa. La hidroxilación y metabolización ulteriores de la vitamina D producen compuestos hidrosolubles que se excretan en poco tiempo.

Ya que la actividad hepática de la vitamina D-25-hidroxilasa no está regulada estrechamente, cualquier cambio en la producción cutánea de vitamina D_3 o la ingesta de vitamina D (D_3 o D_2) tiene el efecto de alterar los niveles circulantes de 25-OH D[(1)].

La concentración sérica de 25-OH D está considerada como la medida más fiable para valorar el estado general de la vitamina D, y por ende puede emplearse para determinar si el paciente dispone de un aporte suficiente de ésta[(2)]. Esta valoración puede ser necesaria en el diagnóstico de pacientes con anomalías en las concentraciones séricas de calcio.

3. Descripción del método

El kit 25-Hydroxy Vitamin D RIA de IDS es un ensayo completo destinado a la extracción y cuantificación de la 25-OH D y otros metabolitos hidroxilados en suero o plasma. La adición de los reactivos de extracción 1 y 2 a las muestras y calibradores provoca la precipitación de proteínas séricas y permite extraer la 25-OH D. Después de un paso de centrifugación, se incuban alícuotas del sobrenadante con 25-OH D marcada con ^{125}I y un anticuerpo ovino de alta especificidad frente a la 25-OH D. Mediante una breve incubación con Sac-Cel® (anti-IgG ovina unida a celulosa), seguida de centrifugación y decantación, se separa el trazador unido al anticuerpo del trazador libre. La radiactividad del complejo ligado es inversamente proporcional a la concentración de 25-OH D.

4. Advertencias y precauciones

El kit 25-Hydroxy Vitamin D RIA de IDS está diseñado únicamente para diagnóstico *in vitro,* y no está destinado al uso interno en seres humanos o animales. Este producto debe emplearse siguiendo rigurosamente las instrucciones enunciadas en el prospecto informativo. IDS Limited no se responsabilizará de ninguna pérdida o daño (salvo en los casos requeridos por la ley), independientemente de su causa, que se origine por incumplimiento de las instrucciones provistas.

PRECAUCIÓN: este kit contiene el material del origen humano y/o animal. Maneje los reactivo del kit como si sea capaz de transmitir un agente infeccioso.

Los reactivo del kit se deben almacenar, manejar y eliminar tomando las precauciones adecuadas y satisfaciendo las buenas prácticas de laboratorio. Los reactivo del kit deben desecharse de conformidad con los reglamentos locales.

Materiales radiactivos

- Este kit contiene material radiactivo (yodo-125; $T_{½}$=60,14d; γ 35,5 KeV; X 27-32 KeV), el cual debe ser almacenado, manejado y eliminado tomando las precauciones adecuadas y satisfaciendo las buenas prácticas de laboratorio. El material radiactivo podrá ser recibido, adquirido y utilizado sólo por médicos, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas de laboratorio *in vitro*. La

recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia de este material están sujetos a los reglamentos locales.

- Conservar los materiales radiactivos en su recipiente original, confinándolos a un área para este fin y etiquetada como tal. El acceso a los materiales radiactivos se limitará únicamente al personal autorizado.
- Abstenerse de comer, beber, fumar o usar cosméticos en áreas de almacenamiento o manipulación de materiales radiactivos. No pipetear material radiactivo con la boca.
- Usar siempre una bata de laboratorio y guantes desechables al manipular materiales radiactivos; al terminar, lavarse las manos cuidadosamente.
- Las áreas donde se produzcan derrames deben limpiarse de inmediato con un absorbente adecuado, que habrá de ser eliminado como residuo radiactivo. El área contaminada debe lavarse con un detergente alcalino o solución para descontaminación radiológica.
- El material radiactivo debe eliminarse de conformidad con los reglamentos locales.
- Se prohibirá manipular material radiactivo o entrar en las áreas de radiactividad a personas menores de 18 años de edad.
- Es imprescindible mantener limpias las áreas de almacenamiento de material radioactivo. Para reducir a un mínimo la contaminación, utilizar artículos de laboratorio desechables o de fácil descontaminación y cubrir las mesas de trabajo con forros absorbentes.

Acetonitrilo

El reactivo de extracción 2 REAG 2 contiene acetonitrilo.

Clasificación (CLP):
Acute Tox. 4
Eye Irrit. 2
Flam. Liq. 2

Indicaciones de peligro:

H225:	Líquido y vapores muy inflamables.
H302+312+332:	Nocivo en caso de ingestión, contacto con la piel o inhalación.
H319:	Provoca irritación ocular grave.

