



# VASOPRESSIN

## RIA

RK-AR1 100 tests

Revision date: 2012-09-12

**INTENDED USE**

This double antibody radioimmuno-assay is designed for the quantitative *in vitro* diagnostic determination of immunoreactive **arginine vasopressin** (anti-diuretic hormone, ADH) in EDTA plasma and urine after extraction (1-3).

**PRINCIPLE OF THE ASSAY**

Immunoreactive [Arg8] vasopressin is measured by a double-antibody radioimmunoassay using a modification of the method of Glick and Kagan (4). Column (or ethanol) extracted plasma samples and calibrators are pre-incubated for 24 hours with the anti-vasopressin antibody; <sup>125</sup>I-vasopressin competes then with vasopressin present in samples and calibrators for the same antibody binding sites. After a second 24 hour incubation, the solid phase second antibody is added to the mixture, the antibody-bound fraction is finally precipitated and counted.

The procedure recommends a solid-phase extraction of the plasma samples with reversed-phase columns (phenylsilylsilica). Alternatively, an extraction of plasma samples with ethanol may also be used. However, the values using the ethanol procedure are somewhat higher due to unspecific matrix effects (see Page 3).

**REAGENTS SUPPLIED AND PREPARATION**

Reagents	Quantity	Code	Reconstitution
<b>Extraction Columns (1ml)</b> Reversed phase columns containing 100 mg phenylsilylsilica	10 pieces	B-AEC	For column preparation and conditioning see chapter "Extraction"
<b>Phosphate Buffer</b> lyophilized Buffer	1 vial	B-AR1-PB	Reconstitute with 100 ml of deionized water
<b>Antiserum</b> lyophilized rabbit anti-vasopressin antibody	1 vial	B-AR1-AS	Reconstitute with 10 ml of deionized water
<b>Tracer</b> lyophilized <sup>125</sup> I-Vasopressin	1 vial	B-ADH-TR	Reconstitute with 11 ml of Phosphate Buffer
<b>Calibrator<sup>1)</sup></b> Lyophilized synthetic arginine vasopressin in Phosphate Buffer	1 vial	B-AR1-CA	Reconstitute with 5 ml of deionized water
<b>Controls Normal / High<sup>2)</sup></b> Arginine Vasopressin in a buffer matrix	2 vials	B-AR1-CONSET	Reconstitute with 5 ml of Phosphate Buffer
<b>Second Antibody</b> Cellulose coated anti-rabbit antibody	1 vial 11 ml	B-AB2	Ready to use

Table 1

<sup>1)</sup> Reconstitution of the Calibrator results in a stock solution of 80 pg/ml arginine vasopressin.

<sup>2)</sup> Lot specific amounts of arginine vasopressin in buffer matrix. Refer to the additional QC Data Sheets for exact concentrations.

**Note:** DO NOT EXTRACT NEITHER CONTROLS NOR CALIBRATORS.

**STORAGE AND SHELF LIFE OF REAGENTS**

Unopened Reagents	
The Extraction columns are stable at 18-28°C. The other kit components are stable at 2-8°C. Do not use past kit expiration date printed on the labels. Do not freeze the Second Antibody.	
Opened / Reconstituted Reagents	
Extraction columns	Used columns should be stored at 18-28°C and protected from light and dust.
Phosphate Buffer	Stable for 2 months at 2-8°C
Antiserum	Stable for 2 months at -20°C
Tracer	Store at -20°C. Aliquot if repeated use is expected
Calibrator	Stable for 2 months at -20°C
Controls	Aliquot if repeated use is expected
Second Antibody	Store at 2-8°C (do not freeze)

Table 2

**SAFETY PRECAUTIONS**

- **Radioactive Material:** This kit contains radioactive material which does not exceed 56 kBq of <sup>125</sup>Iodine.
- Receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the local regulations. Unused solutions and radioactive waste should be disposed of according to local State and Federal regulations.
- All kit reagents except of the extraction columns (B-AEC) and the second antibody (B-AB2) contain components of human origin. Although tested and found negative for HBV surface antigen, HCV and HIV1/2 antibodies, the reagents should be handled as if capable of transmitting infections and should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions.

**TECHNICAL PRECAUTIONS**

- Read carefully the instructions prior to carrying out the test. Test performance will be adversely affected if reagents are incorrectly diluted, modified or stored under conditions other than those as detailed in this instruction for use.
- Components must not be used after the expiry date printed on the labels.
- Do not mix different lots of reagents.
- Let the reagents adjust to reach room temperature. Reconstitute the lyophilized reagents as indicated. Mix well (vortex) the reagents before use.
- Counting time should be selected in order to keep statistical counting error small: e.g., at 2000 cpm the counting error is at 5%; at 10000 cpm it is only 1%.
- If the initial concentration of an unknown sample reads above the highest calibrator, the sample should be diluted with phosphate buffer and tested again according to the assay procedure.

**MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED**

- 100 µl, 400 µl, 500 µl, 1000 µl, and 5000 µl precision pipettes (or preferably a 100 - 1000 µl adjustable multipipette) with disposable tips.
- 10 ml volumetric pipette.
- Disposable polystyrene tubes for the preparation of the calibrator dilutions.
- Disposable conical polystyrene tubes to run the assay (e.g. Sarstedt # 57.477).
- Disposable polypropylene, polystyrene or glass tubes for the preparation of plasma extracts.
- Cylinder for the preparation of phosphate buffer.
- Deionized or distilled water.
- Methanol p.a. (e.g. Merck # 6009).
- 1 N HCl (hydrochloric acid) (e.g. Merck # 9057).
- Extraction vacuum manifold for applying the extraction columns (optional).
- Vacuum concentrator or supply of particle free nitrogen.
- Refrigerated centrifuge.
- Vortex rotator.
- Stir bar and magnetic stirrer.
- Aspiration device.
- Gamma counter.

**SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**

Appropriate sample collection is essential to ensure accurate results of the vasopressin analysis. If the procedure calls for true basal levels, the patient must be fasting for at least 12 hours and must stay recumbent, without any stress and in a quiet environment, for at least 1 hour prior to blood collection.

Collect at least 5 ml blood into an **EDTA venipuncture tube** and immediately place the sample on ice. Centrifuge at 2-8°C at 2000 x g for 15 minutes within 10 minutes of blood collection. Separate the plasma from the cells and freeze the specimen immediately at -20°C or precede to the extraction procedures (see below).

Vasopressin **in urine** remains stable for at least 2 months at -20°C, if such samples have been acidified with 10% (v/v) of 1 N HCl (hydrochloric acid) immediately after collection (6). After a short centrifugation step, these samples may be added directly to the conditioned extraction columns (see below). The procedure calls for 1 ml of EDTA plasma or urine (duplicate determinations).

### EXTRACTION

We recommend an extraction procedure using a reversed-phase column extraction which is highly specific for the adsorption and the subsequent elution of arginine vasopressin. Alternatively, an ethanol extraction method may also be used.

- The extraction columns provided with this kit can **each be utilized up to five times** if used according to the extraction procedures described in this protocol. Used columns should be stored at 18-28°C and protected from light and dust.
- The column extraction methods described below result in **recoveries** of more than 90% with <sup>125</sup>I-vasopressin or <sup>3</sup>H-vasopressin, respectively, spiked into human EDTA plasma samples.
- If samples have to be measured containing very low concentrations of arginine vasopressin the sample application volume may be increased up to 4 ml without a notable change in extraction recoveries (see Extractive Concentration in the assay performance below).
- The column extraction procedures were **tested and validated for human EDTA plasma** and **urine** samples. If other specimens such as **animal plasma** are used, it is recommended to validate the extraction recovery using a spike of <sup>125</sup>I-vasopressin in the specimen. The high ionic strength in **urine** due to high salt concentrations might interfere with the radioimmunoassay for vasopressin. Therefore, column extraction of urine samples after acidification with HCl is highly recommended (6). However, Panzali *et al.* (8) have assayed 17 urine samples without column extraction and found results close to those obtained with extracted samples.

### Extraction Procedure using Centrifugation

#### Sample Pretreatment

- Mark one polypropylene, polystyrene or glass tube for each sample to be extracted.
- Add 1 ml of corresponding plasma sample.
- Add 100 µl of 1 N HCl, vortex and centrifuge for 5 minutes at 2000 x g.
- Use acidified plasma supernatant in step Sample application

#### Column Preparation and Conditioning

- Mark one extraction column for each sample to be extracted and place into polypropylene, polystyrene or glass centrifugation tubes.
- Add 1 ml of methanol to columns and centrifuge for 1 minute at 200 x g. Repeat this step once.
- Add 1 ml of distilled or deionized water to columns, centrifuge for 1 minute at 200 x g. Repeat this step once.
- Empty tubes to avoid tips of extraction columns from contacting eluates.

#### Sample Application

- Load 1 ml of acidified sample onto the correspondingly marked column and centrifuge for 1 minute at 200 x g.

#### Washing

- Add 1 ml of distilled or deionized water to columns, centrifuge for 1 minute at 500 x g. Repeat this step once.

#### Elution of Extract

- Place each extraction column into a clean correspondingly marked polypropylene, polystyrene or glass tube.
- Add 1 ml of methanol containing 0.5 % (v/v) of 1 N HCl solution to columns and centrifuge for 1 minute at 200 x g.
- Use column for extracting the next sample (up to 5 times) or store column at 18-28°C and protected from light and dust.

#### Evaporation and Reconstitution of Extract

- Evaporate the methanol solution to dryness using a vacuum concentrator with a cold trap. Alternatively, use a 37°C heating block or water bath and evaporate the methanol to dryness with a stream of particle free nitrogen.
- Reconstitute the samples with 1 ml of phosphate buffer, vortex.
- Equilibrate the extracts for 30 minutes at 2-8°C and vortex them from time to time. Store reconstituted extracts capped and frozen at -20°C if not assayed immediately.

### Extraction Procedure Using Vacuum Manifold

With the help of negative pressure the fluids will be passed through the column. The procedure is the same as described in the Extraction procedure using centrifugation.

The following flow rates should be used:

- Sample application and elution should be done with a flow rate of 2 ml/min
- All the other fluids can pass the column with a flow rate of 5 ml/min.

### Ethanol Extraction of Samples

Alternatively, samples may be extracted using "ethanol precipitation".

- Mix 1 ml of each patient sample with 5 ml of chilled 98 % (v/v) ethanol. Vortex for 1 minute.
- Centrifuge for 20 minutes at 2-8°C and 1000 x g. Decant into another clean polypropylene, polystyrene or glass tube.
- Dry the supernatant in a vacuum concentrator. Alternatively, use a 37°C heating block or water bath and evaporate the ethanol to dryness with a stream of compressed and particle free nitrogen or air.
- Reconstitute the samples with 1 ml of phosphate buffer, vortex and store them frozen at -20°C if not assayed immediately.

With the ethanol extraction, samples show usual recoveries of 65-80%. Therefore, we recommend using as an internal recovery control 1 ml of EDTA plasma spiked with 50 µl of <sup>125</sup>I-Vasopressin. Compared to the total activity this factor can be used to calculate the recovery rate.