Consejos de prudencia:

P260:	No respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P280:	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P301+310:	EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar inmediatamente a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a un médico.
P303+361+353:	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas.
P304+340:	EN CASO DE INHALACIÓN: Transportar a la víctima al exterior y mantenerla en reposo en una posición confortable para respirar.
P305+351+338:	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

Azida sódica

Algunos de los reactivos de este kit contienen azida sódica como conservante, la cual puede reaccionar con las cañerías de plomo, cobre o bronce para formar azidas metálicas sumamente explosivas. Al desechar estos reactivos, enjuagar con abundante agua para impedir la acumulación de azidas.

Solución de hidróxido de sodio (< 1 %)

El reactivo de extracción 1 REAG 1 contiene hidróxido de sodio en solución (<1 %).

Clasificación (CLP):
Eye Irrit. 2
Skin Irrit. 2

Indicaciones de peligro:

H315:	Provoca irritación cutánea.
H319:	Provoca irritación ocular grave.

Consejos de prudencia:

P264:	Lavarse manos concienzudamente tras la manipulación.
P280:	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P305+351+338:	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos.

	Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
P332+313:	En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
P337+313:	Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.
P362:	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas

Suero humano

Calibradores CAL y controles CTRL

El material humano empleado para preparar este producto dio resultados negativos para el anticuerpo contra el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV I y II), el antígeno de superficie de la hepatitis B y el anticuerpo contra la hepatitis C, al ser analizado con los métodos recomendados por la FDA. Dado que no hay ninguna prueba capaz de ofrecer una garantía absoluta de la ausencia de agentes patogénicos, los reactivos deben ser manipulados acatando las normas de bioseguridad de nivel 2.

5. Duración y conservación de los reactivos

Si se conserva según las especificaciones, este kit es estable hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Al recibirlo, conservar todos los reactivos entre 2 y 8 °C.

Indicaciones de posible deterioro de los reactivos del kit

- Presencia de particulas anormales en alguno de los reactivos.
- Una disminución de la unión máxima.
- Alto nivel de uniones no específicas.
- Desplazamiento en la pendiente de la curva respecto a su posición normal.

6. Recogida y conservación de las muestras

El ensayo debe realizarse en muestras de suero o plasma (tratadas con EDTA o heparina). Las muestras deberán separarse lo antes posible después de su recogida; para conservación a largo plazo, almacenarlas a -20 °C. Evitar los ciclos de congelación y descongelación de las muestras.

La información de estabilidad y almacenamiento de muestras indicada anteriormente proporciona recomendaciones generales de uso en varios contextos de laboratorios. Cada laboratorio debe seguir las directrices o requisitos de las normas locales, nacionales y/o federales o de organizaciones autorizadas para establecer la estabilidad de almacenamiento y manipulación de sus propias muestras. Para obtener directrices sobre las prácticas adecuadas, consulte el documento CLSI GP44-A4, Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Test; Approved Guideline – Fourth Edition.

7. Materiales

Materiales suministrados

CAL 0 - 6 - Calibradores:	Suero humano que contiene 25-hidroxivitamina D y azida sódica al 0,09 %; 1 ml por frasco, 7 frascos por kit.
Ab - Antisuero:	Anti-25-hidroxivitamina D ovina en tampón fosfato con azida sódica al 0,09 %; 52 ml por frasco, 2 frascos por kit.
Ag ^{125}I - 25-Hidroxivitamina D marcada con ^{125}I:	25-Hidroxivitamina D marcada con ^{125}I en tampón fosfato, con azida sódica al 0,09 % y estabilizantes patentados. Contenido de radiactividad <185 kBq (5 µCi) por frasco; 10,5 ml por frasco.
Sac-Cel®:	Anti-IgG ovina unida a celulosa; suspensión en tampón con azida sódica al 0,09 %, 11 ml por frasco.
CTRL 1 - 2 - Controles:	Suero humano que contiene 25-hidroxivitamina D y azida sódica al 0,09 %; 1 ml por frasco, 2 frascos por kit.
REAG 1 - Reactivo de extracción 1:	Solución de hidróxido de sodio < 1 %; 5 ml por frasco.
REAG 2 - Reactivo de extracción 2:	Solución de acetonitrilo; 26 ml por frasco.
BUF - Tampón NSB:	Tampón fosfato con azida sódica al 0,09 %, 8 ml por frasco.
WASHBUF 20x - Concentrado para lavado:	Suero tamponado con fosfato que contiene Tween, 25 ml por frasco.