## ASSAY PROCEDURE

### Preparation of the standard curve:

In order to obtain an entire standard curve, serial dilutions of the Calibrator are prepared as follows:

- Label eight tubes A through H and pipet 1.0 ml of phosphate buffer into tubes B through H.
- Pipet 1.0 ml of the reconstituted Calibrator stock solution (80 pg/ml) into tubes A and B, vortex.
- Transfer 1.0 ml from tube B to tube C, vortex.
- Continue to transfer 1.0 ml from each tube until dilution series is completed. The corresponding concentrations of arginine vasopressin will be:

A 80 pg/ml (73.6 pmol/L)	E 5.0 pg/ml (4.6 pmol/L)
B 40 pg/ml (36.8 pmol/L)	F 2.5 pg/ml (2.3 pmol/L)
C 20 pg/ml (18.4 pmol/L)	G 1.25 pg/ml (1.1 pmol/L)
D 10 pg/ml (9.2 pmol/L)	H 0.63 pg/ml (0.6 pmol/L)

**Note: Allow all reagents for steps 1 to 4 to come to room temperature (18-28°C) prior to use.**

1. Label 11 polystyrene tubes in duplicate: A to H (Calibrators), NSB (blank), MB (maximum binding) and T (total activity). Label additional polystyrene tubes in duplicate for patient samples and controls.
- 2a. Pipet 500 µl of phosphate buffer into the NSB tubes and 400 µl into the MB tubes.
- 2b. Pipet 400 µl of each of the A to H Calibrators into the corresponding tubes.
- 2c. Pipet 400 µl of the extracted patient samples and controls (without extraction) into each of the corresponding tubes.
3. Add 100 µl of the vasopressin antiserum to all tubes except the NSB and T tubes. Vortex.
4. Incubate for 24 hours ± 3 hours at 2-8°C.
5. Add 100 µl of vasopressin tracer to all tubes. Vortex. Cap and remove the T tubes, they will require no further processing until counting step 12.
6. Incubate for 24 hours ± 3 hours at 2-8°C.
- 7a. Invert several times the bottle containing the solid phase second antibody, add a stir bar and place the bottle on a magnetic stirrer.
- 7b. While stirring continuously, add 100 µl of the suspension to each assay tube (except T tubes). Vortex.
8. Incubate for 20 minutes ± 1 minute at 18-28°C.
9. Add 1 ml of deionized water to each tube (except T tubes) **without resuspending the precipitates.**
10. Centrifuge for 5 minutes at 2-8°C and 1000 x g.
11. Aspirate all supernatants (**except the T tubes**) and retain the precipitates for counting.
12. Count all tubes for 1 minute in a gamma counter.

## INTERPRETATION OF RESULTS & STANDARDIZATION

Record the cpm for all tubes (T, NSB, MB, Calibrators A-H samples and Controls) and calculate the mean cpm for each pair of tubes. Subtract the mean assay blank (NSB tubes) from the respective mean of each pair of tubes:

$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{Average}} - \text{cpm}_{\text{Average NSB}}$$

Calculate the binding of each pair of tubes as a percent of maximum binding (MB tubes), with the NSB-corrected cpm of the MB tubes taken as 100%.

$$\text{percentbound} = \frac{\text{netcpm}}{\text{netMBcpm}} \times 100$$

Prepare a lin/log graph paper and plot the percent bound on the vertical axis against the Vasopressin concentration (pg/ml) on the horizontal axis for each of the Calibrators. Draw the best fitting curve or calculate the standard curve using a four parameter algorithm. Determine Vasopressin concentrations

for the patient samples and Controls from this standard curve. Alternative data reduction methods are equally acceptable.

In order to calculate the concentration in pmol/l, multiply the pg/ml values by a factor of 0.92.

Refer to Table 11 and Figure 1 for examples of results and standard curves. *These results and standard curves are for demonstration purposes only. A standard curve must be generated for each set of samples to be assayed.*

**Standardization:** The BÜHLMANN arginine vasopressin Calibrator is calibrated against WHO reference preparation 77/501.

## QUALITY CONTROL

A thorough understanding of this instruction for use is necessary for the successful use of the product. Reliable results will be obtained only by using precise laboratory techniques (current GLP guidelines) and accurately following this instruction for use.

The accuracy of each actual calibrator lot is controlled every three months by comparing with WHO reference preparation 77/501.

The reproducibility of standard curve parameters and control values should be within established limits of laboratory acceptability. The confidence limits for the Controls are lot-specific and printed on the QC Data Sheet added to the kit.

If the precision of the assay does not correlate with the established limits and repetition excludes errors in technique, check the following issues: i) pipetting, temperature controlling and timing devices ii) expiration dates of reagents iii) storage and incubation conditions iv) purity of water.

## PERFORMANCE LIMITATIONS

- It is mandatory using EDTA plasma **ONLY** in order to inhibit metalloprotease activities.
- Use of conical polystyrene tubes is strongly recommended. During step 11 of the assay procedure, a more solid pellet will be achieved and the following aspiration of the supernatant can be done much easier.
- Patient samples that are not properly collected and handled may cause inaccurate arginine vasopressin results (see Specimen Collection). Patient samples must be frozen immediately in order to ensure correct values at the time of measurement.
- Test results should be interpreted in conjunction with information available from clinical assessment of the patient and other diagnostic procedures.
- Vasopressin is extremely unstable. It is crucial to freeze the samples immediately. Transportation has to be at -20 °C.

## PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The assay performance characteristics have been validated in duplicates.

**Intra-Assay Precision (Within-Run): 7.6%.** The intra-assay precision was calculated from the results of 20 pairs of values from 3 column-extracted plasma samples spiked with different amount of arginine vasopressin in a single run. The values are presented in Table 12.

**Inter-Assay Precision (Run-to-Run): 10.0%.** The inter-assay precision was determined from the results of 20 pairs of values from 2 column-extracted and 2 non-extracted plasma samples assayed in 20 consecutive runs. The values are presented in Table 13.

**Detection limit (LoB): 0.39 pg/ml (0.36 pmol/l).** Twenty Zero Calibrator duplicates (phosphate buffer) were assayed in a single run. The Limit of Blank of vasopressin was calculated by subtracting two standard deviations from the mean cpm of

the maximum binding and intersecting this value with the standard curve obtained in the same run.

**Detection limit (LoQ): 1.9 pg/ml** (1.75 pmol/l). Five different serum samples with values between 1.3 and 4.1 pg/ml were tested 10 times each in duplicates in one assay. CV and mean value were calculated for each sample. The least detectable dose (limit of quantification) was observed at 10% CV.

**Dilution Linearity/Parallelism: 95.9%.** A human plasma sample was diluted serially with phosphate buffer before and after column extraction and subsequently assayed according to the assay procedure. The values are presented in Table 14.

**Spiking Recovery: 93.4%.** Three plasma samples were spiked with increasing amounts of synthetic arginine vasopressin, extracted with the column extraction method and analyzed according to the assay procedure. The values are presented in Table 15.

**Extractive Concentration: 96.7%.** Increasing volumes of a human plasma sample containing a low concentration of arginine vasopressin were applied onto extraction columns and extracted according to the protocol (see pages 3). Each of the resulting extract was reconstituted in 1 ml of phosphate buffer and subsequently assayed according to the assay procedure. The values are presented in Table 16.

**Specificity:** Cross-reactions of the vasopressin antiserum were determined at 50% binding and are presented in Table 17.

**Method comparison:** The Vasopressin RIA has been compared with the VASOPRESSIN direct RIA (RK-VPD, without column extraction). Results obtained with 28 blood donors (EDTA plasma) show an excellent correlation (see Figure 2).

#### Reference Intervals

In an evaluation including EDTA plasma samples from 53 apparently healthy blood donors, we have established the **normal value** (95<sup>th</sup> percentile) of: 3.6 pg/ml (see Table 18).

This referencel interval should be used as guideline only. It is recommended that each laboratory establishes its own expected range for its patient population.

Values for blood donors may be slightly elevated due to unknown fasting conditions and unknown position before donation. Therefore, correctly collected basal values are expected to be in the lower range or even undetectable. Most procedures need dynamic testing by stimulation or suppression of vasopressin release.

The clinical validity of the Bühlmann Vasopressin-RIA (RK-AR1) was demonstrated in many clinical and research publications (5-7).

## DEUTSCH

### VERWENDUNGSZWECK

Dieser Doppel-Antikörper Radioimmun-Assay RIA wird nach einer Extraktion für die quantitative in vitro diagnostische Bestimmung von **Arginin-Vasopressin** (Anti-diuretisches Hormon, ADH) in EDTA Plasma verwendet (1-3).

### PRINZIP DER METHODE

Immunreaktives Vasopressin wird mit Hilfe eines Doppel-Antikörper Radioimmunassays entsprechend der Methode von Glick und Kagan (4) bestimmt. Die Kalibratoren und die über Säulen (bzw. Ethanol) extrahierten Proben werden erst für 24 Stunden mit einem Anti-Vasopressin Antikörper vorinkubiert. Nach der Zugaben von <sup>125</sup>I-Vasopressin konkurrieren dieses mit dem in den Proben und Kalibratoren vorhandenen Vasopressin um die vorhandenen Antikörper Bindungsstellen. Nach einer zweiten Inkubation (24 Stunden), wird ein zweiter Antikörper zugegeben, welcher an einer festen Phase (Zellulose) gebunden ist. Die am Antikörper gebundene Fraktion wird danach präzipitiert und in einem Gamma-Counter gezählt.

Im Kit enthalten sind „reversed-phase“ Säulen (Phenylsilica) zur Festphasen Extraktion. Als mögliche Alternative kann auch eine Ethanol-Extraktion der Proben durchgeführt werden. Dabei ist zu beachten, daß die Werte nach einer Ethanol Extraktion aufgrund unspezifischer Matrixeffekte, um einiges höher liegen.

### GELIEFERTE REAGENZIEN UND VORBEREITUNG

Reagenz	Menge	Art.-Nr.	Rekonstitution
<b>Extraktionssäulen (1 ml)</b> "Reversed phase" Säulen mit 100 mg Phenylsilylsilica	10 Stück	B-AEC	Für Säulenvorbereitung siehe Kapitel „Extraktion“
<b>Phosphat-Puffer</b> lyophilisierter Puffer	1 Flasche	B-AR1-PB	Mit 100 ml deionisiertem Wasser lösen
<b>Antiserum</b> lyoph. Kaninchen Anti-Vasopressin Antikörper	1 Flasche	B-AR1-AS	Mit 10 ml deionisiertem Wasser lösen
<b>Tracer</b> lyoph. <sup>125</sup> I-Vasopressin	1 Flasche	B-ADH-TR	Mit 11 ml Phosphat-Puffer lösen
<b>Kalibrator<sup>1)</sup></b> Lyoph. synthetisches Arginin-Vasopressin in Phosphat-Puffer	1 Flasche	B-AR1-CA	Mit 5 ml deionisiertem Wasser lösen
<b>Kontrollen normal / hoch<sup>2)</sup></b> Arginin Vasopressin in einer Puffermatrix	2 Flaschen	B-AR1-CONSET	Mit 5 ml Phosphat-Puffer lösen
<b>2. Antikörper</b> Zellulose gebundener Anti-Kaninchen Antikörper	1 Flasche 11 ml	B-AR1-AB2	Gebrauchsfertig

Tabelle 3

<sup>2)</sup> Die Rekonstitution der Kalibratoren resultiert in einer Stocklösung von 80 pg/ml Arginin Vasopressin.

<sup>3)</sup> Lot-abhängige Menge Arginin-Vasopressin in einer Puffermatrix. Siehe zusätzliches QC Datenblatt für die genaue Konzentration.

**Hinweis:** WEDER DIE KONTROLLEN NOCH DIE KALIBRATOREN DÜRFEN EXTRAHIERT WERDEN.

### LAGERUNG UND HALTBARKEIT DER KONTROLLEN

Ungeöffnete Reagenzien	
Die Extraktionssäulen sind bei 18-28°C haltbar. Alle anderen Kitreagenzien sind bei 2-8°C haltbar. Nach Ablauf des Verfallsdatum nicht mehr verwenden. Den 2. Antikörper nicht einfrieren.	
Geöffnete / rekonstituierte Reagenzien	
Extraktionssäulen	Gebrauchte Säulen sollten bei 18-28°C vor Licht und Staub geschützt gelagert werden.
Phosphat-Puffer	Bei 2-8°C für 2 Monate haltbar
Antiserum	Bei -20°C für 2 Monate haltbar
Tracer	Bei -20°C lagern. Bei wiederholtem Gebrauch aliquotieren.
Kalibrator	Bei -20°C für 2 Monate haltbar.
Kontrollen	Bei wiederholtem Gebrauch aliquotieren.
2. Antikörper	Bei 2-8°C haltbar (nicht einfrieren)

Table 4

## VORSICHTSMASSNAHMEN

### SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Radioaktives Material: Der RK-VPD Kit enthält radioaktives Material (125Jod), das  $\gamma$ -Strahlung von weniger als 56 kBq abgibt.
- Der Erwerb, sowie der Gebrauch von radioaktivem Material muss entsprechend der landesspezifischen Bestimmungen erfolgen. Wir empfehlen, dass Sie sich über die lokalen Bestimmungen Ihres Landes bezüglich der Vorsichtsmaßnahmen beim Gebrauch und der Entsorgung von Kitreagenzien, radioaktivem Material und Patientenproben informieren.
- Reagenzien, die Material humanen Ursprungs enthalten: Alle Kitreagenzien, ausser den Säulen (B-AEC) und dem 2. Antikörper (B-AB2) enthalten Komponenten menschlichen Ursprungs. Obwohl sie negativ in Tests für HBV Oberflächenantigen, HCV und HIV1/2 Antikörper waren, sollten gemäss Good Laboratory Practice als potentiell infektiös behandelt werden und die entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen getroffen werden.

### TECHNISCHE VORSICHTSMASSNAHMEN

- Lesen Sie die Arbeitsanleitung sorgfältig vor der Testdurchführung. Die Testqualität kann negativ beeinflusst werden, wenn die Reagenzien nicht korrekt verdünnt oder verändert werden sowie nicht entsprechend der in dieser Anleitung angegebenen Lagerungsbedingungen gelagert werden.
- Die Reagenzien dürfen nicht nach dem Verfallsdatum verwendet werden, das auf den Etiketten angegeben ist.
- Mischen Sie nicht Reagenzien verschiedener Lots.
- Lassen Sie die Reagenzien auf Raumtemperatur äquilibrieren. Lösen Sie lyophilisierte Reagenzien wie angegeben auf. Reagenzien vor Gebrauch gut mischen (vortexen).
- Die Zählzeit sollte so gewählt werden, dass der statische Zählfehler klein ist. Bei 2000 cpm ist der Zählfehler bei 5%; bei 10000 cpm nur noch 1%.
- Falls die Konzentration einer unbekannt Probe höher als der höchste Kalibrator ist, muss die Probe mit Phosphat-Puffer weiter verdünnt und noch einmal getestet werden.

### ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- 100  $\mu$ l, 250  $\mu$ l, 400  $\mu$ l und 1000  $\mu$ l Präzisionspipetten mit Einwegspitzen.
- 5.0 ml und 10 ml volumetrische Pipette.
- Becher und Messzylinder für die Rekonstitution des Phosphat-Puffers.
- Einweg-Polystyrenröhrchen für die Vorbereitung der Kalibratoren-Verdünnungen.
- Konische Einweg-Polystyrenröhrchen für die Testdurchführung (z.B. Sarstedt Art.-Nr. 57.477).
- Einweg-Polypropylen-, -Polystyren oder -Glassröhrchen für die Vorbereitung der Plasmaextrakte
- Vakuumpumpe zum Gebrauch für die Extraktionssäulen (optionell).
- Vakuumpkonzentrator oder Heizblock mit N<sub>2</sub>-Zufuhr.
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser.
- Methanol p.a. (e.g. Merck # 6009).
- 1 N HCl (Salzsäure) (e.g. Merck # 9057).
- Vortex Schüttler.
- Magnetrührer mit Rührstab.
- gekühlte Zentrifuge.
- Aspirationsvorrichtung.
- Gammastrahlungszähler (Gamma-Counter).

## UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND LAGERUNG

Eine korrekte Probengewinnung ist essentiell für das Erhalten aussagekräftiger Resultate in der Vasopressin-Analyse. Falls die Testdurchführung nach tatsächlichen Basalwerten verlangt, darf der Patient während mindestens 12 Stunden keine Nahrung zu sich nehmen und muß für mindestens 1 Stunde vor der Blutentnahme in einer ruhigen Umgebung ohne Streßeinwirkung liegen.

Die Blutproben (mindestens 2 ml) werden in **EDTA Blutabnahmeröhrchen** gesammelt, unmittelbar danach auf Eis gelegt und innerhalb von 10 Minuten für 15 Minuten bei 2-8°C und 2000 x g zentrifugiert. Das Plasma wird von den Zellen getrennt und in einem Plastikröhrchen bei -20°C direkt eingefroren. Zur Testdurchführung werden 400  $\mu$ l Plasma pro Probenröhrchen benötigt.

Vasopressin in **Urin** bleibt bei -20°C für mindestens 2 Monate stabil, falls die Proben unmittelbar nach Abnahme mit 10% (v/v) 1N HCl (Salzsäure) versetzt werden (6). Nach einem kurzen Zentrifugationsschritt können diese Proben direkt auf die vorbereiteten Extraktionssäulen gegeben werden (siehe unten). Für die Testdurchführung in Doppelansätzen werden 1 ml EDTA Plasma oder Urin gebraucht.

### EXTRAKTION

Wir empfehlen die Extraktion mit den mitgelieferten "reversed phase" Säulen, die hoch spezifisch für die Absorption und die nachfolgende Eluation von Vasopressin sind. Als mögliche alternative kann eine Ethanol-Extraktion angewendet werden.

- Die mit dem Kit mitgelieferten Extraktionssäulen können **bis zu fünfmal wiederverwendet** werden, falls diese entsprechend der Extraktionsanleitung in dieser Gebrauchsanleitung durchgeführt werden. Gebrauchte Säulen sollten vor Licht und Staub geschützt bei 18-28°C gelagert werden.
- Mit der unten beschriebenen Säulenextraktionsmethode wird eine Wiederfindung von <sup>125</sup>I-Vasopressin oder <sup>3</sup>H-Vasopressin von >90% erreicht, welches humanem Plasma zugegeben wurde.
- Bei Proben mit sehr tiefen Vasopressin-Konzentrationen kann das eingesetzte Probenvolumen bis zu 4 ml erhöht werden, ohne einen bedeutenden Einfluß auf die Extraktionswiederfindung (siehe Extraktive Aufkonzentrierung in den Leistungsmerkmalen).
- Die Säulenextraktion wurde **für humanes EDTA-Plasma und Urin getestet und validiert**. Falls EDTA-Plasma von **Tieren** gemessen werden sollen, wird empfohlen die Extraktionswiederfindung mit <sup>125</sup>I-Vasopressin versetzten Proben auszutesten. Aufgrund der hohen Salzkonzentrationen im Urin ist es möglich, dass die hohe Ionenstärke mit dem Vasopressin Radioimmun-Assay interferiert. Aus diesem Grunde wird empfohlen vor der Säulenextraktion die Proben mit HCl zu behandeln (6). Dies obwohl Panzali *et al.* (8) in einer Studie 17 Urinproben ohne Säulenextraktion gemessen hat und auf sehr ähnliche Resultate kamen wie mit extrahierten Proben.

### Säulenextraktion mit Zentrifugation

#### Probenvorbehandlung

- Für jede Probe ein Polypropylen, Polystyren oder Glassröhrchen beschriften.
- 1 ml der entsprechenden Plasmaprobe zugeben.
- 100  $\mu$ l 1N HCl zugeben, vortexen und für 5 Minuten bei 2000 x g zentrifugieren.
- Den angesäuerten Plasma-Überstand auf die vorbereiteten Säulen geben.

#### Vorbereitung der Säulen

- Pro Patientenplasma eine Säule beschriften, Säule in ein Polypropylen-Zentrifugenröhrchen stellen.

- 1 ml Methanol auf die Säule geben, 1 Minute bei 200 x g zentrifugieren. Diesen Schritt einmal wiederholen.
- 1 ml deionisiertes Wasser auf die Säule geben, 1 Minute bei 200 x g zentrifugieren. Diesen Schritt einmal wiederholen
- Röhrchen entleeren um zu verhindern dass die Säulen mit dem Eluat kontaminiert werden.

#### Auftragen der Proben

- 1 ml angesäuerte Probe auf die entsprechend beschriftete Säule geben, 1 Minute bei 200 x g zentrifugieren.

#### Waschen

- 1 ml deionisiertes Wasser auf die Säule geben, 1 Minute bei 500 x g zentrifugieren. Diesen Schritt einmal wiederholen.

#### Eluieren des Extrakts

- Jede Säule in ein frisches, entsprechend beschriftetes, Polypropylenröhrchen setzen.
- 1 ml Methanol mit 0.5% (v/v) 1N HCl auf jede Säule geben, 1 Minute bei 200 x g zentrifugieren.
- Die Säule kann nun zum Extrahieren der nächsten Probe verwendet werden (bis zu fünfmal).

#### Eintrocknen und Rekonstitution

- Das Methanol-Eluat zum Trocknen eindampfen (Vakuumkonzentrator oder 37°C Heizblock mit Stickstoff Begasung).
- Die Proben mit 1 ml Phosphat-Puffer lösen, vortexen.
- 30 Minuten bei 2-8°C stehen lassen und von Zeit zu Zeit kurz vortexen. Bei nicht sofortigem Gebrauch gelöste Proben verschlossen bei -20°C lagern.

#### **Säulenextraktion mit Vakuumpumpe**

Bei der Säulenextraktion mit Hilfe einer Vakuumpumpe, hier wird die Flüssigkeit durch Unterdruck durch die Säulen gesaugt, wird analog der Zentrifugationsmethode verfahren. Folgenden Durchflußraten sind hierbei zu beachten:

- Auftragen der Probe und Eluieren des Extrakts sollten bei 2 ml/min erfolgen.
- Alle weiteren Flüssigkeiten können mit 5 ml/min die Säulen passieren.

#### **Ethanol Extraktion der Proben**

- 1 ml Patientenprobe mit 5 ml gekühltem 98% (v/v) Ethanol mischen, für 1 Minute vortexen.
- 20 Minuten bei 2-8°C und 1000 x g zentrifugieren.
- Den Überstand in ein neues Röhrchen dekantieren.
- Den Überstand in einem Vakuumkonzentrator trocknen oder alternative in einem 37°C Heizblock mit N<sub>2</sub> Begasung eindampfen
- Die Proben mit 1 ml Phosphat-Puffer lösen, vortexen. Bei nicht sofortigem Gebrauch gelöste Proben verschlossen bei -20°C lagern.

Die Extraktionsausbeute in humanem EDTA-Plasma liegt normalerweise zwischen 65 und 80%. Zur internen Wiederfindungskontrolle empfehlen wir 1 ml Plasma mit 50 µl <sup>125</sup>I-Vasopressin zu mischen und zu extrahieren. Aus dem Vergleich mit der Gesamtaktivität lässt sich die Wiederfindungsrate bestimmen.

#### **TECHNISCHE HINWEISE**

**Kalibrator Verdünnung:** Um eine vollständige Standardkurve zu erhalten, muss eine serielle Verdünnungsreihe folgendermaßen durchgeführt werden:

1. Acht Röhrchen von A-H markieren und 1 ml Phosphat-Puffer in Röhrchen B-H pipettieren.
2. 1 ml gelöste Kalibrator Stocklösung (80 pg/ml) in Röhrchen A und B geben, vortexen.
3. 1 ml von Röhrchen B in Röhrchen C geben, vortexen.
4. Jeweils 1 ml in das nächste Röhrchen geben und vortexen, um die Verdünnungsreihe zu erstellen.