Materiales necesarios que no se suministran

- Tubos de vidrio de borosilicato, 12 x 75 mm.
  Nota: los tubos plásticos no son adecuados. No reutilizar los tubos.
- Micropipetas de alta precisión capaces de suministrar 50 µl y 1 ml.
- Pipeta multicanal para suministrar 50 µl, 100 µl, 500 µl, 1 ml y 3 ml, por ej., Eppendorf Multipipette 4780 o un equipo similar.
- Agitador vórtex.
- Centrifuga con capacidad de 2000 g. *Se recomienda (pero no se requiere) utilizar una centrifuga refrigerada.*
- Gradilla de decantación, por ej., Nalgene 5970-0013+5979-0013 o similar.
- Contador gamma válido para ^{125}I.

8. Preparación de los reactivos

8.1 Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes del uso.

8.2 Es preciso homogeneizar los reactivos invirtiéndolos varias veces antes de emplearlos en el ensayo.

8.3 **Solución de lavado** **WASHBUF** **SOLN**

- Añadir el contenido de cada frasco de concentrado para lavado WASHBUF 20x a 475 ml de agua destilada o desionizada.
- Conservar entre 2 y 8 °C.

8.4 Todos los demás reactivos se suministran listos para usarse.

9. Procedimiento de extracción

9.1 Preparar y etiquetar un tubo de vidrio de borosilicato por cada calibrador CAL, control CTRL y muestra SPE a analizar.

9.2 Añadir **50 µl** de calibrador CAL, control CTRL o muestra a analizar a los tubos con la etiqueta correspondiente.

9.3 Añadir a cada tubo **50 µl** de reactivo de extracción 1 REAG 1. Agitar en vórtex todos los tubos; incubar 20 minutos entre 18 y 25 °C.

9.4 Añadir a cada tubo **500 µl** de reactivo de extracción 2 REAG 2. Agitar en vórtex todos los tubos; centrifugarlos 10 minutos a 2000 g.

10. Procedimiento de ensayo

10.1 Por duplicado, preparar y etiquetar tubos de vidrio de borosilicato para: cuentas totales, NSB, calibradores, controles y muestras a analizar.

10.2 Añadir **50 µl** del sobrenadante del extracto del calibrador, control o muestra a analizar a los tubos con la etiqueta correspondiente. Añadir 50 µl del sobrenadante del extracto del calibrador “A” (0) a los tubos NSB.

10.3 Añadir **100 µl** de 25-hidroxivitamina D ^{125}I Ag ^{125}I a cada tubo.

10.4 Añadir **1 ml** de antisuero Ab a todos los tubos, salvo a los de cuentas totales y NSB. Añadir 1 ml de tampón NSB BUF a los tubos respectivos.

- Agitar los tubos en vórtex suavemente sin formar espuma.
- Incubar 90 minutos entre 18 y 25 °C.

10.5 Añadir **100 µl** de Sac-Cel® a todos los tubos (salvo a los de cuentas totales).

- *Nota: inmediatamente antes del uso, mezclar bien para volver a formar la suspensión.*
- Agitar todos los tubos en vórtex suavemente sin formar espuma. Incubar 20 minutos entre 18 y 25 °C.

10.5 Añadir **3 ml** de solución de lavado diluida WASHBUF SOLN a todos los tubos (salvo a los de cuentas totales). Centrifugar 10 minutos a 2000 g.

10.6 Decantar los sobrenadantes (salvo a los de cuentas totales). Invertir los tubos y dejarlos escurrir 1 minuto sobre papel absorbente. Secar las gotas de los bordes con papel absorbente.

10.7 Determinar el número de cuentas dejando los tubos en un contador gamma apropiado al menos 1 minuto.

11. Calibración

Los calibradores 25-OH D se han estandarizado mediante cuantificación U.V.

12. Control de calidad

Se recomienda el uso sistemático de muestras de control a diversas concentraciones del analito, para validar los resultados diarios. Se suministran dos controles en el kit, los cuales deben tratarse como si fueran muestras desconocidas. Se deben conservar los resultados del control de calidad para observar el rendimiento del ensayo. Para garantizar la alta precisión, es importante que los detectores en los contadores de pocillos múltiples están ajustados y estén exentos de contaminación.