Folgende Arginin Vasopressin-Konzentrationen herstellen:

A 80 pg/ml (73.6 pmol/l)      E 5.0 pg/ml (4.6 pmol/l)

B 40 pg/ml (36.8 pmol/l)      F 2.5 pg/ml (2.3 pmol/l)  
 C20 pg/ml (18.4 pmol/l)      G 1.25 pg/ml (1.1 pmol/l)  
 D10 pg/ml (9.2 pmol/l)      H 0.63 pg/ml (0.6 pmol/l)

#### **TESTDURCHFÜHRUNG**

**Alle Reagenzien für die Schritte 1 bis 4 müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-28°C) gebracht werden.**

1. 11 Polystyrenröhrchen im Doppel markieren: A bis H (Kalibrator), NSB (Blank), MB (maximale Bindung) und T (totale Aktivität). Weitere Röhrchen im Doppel für die Patientenproben und die Kontrollen markieren.
- 2a. 500 µl Phosphat-Puffer in das NSB und 400 µl in das MB Röhrchen geben.
- 2b. 400 µl von jedem Kalibrator (A-H) in das entsprechende Röhrchen geben.
- 2c. 400 µl Patientenproben und Kontrollen in das entsprechende Röhrchen geben.
3. 100 µl Vasopressin-Antiserum zu allen Röhrchen geben, ausser dem NSB und dem T Röhrchen.
4. Alle Röhrchen bei 2-8°C für 24±3 Stunden inkubieren.
5. 100 µl Vasopressin-Tracer zu allen Röhrchen geben, vortexen. Das T-Röhrchen bis zum Schritt 12, zur Seite legen.
6. Die verbleibenden Röhrchen für 24±3 Stunden bei 2-8°C inkubieren
- 7a. Die Flasche mit dem 2. Antikörper (feste Phase) mehrmals schwenken und das Sediment mit einem Rührstab auf einem Magnetrührer lösen.
- 7b. Unter Rühren, werden je 100 µl des 2. Antikörpers zu sämtlichen Probenröhrchen (außer T-Röhrchen) zugegeben, vortexen.
8. Für 20 ± 1 Minuten bei 18-28°C inkubieren.
9. 1 ml deionisiertes Wasser zu jedem Röhrchen (ausser T-Röhrchen) geben. **Das Präzipitat danach nicht mehr lösen.**
10. Für 5 Minuten bei 2-8°C und 1000 x g zentrifugieren.
11. Den Überstand (außer T Röhrchen) absaugen und das Präzipitat für die Messung verwenden.
12. Alle Röhrchen für eine Minute in einem Gamma-Counter messen.

#### **BERECHNUNG DER ERGEBNISSE & STANDARDISIERUNG**

Für alle Röhrchen werden im Gammazähler die cpm bestimmt (T, NSB, MB, Kalibratoren A-H, Proben und Kontrollen) und die entsprechenden Mittelwerte ermittelt. Der Mittelwert vom Blank (NSB) wird von den anderen Mittelwerten subtrahiert.

$$\text{Netto cpm} = \text{cpm}_{\text{Mittelwert}} - \text{cpm}_{\text{Mittelwert NSB}}$$

Die Bindung (%) der Kalibratoren und Proben wird errechnet als Quotient des jeweiligen Mittelwertes (cpm) zum MB (cpm).

$$\% \text{ Bindung} = \frac{\text{netto cpm}}{\text{netto MB cpm}} \times 100$$

Auf einem halblogarithmischen (lin/log) Papier wird auf der vertikalen Achse die Bindung in Prozent und auf der horizontalen Achse die Vasopressin-Konzentration der Kalibratoren (pg/ml) aufgetragen. Die beste passende Kurve durch die Punkte zeichnen oder mit einem entsprechenden Computerprogramm eine 4-Parameter Analyse anwenden.

Die Vasopressinkonzentrationen der Patientenproben und der Kontrollen aus der erstellten Standardkurve herauslesen. Alternative Datenverdichtungsmethoden können ebenfalls verwendet werden.

Um die erhaltenene Konzentrationen in pmol/l zu erhalten werden die Werte mit dem Faktor 0.92 multipliziert.

**Standardisierung:** Der BÜHLMANN Arginin-Vasopressin Kalibrator wurde gegen die WHO-Referenzpräparation 77/501 kalibriert.

Für ein Zahlenbeispiel und eine Standardkurve siehe Table 11 und Figure 1. Diese Standardkurve ist nur zu Anschauungszwecken dargestellt. Eine Standardkurve muß für jedes zu testende Probenet erstellt werden.

### QUALITÄTSKONTROLLE

Ein vollständiges Verständnis dieser Testpackungsbeilage ist für den erfolgreichen Gebrauch des Produktes notwendig. Zuverlässige Resultate werden nur erreicht durch die Anwendung „Guter Laborpraxis“ (aktuelle GLP Richtlinien) und die Einhaltung der Arbeitsanleitung.

Jedes Kalibratoren-Lot wird gegen das WHO Referenzpräparat 77/501 getestet.

Die Reproduzierbarkeit der Eichkurvenparameter und der Kontrollwerte sollte innerhalb des etablierten Erwartungsbereiches liegen. Alle Kontrollen müssen im etablierten Vertrauensbereich liegen. Die Vertrauensbereiche der Kontrollen sind Lot-spezifisch und sind auf dem zusätzlichen QC-Datenblatt angegeben.

Falls die Präzision des Testes nicht mit dem etablierten Erwartungsbereich übereinstimmt und wiederholte Messungen ein technisches Problem ausschließen, sind folgende Bedingungen zu überprüfen: i) Pipettierung, Temperatur- und Zeitmessende Geräte, ii) Verfallsdaten der Reagenzien, iii) Lagerung- und Inkubations-Bedingungen, iv) Wasserreinheit.

### LEISTUNGSEINSCHRÄNKUNGEN

- Es muss EDTA-Plasma verwendet werden, um Metalloproteasen zu deaktivieren.
- Die **Verwendung konischer Polystyrenröhrchen** wird dringen empfohlen. Während Schritt 11 der Arbeitsanleitung, wird dadurch ein kompakteres Pellet erhalten, und das nachfolgende Absaugen des Überstandes kann einfacher durchgeführt werden.
- Nicht korrekt gesammelte, oder behandelte Patientenproben können zu ungenauen Resultaten führen. Die Plasma-proben müssen unmittelbar nach Abnahme eingefroren werden, um die Richtigkeit der Vasopressin-Konzentration zum Zeitpunkt der Messung zu gewährleisten.
- Die Testergebnisse sollten stets in Verbindung mit zusätzlichen Informationen aus der Anamnese des Patienten und weiteren diagnostischen Verfahren bewertet werden.
- Vasopressin ist extrem instabil. Es ist erforderlich, die Proben sofort einzufrieren. Der Probentransport muss bei -20 °C erfolgen.

### LEISTUNGSMERKMALE

Die Leistungsmerkmale wurden in Doppelbestimmungen ermittelt.

**Intra-Assay-Präzision: 7.6%.** Die Intra-Assay-Präzision wurde aus den Resultaten von 20 Wertepaaren errechnet, die im gleichen Testansatz erhalten wurden. Diese stammen von drei extrahierten Proben, welche mit verschiedenen Mengen Arginin Vasopressin versetzt wurden. Die Resultate sind in Table 12 angegeben.

**Inter-Assay-Präzision: 10.0%.** Die Inter-Assay-Präzision wurde aus den Resultaten von 20 Wertepaaren, von zwei extrahierten und zwei nicht extrahierten Proben, aus 20 verschiedenen Testansätzen berechnet. Die Resultate sind in Table 13 angegeben.

**Nachweisgrenze (LoB): 0.39 pg/ml (0.36 pmol/l).** Zwanzig MB-Doppelwerte (Phosphat-Puffer) wurden im gleichen Ansatz getestet. Die analytische Sensitivität wurde durch die Subtraktion von zwei Standardabweichungen vom cpm

Mittelwert des MB berechnet und durch Intersektion auf der gleichzeitig erhaltenen Standardkurve bestimmt.

**Nachweisgrenze (LoQ): 1.9 pg/ml (1.75 pmol/l).** 5 Plasmaproben mit Werten zwischen 1.3 und 4.1 pg/ml wurden je 10 x 10 in Doppelbestimmung in einem Test bestimmt. Es wurde jeweils der Mittelwert und der CV bestimmt. Die kleinste nachweisbare Konzentration (limit of quantification) bei einem Grenzwert des Variationskoeffizienten von 10%.

**Verdünnungslinearität/Parallelismus: 95.9%.** Eine humane Plasmaprobe, welche vor und nach der Säulenextraktion mit Phosphat-Puffer seriell verdünnt wurde, wurde entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 14 angegeben.

**Wiederfindung: 93.4%.** Drei Plasmaproben wurden mit aufsteigender Arginin-Vasopressin Konzentration versetzt, auf den Säulen extrahiert und danach entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 15 angegeben.

**Extraktive Konzentration: 96.7%.** Aufsteigende Volumina von humanen Plasmaproben mit tiefen Vasopressin-Konzentrationen wurden auf die Säulen gegeben und entsprechend der Arbeitsanleitung extrahiert. Jeder Extrakt wurde nach dem Eintrocknen mit 1 ml Phosphat-Puffer gelöst und danach entsprechend der Arbeitsanleitung getestet. Die Resultate sind in Table 16 angegeben.

**Spezifität:** Kreuzreaktionen des Vasopressin Antiserums wurden bei einer 50% Bindung mit verschiedenen Reagenzien bestimmt und sind in Table 17 dargestellt.

**Methodenvergleich:** Der Vasopressin RIA wurde mit dem Bühlmann Vasopressin direct RIA (RK-VPD, ohne Säulenextraktion) Die Resultate von 28 normalen Blutspendern (EDTA Plasma) zeigen eine sehr gute Korrelation (siehe Figure 2).

### REFERENZBEREICHE

In einer Evaluation mit 53 EDTA-Plasma von normalen Blutspendern wurde ein Referenzbereich (95. Percentile) von 3.6 pg/ml ermittelt (siehe Table 18).

Dieser Referenzbereich sollte nur als Richtlinie angesehen werden. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Normalwert für die entsprechende Patientenpopulation ermittelt.

Die Werte von Blutspendern können leicht erhöht sein, da zumeist nicht bekannt ist, ob der Spender in den letzten 12 Stunden Nahrung zu sich genommen hat und ob er in liegender Position war. Es ist anzunehmen, daß korrekt abgenommene Blutproben im unteren Bereich oder sogar nicht nachweisbar sind. Vasopressin wird meist nach Durchführung dynamischer Tests nach Stimulation oder Suppression der Vasopressin Ausschüttung bestimmt.

Die klinische Relevanz des Bühlmann Vasopressin RIA wurde in verschiedenen klinischen und Forschungspublikationen gezeigt (5-7).



## DOMAINE D'UTILISATION

Ce radio-immunoassay (double anticorps) est destiné à la détermination quantitative *in vitro* de l'arginine vasopressine immuno-réactive (hormone anti-diurétique, ADH) dans les échantillons de plasma EDTA et d'urine après extraction (1-3).

## PRINCIPE DU DOSAGE

L'arginine vasopressine est dosée au moyen d'un RIA à double anticorps basé sur la méthode modifiée de Glick et Kagan (4). Après extraction (colonne ou éthanol), les échantillons plasmatiques et les calibrateurs sont pré-incubés durant 24 heures avec l'anticorps anti-vasopressine. La vasopressine marquée à  $^{125}\text{I}$  entre en compétition avec celle présente dans les échantillons et les calibrateurs pour les mêmes sites de liaison de l'anticorps. Après une seconde incubation de 24 heures, le second anticorps en phase solide est ajouté au mélange. La fraction liée est finalement précipitée puis mesurée.

Cette procédure nécessite une extraction en phase solide des échantillons plasmatiques au moyen de colonnes d'extraction en phase inverse (phénylsilylsilicate). Alternativement, l'extraction des échantillons plasmatiques avec de l'éthanol est également possible.