13. Cálculo de los resultados

Calcular el porcentaje de unión (B/Bo %) de cada calibrador, control y muestra de la manera siguiente:

$$B/Bo\ \% = \frac{\text{(promedio de cuentas - cuentas NSB)}}{\text{(promedio de cuentas para "0" - cuentas NSB)}} \times 100$$

Preparar una curva estándar en papel gráfico semilogarítmico, representando en el eje de ordenadas B/Bo % y en el eje de las abscisas la concentración de 25-hidroxivitamina D. Calcular B/Bo % para cada muestra y leer los valores interpolándolos de la curva en nmol/l (nM). Pueden emplearse técnicas alternativas de cálculo de datos, pero en ese caso los usuarios deberán confirmar que el ajuste de la curva seleccionada es el correcto y da resultados aceptables. Se recomienda aplicar ajustes de curva suavizada SPLINE o 4PL.
Conversión de unidades:

$$\text{X nmol/l} \quad \overset{\times\, 0{,}40 \Rightarrow}{\underset{\Leftarrow\, \times\, 2{,}5}{}} \quad \text{Y ng/ml}$$

14. Limitaciones de uso

- Las muestras que parezcan contener concentraciones del analito superiores al estándar más elevado deben diluirse.
- No deben emplearse muestras que contengan radiactividad de fondo apreciable. Cualquier muestra sospechosa debe analizarse para descartar la presencia de radiactividad antes de realizar el ensayo. La muestra debe almacenarse hasta que haya decaído la radiactividad; como alternativa, deberá obtenerse otra muestra.
- Al igual que en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados deben interpretarse en el contexto del cuadro clínico del paciente y demás información disponible al facultativo.
- Se ha verificado que las sustancias siguientes no interfieren en el ensayo 25-Hydroxy Vitamin D:

Hemoglobina	verificada hasta 200 mg/dl
Bilirrubina	verificada hasta 500 µmol/l
Lípidos	verificados hasta 3,7 mmol/l de triglicéridos

15. Valores esperados

Utilizando el kit 25-Hydroxy Vitamin D RIA de IDS para determinar el siguiente intervalo, que se suministra únicamente como guía. Cada laboratorio debe determinar los intervalos de normalidad apropiados para su población local.

Adultos normales	23 - 113 nmol/l (n = 24)

16. Datos de funcionamiento

16.1 Exactitud

Se comparó el kit 25-Hydroxy Vitamin D RIA de IDS con un radioinmunoensayo reconocido para la determinación cuantitativa de 25-hidroxivitamina D y otros metabolitos hidroxilados. En tres laboratorios, se ensayó con cada método a una población de 187 muestras, seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones de 25-hidroxivitamina D (11,8 - 105 nmol/l). Se aplicó el análisis de regresión Passing y Bablok a los datos comparativos, obteniéndose los siguientes resultados:

IDS = 0,87(x) + 3,00; coeficiente de correlación (r) = 0,95

16.2 Sensibilidad

La sensibilidad, definida como la concentración correspondiente a la media menos 2 desviaciones estándar de 10 repeticiones del calibrador cero, es < 3 nmol/l.

16.3 Linealidad

Se determinó la linealidad diluyendo muestras con tampón antes de su extracción y ensayo.

Muestra	Medida nmol/l	Esperada nmol/l	% M/E
A	59,7		
A/2	27,7	28,9	92,9 %
A/4	18,0	14,9	120,4 %
B	43,6		
B/2	21,9	21,8	100,2 %
B/4	13,0	10,9	119,1 %
C	33,7		
C/2	15,2	16,8	90,3 %
C/4	9,2	8,4	108,9 %
		Media	**105,3 %**

16.4 Precisión

Media intraensayo (nmol/l)	n=10 % CV	Media interensayo (nmol/l)	n=25 % CV
26,5	5,3 %	19,6	8,2 %
58,4	5,0 %	56,7	8,1 %
151	6,1 %	136	7,3 %

16.5 Recuperación

Se determinó la recuperación añadiendo 25-OH D_3 a las muestras antes de su extracción y ensayo.

Conc. muestra nmol/l	25-OH D_3 añadida nmol/l	Medido nmol/l	Recuperación nmol/l	Recuperación %
78,8	20	98,0	19,2	96,0 %
	40	119,5	40,7	101,8 %
32,0	20	51,7	19,7	98,5 %
	40	75,3	43,3	108,3 %
20,3	20	40,6	20,3	101,5 %
	40	71,4	51,1	127,8 %
32,4	20	50,2	17,8	89,0 %
	40	69,2	36,8	92,0 %
			Media	**101,9 %**

16.6 Especificidad

Se determinó la especificidad del antisuero con los siguientes analitos, a un nivel de unión del 50 % con el calibrador cero.