Cependant, les résultats obtenus après ce type d'extraction sont quelque peu supérieurs en raison d'un effet de matrice non spécifique. (cf. Page 10).

## REACTIFS FOURNIS ET PREPARATION

Réactifs	Quantité	Code	Reconstitution
<b>Colonnes d'extraction</b> 1 ml phase inverse contenant 100 mg de phénylsilylsilicate	10 pièces	B-AEC	Cf. paragraphe "Extraction" pour la préparation et le conditionnement des col.
<b>Tampon phosphate lyophilisé</b>	1 flacon	B-AR1-PB	Reconstituer avec 100 ml d'eau déionisée
<b>Antisérum</b> Lyophilisé – Ac de lapin anti-vasopressine	1 flacon	B-AR1-AS	Reconstituer avec 10 ml d'eau déionisée
<b>Marqueur radioactif</b> lyophilisé $^{125}\text{I}$ -Vasopressine	1 flacon	B-ADH-TR	Reconstituer avec 11 ml de tampon phosphate
<b>Calibrateur<sup>1)</sup></b> Arginine vasopressine synthétique lyophilisée dans une tampon phosphate.	1 flacon	B-AR1-CA	Reconstituer avec 5 ml d'eau déionisée
<b>Contrôles Normal / Elevé<sup>2)</sup></b> Arginine Vasopressine dans une matrice tampon	2 flacons	B-AR1-CONSET	Reconstituer avec 5 ml de tampon phosphate
<b>Second Anticorps</b> Ac coaté cellulose anti-lapin	1 flacon 11 ml	B-AB2	Prêt à l'emploi

Table 5

<sup>1)</sup> La reconstitution du calibrateur permet d'obtenir une solution stock de 80 pg/ml d'arginine vasopressine.

<sup>2)</sup> Concentrations d'arginine vasopressine (dans une matrice tamponnée) spécifiques à chaque lot. cf. document spécifique pour les concentrations exactes.

Remarque: N'EXTRAIRE NI LES CONTROLES, NI LES CALIBRATEURS.

## STOCKAGE ET PEREMPTION DES REACTIFS

Réactifs non entamés	
Les colonnes d'extraction sont stables à 18-28°C. Les autres composants de la trousse sont stables à 2-8°C. Ne pas dépasser les dates de péremption imprimées sur les étiquettes des flacons. Ne pas congeler le second anticorps.	
Réactifs ouverts/reconstitués	
Colonnes d'extraction	Les colonnes utilisées doivent être stockées à 18-28°C et protégées de la lumière et de la poussière.
Tampon phosphate	Stable durant 2 mois à 2-8°C
Antisérum	Stable durant 2 mois à -20°C
Marqueur radioactif	Conserver à -20°C. Aliquoter en cas d'utilisation répétée
Calibrateur	Stable durant 2 mois à -20°C
Contrôles	Aliquoter en cas d'utilisation répétée
Second anticorps	Conserver à 2-8°C (ne pas congeler)

Table 6

## PRÉCAUTIONS DE SÉCURITÉ

- Matériel radioactif: cette trousse contient des substances radioactives dont la radioactivité n'excède pas 56 kBq d'  $^{125}\text{I}$ .
- La réception, l'acquisition, la possession, l'utilisation et le transfert de substances radioactives ne doivent se faire qu'en respectant la réglementation de chaque pays. Nous conseillons vivement à tous les utilisateurs de s'adresser aux autorités locales afin d'obtenir les directives précises concernant l'utilisation des réactifs contenus dans la trousse et la gestion des déchets radioactifs et biologiques (échantillons analysés).
- Matériel d'origine humaine : Tous les composants de cette trousse, à l'exception du second anticorps (B-AB2) contiennent des composants d'origine humaine. Bien que les tests de détection de l'antigène de surface du VHB et des anticorps des virus VHC et VIH1/2 se soient révélés négatifs, il convient de considérer les réactifs comme capables de transmettre des maladies infectieuses, et de les manipuler conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, en prenant les précautions appropriées.

## PRÉCAUTIONS TECHNIQUES

- Lire attentivement les instructions avant de réaliser le test. Le test ne donnera pas les résultats escomptés en cas de dilution incorrecte ou de modification des réactifs, ou de stockage dans des conditions autres que celles détaillées dans le présent mode d'emploi.
- Les composants ne doivent pas être utilisés au-delà de la date d'expiration imprimée sur les étiquettes.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Laisser les réactifs équilibrer à la température ambiante. Reconstituer les réactifs lyophilisés comme indiqué. Bien mélanger (au vortex) les réactifs avant utilisation.
- Le temps de comptage devrait être suffisant de manière à éviter des erreurs statistiques (ex. au comptage de 2000 cpm correspond une marge d'erreur de 5%; le comptage de 10000 induit une marge d'erreur de 1%).
- Si les résultats obtenus sont supérieurs au calibrateur le plus concentré, il convient de procéder à la dilution de l'échantillon avec le tampon phosphate préalablement à un nouveau dosage.

## MATÉRIEL REQUIS MAIS NON FOURNI

- Pipettes de précision réglables avec pointes jetables pour 100, 400, 500, 1000 et 5000 µl (ou de préférence une multipipette ajustable de 100 à 1000 µl)
- Pipette volumétrique de 10 ml
- Tubes jetables en polystyrène pour la dilution des calibrateurs
- Tubes jetables coniques pour le RIA en polystyrène (*par ex.* tubes Sarstedt; # 57.477)
- Tubes en polypropylène, polystyrène ou en verre pour la préparation des extraits plasmatiques
- Eprouvette graduée pour la préparation du tampon phosphate
- Eau distillée ou déionisée
- Méthanol (ex. Merck # 6009)
- HCl 1 N (acide chlorhydrique) (ex. Merck # 9057).
- Pompe à extraction sous vide pour les colonnes
- Concentrateur sous vide – ou dispositif pour azote exempt de particules
- Centrifugeuse réfrigérée
- Vortex
- Agitateur magnétique et support
- Système d'aspiration

## PRELEVEMENT ET CONSERVATION DES ECHANTILLONS

Le prélèvement correct des échantillons est essentiel pour l'obtention de résultats de dosage pertinents.

Recueillir le sang dans des tubes contenant de l'EDTA ou de l'héparine, centrifuger à 2-8°C et recueillir le plasma. Ne pas utiliser d'échantillons hémolytiques, lipémiques ou fortement ictériques qui risquent d'influencer les résultats. Si le protocole requiert des valeurs basales, il convient de faire jeûner le patient durant 12 heures et de lui demander de rester au repos dans un environnement calme et sans stress durant l'heure qui précède le prélèvement. Il faut recueillir environ 5 ml de sang dans un tube EDTA qui sera immédiatement placé sur de la glace après le prélèvement, puis centrifugé à 2-8°C à 2000 g pendant 15 minutes dans les 10 minutes qui suivent le prélèvement. Le plasma sera séparé des cellules puis congelé immédiatement à -20°C ou utilisé sans attendre pour l'extraction (cf. ci-dessous).

La vasopressine est stable dans l'urine durant au moins 2 mois à -20°C, à condition d'acidifier (immédiatement après le recueil) les échantillons avec 10% (v/v) d'acide chlorhydrique HCl 1 N (6). Après une courte étape de centrifugation, ces échantillons peuvent être transférés immédiatement vers la colonne d'extraction (cf. ci-dessous). La procédure requiert 1 ml de plasma EDTA ou d'urine pour une détermination en double.

## EXTRACTION

Nous recommandons une procédure d'extraction sur colonnes en phase inverse, hautement spécifique pour l'absorption puis l'éluion de l'arginine vasopressine. Alternativement, une extraction avec de l'éthanol peut être employée.

- **Chaque colonne d'extraction fournie dans la trousse peut être utilisée jusqu'à 5 fois** en respectant le protocole d'utilisation. Les colonnes utilisées doivent être stockées à 18-28°C et protégées de la lumière et de la poussière.
- Les méthodes d'extraction sur colonne décrites ci-dessous permettent des **rendements** supérieurs à 90% avec la <sup>125</sup>I-vasopressine ou <sup>3</sup>H-vasopressine ajoutées à des échantillons de plasma humain.
- Lorsque l'on souhaite mesurer des concentrations très faibles d'arginine vasopressine, le volume d'échantillon à extraire peut être augmenté jusqu'à 4 ml sans changement notable dans les rendements d'extraction (cf. performances/ concentrations extractives ci-dessous).
- La procédure d'extraction sur colonne fut testée et validée pour des échantillons de plasma EDTA et d'urine. Si d'autres types d'échantillons (plasma animal, par exemple) doivent être analysés, il convient de valider le rendement d'extraction en ajoutant de la <sup>125</sup>I-vasopressine à l'échantillon à tester. La force ionique élevée, due à la concentration saline de l'urine est susceptible d'interférer avec le RIA. C'est la raison pour laquelle nous recommandons d'extraire sur colonne les échantillons d'urine après acidification avec de l'HCl (6). Cependant, le groupe Panzali *et al.* (8) a analysé directement 17 échantillons d'urine sans extraction préalable, et trouvé des résultats similaires à ceux obtenus après extraction des échantillons.

### Procédure d'extraction avec centrifugation

#### Prétraitement des échantillons

- Identifier un tube en polypropylène, en polystyrène ou en verre pour chaque échantillon à extraire.
- Ajouter 1 ml de l'échantillon plasmatique à tester

- Ajouter 100 µl d' HCl 1 N, vortexer puis centrifuger durant 5 minutes à 2000 x g.

- Utiliser le plasma surnageant acidifié dans l'étape Application de l'échantillon

#### Préparation et conditionnement des colonnes

- Identifier une colonne à extraction pour chaque échantillon à analyser et la placer dans un tube en polypropylène, en polystyrène ou en verre.
- Ajouter 1 ml de méthanol aux colonnes puis centrifuger durant 1 minute à 200 x g. Répéter cette étape.
- Ajouter 1 ml d'eau distillée ou déionisée aux colonnes puis centrifuger durant 1 minute à 200 x g. Répéter cette étape.
- Vider les tubes afin d'éviter que les pointes des colonnes n'entrent en contact avec les éluats.

#### Application des échantillons

- Charger 1 ml d'échantillon acidifié à la colonne correspondante identifiée préalablement puis centrifuger durant 1 minute à 200 x g.

#### Lavage

- Ajouter 1 ml d'eau distillée ou déionisée aux colonnes. Centrifuger pendant 1 minute à 500 x g. Répéter cette étape.

#### Eluion de l'extrait

- Placer chaque colonne d'extraction dans le tube prévu à cet effet.
- Ajouter 1 ml de méthanol contenant 0.5 % (v/v) d' HCl 1 N aux colonnes puis centrifuger pendant 1 minute à 200 x g.
- Utiliser la colonne pour extraire un autre échantillon (jusqu'à 5 utilisations) ou la conserver à 18-28°C en la protégeant de la lumière et de la poussière.

#### Evaporation et reconstitution de l'extrait

- Evaporer la solution de méthanol par séchage au moyen d'un concentrateur sous vide. Alternativement, il est possible d'évaporer le méthanol dans des blocs chauffants ou un bain marie à 37°C sous un flux d'azote exempt de particules.
- Reconstituer les échantillons avec 1 ml de tampon phosphate, vortexer.
- Equilibrer les extraits durant 30 minutes à 2-8°C et vortexer de temps en temps.
- Conserver les échantillons reconstitués fermés et congelés à -20°C s'ils ne sont pas immédiatement analysés.

### Procédure d'extraction utilisant une pompe à vide

Les échantillons migreront au travers de la colonne grâce à la pression négative. Cette procédure est identique à celle décrite dans la méthode par centrifugation.

Les taux de migration suivants devront être respectés:

- Application de l'échantillon et éluion devront s'effectuer à une vitesse de 2 ml/min
- Pour tous les autres liquides, une vitesse de 5 ml/min devra être respectée.

### Extraction des échantillons à l'éthanol

Alternativement, les échantillons peuvent être extraits par précipitation avec de l'éthanol.

- Mélanger 1 ml de chaque échantillon de patient avec 5 ml d'éthanol glace à 98 % (v/v). Vortexer pendant 1 minute.
- Centrifuger pendant 20 minutes à 2-8°C et 1000 x g. Décanter dans de nouveaux tubes propres en polypropylène, polystyrène ou en verre.
- Assécher le surnageant dans le concentrateur sous vide. Alternativement, il est possible d'évaporer le méthanol dans des blocs chauffants ou un bain marie à 37°C sous un flux d'azote exempt de particules ou d'air.
- Reconstituer les échantillons avec 1 ml de tampon phosphate, vortexer et conserver les congelés à -20°C s'ils ne sont pas immédiatement analysés.

Le rendement habituel avec ce type d'extraction est de 65-80%. C'est la raison pour laquelle nous recommandons d'utiliser un contrôle interne (1 ml de plasma EDTA additionné de 50 µl <sup>125</sup>I-Vasopressine). La comparaison avec l'activité totale permettra d'établir le taux de rendement.

## REMARQUES RELATIVES A LA PROCEDURE

### PROCEDURE DE DOSAGE

Afin d'obtenir une courbe d'étalonnage entière, des dilutions en série du calibrateur devront être réalisées.

- Identifier 8 tubes de A à H et pipeter 1.0 ml de tampon phosphate dans les tubes de B à H.
- Pipeter 1.0 ml de calibrateur reconstitué (stock = 80 pg/ml) dans les tubes et B, vortexer.
- Transférer 1.0 ml du tube B au tube C, vortexer.
- Continuer de transférer 1.0 ml de chaque tube jusqu'à ce que la série de dilution soit complète. Les concentrations correspondantes d'arginine vasopressine seront obtenues:  
A 80 pg/ml (73.6 pmol/L)    E 5.0 pg/ml (4.6 pmol/L)  
B 40 pg/ml (36.8 pmol/L)    F 2.5 pg/ml (2.3 pmol/L)  
C 20 pg/ml (18.4 pmol/L)    G 1.25 pg/ml (1.1 pmol/L)  
D 10 pg/ml (9.2 pmol/L)    H 0.63 pg/ml (0.6 pmol/L)

**Remarque: veiller à ce que tous les réactifs utilisés dans les étapes 1 à 4 soient à température ambiante (18-28°C) avant utilisation.**

1. Identifier 11 tubes en polystyrène en double: A à H (calibrateurs), NSB (blanc), MB (liaison maximale) et T (activité totale). Identifier autant d'autres tubes en polystyrène en double qu'il y a d'échantillons et de contrôles à analyser.
- 2a. Pipeter 500 µl de tampon phosphate dans les tubes NSB et 400 µl dans les tubes MB.
- 2b. Pipeter 400 µl de chaque calibrateur de A à H dans les tubes correspondants.
- 2c. Pipeter 400 µl des échantillons de patients (extraits) et des contrôles (en direct) dans les tubes correspondants.
3. Ajouter 100 µl d'antisérum à tous les tubes à l'exception des tubes NSB et T. Vortexer.
4. Incuber durant 24 ± 3 heures à 2-8°C.
5. Ajouter 100 µl de marqueur radioactif à chaque tube. Vortexer. Mettre des bouchons sur les tubes T et les mettre de côté jusqu'à l'étape 12.
6. Incuber à nouveau pendant 24 ± 3 heures à 2-8°C.
- 7a. Retourner plusieurs fois le flacon contenant le second anticorps, y ajouter l'agitateur magnétique. Placer le flacon sur la plaque magnétique.
- 7b. Alors que l'anticorps est toujours sur la plaque magnétique, ajouter 100 µl de la suspension à tous les tubes à l'exception des tubes T. Vortexer.
8. Incuber durant 20 minutes ± 1 minute à 18-28°C.
9. Ajouter 1 ml d'eau déionisée à chaque tube à l'exception des tubes T **en prenant soin de ne pas remettre le précipité en suspension.**
10. Centrifuger pendant 5 minutes à 2-8°C et 1000 x g.
11. Aspirer tous les surnageants à l'exception des tubes T et conserver les précipités.
12. Procéder au comptage de tous les tubes dans le compteur gamma pour 1 minute.

### RESULTATS ET STANDARDISATION

Enregistrer les cpm de tous les tubes (T, NSB, MB, calibrateurs A-H, échantillons et contrôles) et calculer la moyenne de cpm pour tous les doubles.

Soustraire la moyenne des tubes NSB des moyennes des doubles obtenues.

$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{moyenne}} - \text{cpm}_{\text{moyenne NSB}}$$

Calculer la liaison de chaque paire de tubes selon la formule suivante (MB – NSB = 100%):

$$\text{percentbound} = \frac{\text{netcpm}}{\text{netMBcpm}} \times 100$$

Préparer du papier lin/log et reporter les % de liaison sur l'axe horizontal et les concentrations de mélatonine en pg/ml sur l'axe vertical pour chaque calibrateur, échantillon et contrôle. Tracer la courbe d'étalonnage ou la calculer au moyen d'un algorithme de régression (4 paramètres). Déterminer les concentrations de vasopressine pour chaque patient et chaque contrôle à partir de la courbe d'étalonnage. D'autres méthodes de traitement des données peuvent également être employées.

Pour obtenir les concentrations en pmol/l, il convient de multiplier les résultats en pg/ml par le facteur 0.92.

Cf. Table 11 et Figure 1 pour des exemples de courbes d'étalonnage. Ces éléments ne sont donnés qu'à titre d'exemple. Il convient d'effectuer une courbe d'étalonnage lors de chaque dosage.

**Standardisation:** le calibrateur arginine vasopressine BÜHLMANN est calibré par rapport à la préparation de référence WHO 77/501.

### CONTROLE QUALITE

Une lecture exhaustive de ce manuel est recommandée pour l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

La justesse de chaque calibrateur en cours est vérifiée tous les 3 mois en le comparant à la préparation de référence WHO 77/501.

La reproductibilité des paramètres de la courbe d'étalonnage ainsi que des valeurs des contrôles devrait être comprise dans le domaine des valeurs attendues établies par chaque laboratoire.

Tous les contrôles doivent avoir une valeur comprise entre les limites de confiance établies. Les limites de confiance des contrôles sont spécifiques à chaque lot et sont indiquées sur la feuille de contrôle contenue dans chaque trousse.

Si la précision des mesures ne correspond pas aux limites établies et que les répétitions excluent toute erreur technique, il est recommandé de contrôler les paramètres suivants: i) pipetage, appareils de mesure de température et de temps, ii) date de péremption des réactifs, iii) conditions de stockage et d'incubation, iv) pureté de l'eau.

Une compréhension approfondie de ce manuel est nécessaire à l'utilisation correcte de ce produit. Des résultats fiables ne seront obtenus que par un travail en laboratoire précis (bonnes pratiques de laboratoire usuelles) et en suivant fidèlement les recommandations de cette brochure.

### LIMITATIONS DE PERFORMANCE

- L'utilisation de plasma EDTA est indispensable afin d'inhiber des activités de metalloprotease.
- L'utilisation de tubes coniques est également recommandée. A l'étape 10 de la procédure, un sédiment plus compact sera obtenu et l'aspiration consécutive du surnageant en sera facilitée.
- Les résultats du test doivent être interprétés en tenant compte des informations résultant de l'examen clinique du patient et d'autres procédures diagnostiques.
- Les prélèvements incorrects peuvent être le motif de résultats erronés (cf. prélèvement des échantillons). La congélation immédiate des échantillons plasmatiques ou leur extraction sans délai permet de retrouver avec exactitude la concentration de vasopressine au moment du prélèvement.

- Vasopressine est extrêmement instable. Enfin il faut transport les échantillons congelés à -20 °C.

---

### CARACTERISTIQUES DE PERFORMANCE

Les caractéristiques de performances de l'essai ont été validées sur des échantillons testés en double.

**Précision Intra-Assay (Within-Run) : 7.6%.** Elle a été calculée à partir des résultats de 20 paires de valeurs de 3 échantillons de plasma après extraction et addition de différentes concentrations de vasopressine au cours d'un même essai. Les résultats obtenus se trouvent en Table 12.

**Précision Inter-Assay (Run-to-Run) : 10.0%.** Elle a été calculée à partir des résultats de 20 paires de valeurs de 2 échantillons plasmatiques après extraction et de 2 échantillons plasmatiques sans extraction au cours de 20 essais consécutifs. Les résultats obtenus se trouvent en Table 13.

**Limite de blanc (LoB) : 0.39 pg/ml (0.36 pmol/l).** 20 doubles du calibre zéro (tampon phosphate) furent analysés au cours d'un même essai. La sensibilité analytique de la vasopressine a été calculée en enlevant 2 déviations standard de la moyenne des cpm de la liaison maximale et en reportant la valeur obtenue sur la courbe standard.

**Limite de quantification (LoQ) : 1.9 pg/ml (1.75 pmol/l).** 5 échantillons différents présentant des valeurs comprises entre 1.3 et 4.1 pg/ml furent analysés 10 fois chacun au cours d'un même essai. Le coefficient de variation (CV) et la moyenne furent calculées pour chaque échantillon. La dose fonctionnelle la plus faible (functional least detectable dose - FLDD) est observée à 10% de CV.

**Linéarité des dilutions/parallélisme : 95.9%.** La dilution d'un échantillon de plasma humain a été effectuée avec du tampon phosphate avant l'extraction puis analysé d'après le protocole standard. Les résultats obtenus se trouvent en Table 14.

**Test de récupération : 93.4%.** Trois échantillons de plasma furent additionnés de quantités croissantes d' arginine vasopressine après extraction sur colonne puis analyses d'après le protocole standard. Les résultats obtenus se trouvent en Table 15.

**Concentration extractive : 96.7%.** Des volumes croissants de plasma humain contenant de faibles quantités d'arginine vasopressine furent appliqués sur les colonnes d'extraction conformément au protocole standard (cf. pages 3ff.). Chaque extrait obtenu fut reconstitué avec **1 ml de tampon phosphate** puis analysé d'après le protocole standard. Les résultats obtenus se trouvent en Table 16 et sont exprimés en pg/ml d'arginine vasopressine.

**Spécificité :** Les réactions croisées de l'antisérum de vasopressine furent définies à 50% de liaison et sont présentées en Table 17.

**Comparaison de méthodes :** La méthode Vasopressine RIA a été comparée à la méthode VASOPRESSINE directe RIA (RK-VPD, sans extraction sur colonne). Les résultats obtenus avec 28 échantillons de donneurs sains (plasma EDTA) mettent à jour une excellente corrélation (cf. Figure 2).

---

### DOMAINES DE REFERENCE

Lors d'une évaluation au moyen de 53 échantillons de plasma EDTA de donneurs apparemment sains, nous avons établi le domaine de référence suivante (95 percentile): 3.6 pg/ml (cf. Table 18).

Ce domaine de référence n'est donné qu'à titre indicatif. Il est conseillé à chaque laboratoire d'établir ses propres valeurs normales correspondant à sa population spécifique de patients.

Il est important de souligner que les conditions de prélèvement des échantillons de donneurs sains ne sont pas

connues (jeûne et position) et pourraient être légèrement élevées de ce fait.

Pour cette raison, les valeurs basales prélevées dans des conditions conformes au protocole sont susceptibles d'être plus basses, voire en dessous de la limite de détection. De nombreuses procédures mesurent la dynamique d'une stimulation ou d'une suppression de la sécrétion de vasopressine.