Analito	Reactividad cruzada
25-hidroxivitamina D_3	100 %
25-hidroxivitamina D_2	75 %
24,25-dihidroxivitamina D_3	$\geq$ 100 %
Colecalciferol (D_3)	< 0,01 %
Ergocalciferol (D_2)	< 0,30 %

References • Bibliographie • Literatur • Bibliografia • Bibliografía

1. Reichel, H., Koeffler, H.P., Norman, A.W. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. N. Engl. J. Med. 320: 981-991. (1989)
2. Holick, M.F., Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc., In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research., 3rd Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 74-81. (1996).

Immunodiagnostic Systems Limited,
10 Didcot Way, Boldon Business Park,
Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, UK
Tel.: +44 191 519 0660 • Fax: +44 191 519 0760
e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com

Immunodiagnostic Systems

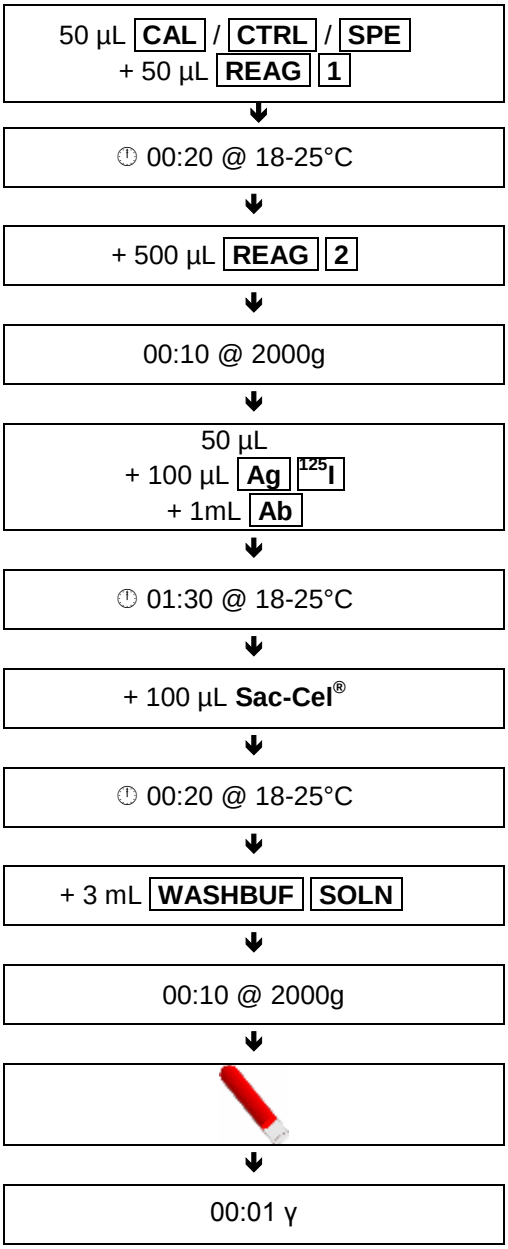
USA Immunodiagnostic Systems (IDS) Inc,
948 Clopper Road, Gaithersburg, MD 20878, USA.
Tel.: +1 877 852 6210 • Fax: +1 301 990 4236
e-mail: info.us@idsplc.com

France Immunodiagnostic Systems SAS,
153 Avenue D'Italie, 75013 Paris, France
Tel.: +33 140 770 450 • Fax: +33 140 770 455
e-mail: info.fr@idsplc.com

Belgium Immunodiagnostic Systems SA,
Rue Ernest Solvay 101, 4000 Liège, Belgium
Tel.: +32 425 226 36 • Fax: +32 425 251 96
e-mail: info.be@idsplc.com

Germany Immunodiagnostic Systems GmbH (IDS GmbH)
Mainzer Landstrasse 49, 60329 Frankfurt am Main.
Tel.: +49 693 085 5025 • Fax: +49 693 085 5125
e-mail: info.de@idsplc.com

Scandinavia Immunodiagnostic Systems Nordic a/s
(IDS Nordic a/s), International House, Center Boulevard 5,
2300 København S, Denmark
Tel:+45 448 400 91
e-mail: info.nordic@idsplc.com

Brazil IDS Brasil Diagnósticos Ltda.
Rua dos Pinheiros, 610 - conj 41 Edificio Win Work
Pinheiros
São Paulo, SP Brasil. CEP: 05422 001
Phone: +55 113 740 6100 • Fax: + 55 113 740 6105
email: info.br@idsplc.com

Procedure Summary
Résumé du procédé
Zusammenfassung des Testablaufes
Procedura
Resumen del procedimiento