La validité clinique de la trousse de l'essai Bühlmann Vasopressine-RIA (RK-AR1) fut démontrée au cours de nombreuses études cliniques et de publications de recherche. (5-7).

## ITALIANO

## USO

Questo radioimmunosaggio a doppio anticorpo è concepito per la determinazione quantitativa diagnostica *in vitro* della **vasopressina arginina** immunoreattiva (ormone anti-diuretico) nel plasma EDTA e nell'urina dopo estrazione (1-3).

## PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

La vasopressina arginina immunoreattiva viene misurata da un radioimmunosaggio a doppio anticorpo che utilizza una modifica del metodo di Glick e Kagan (4). I campioni di plasma ed i calibratori estratti mediante colonna (o etanolo) vengono pre-incubati per 24 ore con l'anticorpo (Ac) anti-vasopressina, la vasopressina marcata con  $I^{125}$  compete quindi con la vasopressina presente nei campioni e nei calibratori per gli stessi siti anticorpali leganti. Dopo una seconda incubazione di 24 ore, il secondo anticorpo in fase solida viene aggiunto alla miscela, la frazione legata all'anticorpo viene infine precipitata e contata.

La procedura consiglia un'estrazione della fase solida dei campioni di plasma con colonne in fase inversa (fenilsililica). In alternativa, si può utilizzare un'estrazione dei campioni di plasma con etanolo. Tuttavia, i valori utilizzando la procedura con etanolo sono a volte più elevati a causa dell'effetto matrice non specifico. (vedi pagina 14).

## REAGENTI FORNITI E LORO PREPARAZIONE

Reagenti	Quantità	Codice	Ricostituzione
<b>Colonna per estrazione</b> 1 ml di colonne in fase inversa contenenti 100 mg di fenilsililica	10 pezzi	B-AEC	Per la preparazione della colonna e per il condizionamento vedi capitolo "Estrazione"
<b>Tampone fosfato</b> Tampone liofilo	1 flacone	B-AR1-PB	Ricostituire con 100 ml di acqua deionizzata
<b>Antisiero</b> Ac liofilo di coniglio anti-vasopressina	1 flacone	B-AR1-AS	Ricostituire con 10 ml di acqua deionizzata
<b>Tracciante</b> Vasopressina liofila marcata con $I^{125}$	1 flacone	B-ADH-TR	Ricostituire con 11 ml di tampone fosfato
<b>Calibratore</b> <sup>1)</sup> Vasopressina arginina liofila sintetica in un tampone fosfato	1 flacone	B-AR1-CA	Ricostituire con 5 ml di acqua deionizzata
<b>Controlli normale / elevato</b> <sup>2)</sup> Vasopressina arginina in una matrice tampone	2 flaconi	B-AR1-CONSET	Ricostituire con 5 ml di tampone fosfato
<b>Secondo anticorpo</b> Ac anti-coniglio coattato con cellulosa	1 flacone 11 ml	B-AB2	Pronto all'uso

Table 7

<sup>1)</sup> La ricostituzione del calibratore produce una soluzione stock di 80 pg/ml di vasopressina arginina.

<sup>2)</sup> Quantitativi lotto specifici di vasopressina arginina in una matrice tampone. Fare riferimento ai dati contenuti nel foglio del QC per le concentrazioni esatte.

**Nota:** NON ESTRARRE NE' I CALBRATORI NE' I CONTROLLI.

## CONSERVAZIONE ED EMIVITA DEI REAGENTI

Reagenti non aperti	
Le colonne di estrazione sono stabili a 18-28°C. Gli altri componenti del kit sono stabili a 2-8°C. Non utilizzare oltre la data di scadenza stampata sulle etichette. Non congelare il secondo anticorpo.	
Reagenti aperti/ ricostituiti	
Colonne per estrazione	Le colonne utilizzate dovrebbero essere conservate a 18-28°C e protette dalla luce e dalla polvere.
Tampone fosfato	Stabile per 2 mesi a 2-8°C.
Antisiero	Stabile per 2 mesi a -20°C.
Tracciante	Conservare a -20°C. Aliquotare se viene utilizzato nel tempo.
Calibratore	Stabile per 2 mesi a -20°C.
Controlli	Aliquotare se vengono utilizzati nel tempo.
Secondo anticorpo	Conservare a 2-8°C (non congelare).

## PRECAUZIONI

## PRECAUZIONI DI SICUREZZA

- **Materiale Radioattivo:** Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera i 56 kBq di Iodio<sup>125</sup>.
- Il ricevimento, acquisizione, possesso, utilizzo e trasferimento sono soggetti alle regolamentazioni locali. In merito alle precauzioni per la manipolazione e l'eliminazione dei reagenti, del materiale radioattivo e dei campioni, consigliamo vivamente di consultare le regolamentazioni specifiche del vostro paese.
- **Reagenti Contengono Materiale di Origine Umana:** Tutti i reagenti oltre al secondo anticorpo (B-AB2) contengono componenti di origine umana. Benché testati e risultati negativi all'antigene di superficie HBV e agli anticorpi HCV e HIV1/2, i reagenti devono essere maneggiati come potenzialmente infettivi e secondo le buone pratiche di laboratorio utilizzando le dovute precauzioni.

## PRECAUZIONI TECNICHE

- Leggere attentamente le istruzioni prima di eseguire il test. Le prestazioni del test subiranno un effetto negativo se si utilizzano reagenti diluiti in modo errato, modificati o conservati diversamente da come specificato nelle presenti istruzioni per l'uso.
- I componenti non devono essere utilizzati dopo la data di scadenza riportata sulle etichette.
- Non miscelare reagenti appartenenti a lotti diversi.
- Lasciare che i reagenti raggiungano la temperatura ambiente. Ricostituire i reagenti liofilizzati secondo le indicazioni. Miscelare bene (agitare in modo vorticoso) i reagenti prima dell'uso.
- Se l'iniziale concentrazione di un campione non noto è superiore al calibratore più elevato, il campione deve essere ulteriormente diluito con tampone fosfato e dosato secondo quanto previsto dal dosaggio.
- Il tempo per la conta deve essere sufficiente ad evitare errori statistici e.g. l'accumulo di 2000 cpm produrrà un errore del 5%, 10000 cpm produrranno un errore dell'1%.

## MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

- Pipette di precisione con puntali monouso per 100 µl, 400 µl, 500 µl, 1000 µl, e 5000 µl (o preferibilmente una multipipetta regolabile da 100 - 1000 µl).
- Pipetta volumetrica da 10 ml.
- Provette monouso di polistirene per la preparazione della diluizione dei calibratori.
- Provette monouso coniche di polistirene per l'esecuzione del dosaggio (e.g. Sarstedt # 57.477).
- Provette monouso di polipropilene, polistirene o vetro per la preparazione degli estratti plasmatici.
- Cilindro per la preparazione del tampone fosfato.
- Acqua deionizzata o distillata.
- Metanolo p.a. (e.g. Merck # 6009).
- 1 N HCl (acido cloridrico) (e.g. Merck # 9057).
- Dispositivo per l'estrazione a vuoto per l'applicazione delle colonne di estrazione (opzionale).
- Concentratore a vuoto o fornitura di particelle prive di nitrogeno.
- Centrifuga refrigerata.
- Vortex.
- Barra per agitazione ed agitatore magnetico
- Dispositivo per aspirazione.
- Gamma counter.

## PRELIEVO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

E' essenziale effettuare il prelievo in maniera idonea per assicurare risultati di vasopressina accurati.

Campioni emolizzati, molto itterici o lipemici possono intaccare i risultati. Se la procedura richiede livelli basali, il paziente deve essere a digiuno per almeno 12 ore e deve essere tranquillo, senza stress ed in un ambiente sereno, per almeno 1 ora prima del prelievo

Prelevare almeno 5 ml di sangue nella **provetta con EDTA** e collocare immediatamente il campione nel ghiaccio. Centrifugare a 2-8°C a 2000 g per 15 minuti entro 10 minuti dal prelievo, separare il plasma dalle cellule e congelare il campione immediatamente in una provetta di plastica a -20°C se non utilizzato immediatamente o procedere alle procedure di estrazione (vedi di seguito).

La vasopressina nell'urina rimane stabile per almeno 2 mesi a -20°C se tali campioni sono stati acidificati con 10% (v/v) di 1 N HCl (acido cloridrico) immediatamente dopo il prelievo (6). Dopo una breve centrifugazione, questi campioni possono essere aggiunti direttamente alle colonne di estrazione condizionate (vedi di seguito). La procedura richiede 1 ml di plasma EDTA o urina per le determinazioni in duplicato.

## ESTRAZIONE

Consigliamo una procedura di estrazione che utilizza un'estrazione con colonna in fase inversa che è altamente specifica per l'assorbimento e la successiva eluizione dell'arginina vasopressina. In alternativa, può essere utilizzato un metodo di estrazione con etanolo.

- Le colonne per l'estrazione fornite con questo kit possono essere **utilizzate fino a cinque volte** se usate secondo le procedure di estrazione descritte in questo protocollo. Le colonne usate devono essere conservate a 18-28°C e protette dalla luce e dalla polvere.
- I metodi di estrazione con colonna descritti di seguito producono **recuperi** superiori a 90% rispettivamente con vasopressina marcata con I<sup>125</sup> o vasopressina marcata con H<sup>3</sup>, diluita in campioni di plasma umano EDTA.
- Se i campioni da dosare contengono concentrazioni molto basse di arginina vasopressina il volume del campione può essere aumentato fino a 4 ml senza cambiamenti di rilievo nei recuperi estrattivi (vedi Concentrazione Estrattiva nelle prestazioni del dosaggio di seguito riportata).
- Le procedure di estrazione con colonna sono state **testate e validate per campioni di plasma umano EDTA e per campioni di urina**. Se altri campioni, quali il plasma animale, vengono utilizzati, si consiglia di validare il recupero dell'estrazione utilizzando una diluizione della vasopressina marcata con I<sup>125</sup> nel campione. La grande forza ionica **nell'urina** dovuta all'elevata concentrazione di sali potrebbe interferire con il radioimmunosaggio della vasopressina. Quindi, si consiglia l'utilizzo della colonna di estrazione dei campioni di urina dopo acidificazione con HCl (6). Tuttavia, Panzali et al. (8) hanno dosato 17 campioni di urina senza colonna di estrazione e hanno trovato i risultati prossimi a quelli ottenuti con i campioni estratti.

### Procedura di Estrazione utilizzando Centrifugazione

#### Pretrattamento del Campione

- Contrassegnare una provetta di polipropilene, di polistirene o di vetro per ciascun campione da estrarre.
- Aggiungere 1 ml di campione di plasma corrispondente.
- Aggiungere 100 µl di 1 N HCl, vortexare e centrifugare per 5 minuti a 2000 x g.
- Utilizzare supernatante da plasma acidificato al punto applicazione del campione

#### Preparazione e Condizionamento della Colonna

- Contrassegnare una colonna di estrazione per ciascun campione da estrarre e collocarla in provette per la centrifugazione di polipropilene, polistirene o vetro.
- Aggiungere 1 ml di metanolo alle colonne e centrifugare per 1 minuto a 200 x g. Ripetere questo passaggio una volta.
- Aggiungere 1 ml di acqua distillata o deionizzata alle colonne, centrifugare per 1 minuto a 200 x g. Ripetere questo punto una volta.
- Svuotare le provette per evitare che i puntali delle colonne di estrazione entrino in contatto con gli eluati.

#### Applicazione del Campione

- Caricare 1 ml di campione acidificato nella colonna contrassegnata in maniera corrispondente e centrifugare per 1 minuto a 200 x g.

#### Lavaggio

- Aggiungere 1 ml di acqua distillata o deionizzata alle colonne, centrifugare per 1 minuto a 500 x g. Ripetere questo punto una volta.

#### Eluizione dell'Estratto

- Collocare ciascuna colonna di estrazione in una provetta pulita di polipropilene, polistirene o vetro contrassegnata in maniera corrispondente.
- Aggiungere 1 ml di metanolo contenente 0.5 % (v/v) di una soluzione di 1 N HCl alle colonne e centrifugare per 1 minuto a 200 x g.
- Utilizzare la colonna per estrarre il campione successivo (fino a 5 volte) o conservare la colonna a 18-28°C protetta dalla luce e dalla polvere.

#### Evaporazione e Ricostituzione dell'Estratto

- Evaporare completamente la soluzione di metanolo utilizzando un concentratore a vuoto con una trappola a freddo. In alternativa, utilizzare un blocco riscaldato a 37°C o un bagnetto ad acqua ed evaporare completamente il metanolo con un flusso di particelle prive di nitrogeno.
- Ricostituire i campioni con 1 ml di tampone fosfato, vortexare.
- Equilibrare gli estratti per 30 minuti a 2-8°C e vortexarli di tanto in tanto. Conservare gli estratti ricostituiti sigillati e congelati a -20°C se non dosati immediatamente.

### Procedura di Estrazione Utilizzando un Dispositivo a Vuoto

Con l'aiuto della pressione negativa i fluidi verranno passati attraverso la colonna. La procedura è la stessa di quella descritta nella procedura di estrazione utilizzando una centrifuga. Devono essere utilizzati i seguenti flussi:

- L'Applicazione del campione e l'eluizione devono essere effettuate con un flusso di 2 ml/min.
- Tutti gli altri fluidi possono passare nella colonna con un flusso di 5 ml/min.

### Estrazione dei Campioni con Etanolo

In alternativa, i campioni possono essere estratti utilizzando "la precipitazione dell'etanolo".

- Mescolare 1 ml di ciascun campione con 5 ml di etanolo freddo al 98% (v/v). Vortexare per 1 minuto.
- Centrifugare per 20 minuti a 2-8°C e 1000 x g. Decantare in un'altra provetta di polipropilene, di polistirene e di vetro.
- Asciugare il supernatante in un concentratore a vuoto. In alternativa, utilizzare un blocco riscaldato a 37°C o un bagnetto ad acqua ed evaporare completamente l'etanolo con un flusso di particelle compresse prive di nitrogeno o d'aria.
- Ricostituire i campioni con 1 ml di tampone fosfato, vortexarli e conservarli congelati a -20°C se non dosati immediatamente.

Con l'estrazione dell'etanolo, i campioni presentano recuperi normali di 65-80%. Quindi, consigliamo di utilizzare come

controllo interno del recupero 1 ml di plasma EDTA diluito con 50 µl di vasopressina marcata con I<sup>125</sup>. Comparata all'attività totale questo fattore può essere utilizzato per calcolare il tasso di recupero.

### PROCEDURA DEL DOSAGGIO

**Nota: Fare in modo che tutti i reagenti dal punto 1 al 4 raggiungano temperatura ambiente (18-28°C) prima dell'utilizzo.**

Per ottenere un'intera curva standard, vengono preparate le diluizioni seriali de

I calibratore come segue:

- Etichettare otto provette dalla A alla H e dispensare 1.0 ml di tampone fosfato nelle provette dalla B alla H.
- Dispensare 1.0 ml di soluzione stock dei calibratori ricostituita (80 pg/ml) nelle provette dalla A alla B, vortexare.
- Trasferire 1.0 ml dalla provetta B alla provetta C, vortexare.
- Continuare a trasferire 1.0 ml da ciascuna provetta finché la serie di diluizioni non sia completa. Le concentrazioni corrispondenti della vasopressina arginina saranno di:  
A 80 pg/ml (73.6 pmol/L)      E 5.0 pg/ml (4.6 pmol/L)  
B 40 pg/ml (36.8 pmol/L)      F 2.5 pg/ml (2.3 pmol/L)  
C 20 pg/ml (18.4 pmol/L)      G 1.25 pg/ml (1.1 pmol/L)  
D 10 pg/ml ( 9.2 pmol/L)      H 0.63 pg/ml (0.6 pmol/L)

1. Etichettare 11 provette di polistirene in duplicato: dalla A alla H (calibratori), NSB (bianco), MB (legame massimo) e T (attività totale). Etichettare altre provette di polistirene in duplicato per i campioni ed i controlli.
- 2a. Dispensare 500 µl di tampone fosfato nelle provette NSB e 400 µl nelle provette MB.
- 2b. Dispensare 400 µl di ciascuno dei calibratori dalla A alla H nelle provette corrispondenti.
- 2c. Dispensare 400 µl dei controlli e dei campioni estratti (senza estrazione) in ciascuna delle provette corrispondenti.
3. Aggiungere 100 µl di antisiero vasopressina a tutte le provette eccetto le provette NSB e T. Vortexare.
4. Incubare per 24 ore ± 3 ore a 2-8°C.
5. Aggiungere 100 µl di tracciante vasopressina a tutte le provette. Vortexare. Tappare e rimuovere le provette T, non richiederanno ulteriore processazione fino alla conta al punto 12.
6. Incubare per 24 ore ± 3 ore a 2-8°C.
- 7a. Capovolgere diverse volte i flaconi contenenti il secondo anticorpo in fase solida, aggiungere una barra per l'agitazione, collocare il flacone su un agitatore magnetico.
- 7b. In agitazione costante, aggiungere 100 µl della sospensione ad ogni provetta (eccetto le provette T). Vortexare.
8. Incubare per 20 minuti ± 1 minuto a 18-28°C.
9. Aggiungere 1 ml di acqua deionizzata ad ogni provetta (eccetto le provette T) **senza risospendere i precipitati**.
10. Centrifugare per 5 minuti a 2-8°C e 1000 x g.
11. Aspirare tutti i supernatanti (**eccetto le provette T**) e tenere i precipitati per la conta.
12. Contare tutte le provette per 1 minuto in un gamma counter.

### RISULTATI E STANDARDIZZAZIONE

Annotare i cpm per tutte le provette (T, NSB, MB, calibratori dalla A-H, campioni e controlli) e calcolare i cpm medi per ciascuna coppia di provette. Sottrarre il bianco medio (provette NSB) per la media rispettiva di ciascuna coppia di provette:

$$\text{Net cpm} = \text{cpm}_{\text{Average}} - \text{cpm}_{\text{Average NSB}}$$

Calcolare il legame di ciascuna coppia di provette come percentuale del legame massimo (provette MB), con i cpm corretti con NSB delle provette MB prese al 100%.

$$\text{percentbound} = \frac{\text{netcpm}}{\text{netMBcpm}} \times 100$$

Preparare un grafico lin/log e tracciare la percentuale di legato sull'asse verticale vs. la concentrazione di vasopressina (pg/mL) sull'asse orizzontale per ciascuno dei calibratori. Tracciare la curva migliore o calcolare la curva standard per i campioni ed i controlli da questa curva standard. Metodi alternativi per il calcolo dei dati risultano ugualmente accettabili.

Per ottenere le concentrazione pmol/l dei risultati, moltiplicare i valori pg/ml attraverso un fattore di 0.92.

**Standardizzazione:** Il calibratore vasopressina arginina BÜHLMANN è pesato in materiale che è stato calibrato verso la preparazione di riferimento del WHO 77/501.

Vedi Table 11 e Figure 1 per esempi dei risultati e delle curve standard. *Questi risultati e le curve standard sono a solo scopo dimostrativo. Occorre generare una curva standard per ogni set di campioni da dosare.*

**Standardizzazione:** Il calibratore vasopressina arginina BÜHLMANN è pesato in materiale che è stato calibrato verso la preparazione di riferimento del WHO 77/501.

### CONTROLLO DI QUALITA'

Occorre attenersi scrupolosamente a quanto descritto in questa metodica per poter utilizzare al meglio il prodotto. Risultati affidabili potranno essere ottenuti solo utilizzando tecniche di laboratorio precise (attuali linee guida GLP) e seguendo accuratamente le istruzioni per l'utilizzo.

L'accuratezza di ciascun lotto di calibratori è controllata ogni tre mesi comparandola con la preparazione di riferimento del WHO 77/501.

La riproducibilità dei parametri della curva standard ed i valori dei controlli devono essere entro limiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. I limiti di confidenza per i controlli sono lotto specifici e stampati sul foglio di QC aggiunto al kit.

Se la precisione del dosaggio non correla con i limiti stabiliti e la ripetizione esclude gli errori nella tecnica, verificare quanto segue: i) dispensazione, dispositivi per il controllo della temperatura e del tempo ii) date di scadenza dei reagenti iii) conservazione e condizioni di incubazione iv) purezza dell'acqua.

### LIMITI DELLE PRESTAZIONI

- E' obbligatorio **usare SOLO plasma EDTA** per inibire l'attività della metalloproteasi. Il plasma eparinizzato non può essere utilizzato nel dosaggio della Vasopressina diretta e interferirà con l'anticorpo legante.
- Si consiglia l'utilizzo di **provette di polistirene coniche**. Durante il passaggio 10 del dosaggio, verrà ottenuto un pellet più solido e la successiva aspirazione del supernatante può essere effettuata in maniera più agevole. I valori di vasopressina devono essere utilizzati come dati supplementari disponibili per il medico nella formulazione della diagnosi.
- I campioni che non vengono prelevati e trattati in maniera idonea possono produrre risultati inaccurati di arginina vasopressina (vedi prelievo dei campioni). Il congelamento dei campioni di plasma o la loro immediata estrazione preserverà l'integrità della concentrazione di vasopressina al momento del prelievo.
- I risultati del test vanno interpretati insieme alle informazioni derivanti dagli studi epidemiologici, dalla valutazione clinica del paziente e da altre procedure diagnostiche.

- Vasopressina e estremamente instabile. Quindi è essenziale di trasportare i campioni congelati a -20 °C.

La validità clinica del dosaggio Bühlmann Vasopressina-RIA (RK-AR1) è stata dimostrata in molte pubblicazioni cliniche ed a scopo di ricerca (5-7).

---

### CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Le caratteristiche di prestazione del dosaggio sono state convalidate in duplicato.

#### **Precisione intra-dosaggio (all'interno della seduta) 7.6%.**

La precisione intra-dosaggio è stata calcolata dai risultati di 20 coppie di valori da 3 campioni di plasma estratti con colonna diluiti con diversi quantitativi di arginina vasopressina in un'unica seduta. I valori sono presentati in Table 12.

#### **Precisione inter-dosaggio (da una seduta all'altra): 10.0%.**

La precisione inter-dosaggio è stata determinata dai risultati di 20 coppie di valori da 2 campioni di plasma estratti con colonna e da 2 non estratti dosati in 20 sedute consecutive. I valori sono presentati in Table 13.

**Limite del Bianco (LoB): 0.39 pg/ml (0.36 pmol/l).** Venti duplicati del calibratore zero (tampone fosfato) sono stati dosati in un'unica seduta. La sensibilità analitica della vasopressina è stata calcolata sottraendo due deviazioni standard dai cpm medi del legame massimo ed intersecando questo valore con la curva standard ottenuta nella stessa seduta.

#### **Limite di Quantificazione (LoQ): 1.9 pg/ml (1.75 pmol/l).**

Cinque campioni diversi di siero con valori tra 1.3 e 4.1 pg/ml sono stati testati ciascuno 10 volte in duplicati come in un intra-dosaggio. I CV ed i valori medi sono stati calcolati per ciascun campione. La dose funzionale minima rilevabile (FLDD) è stata osservata al 10% del CV.

**Linearità di diluizione/parallelismo: 95.9%.** Un campione di plasma umano è stato diluito serialmente con un tampone fosfato prima e dopo estrazione con colonna e successivamente dosato secondo la procedura del dosaggio. I valori sono presentati in Table 14.

**Recupero: 93.4%.** Tre campioni di plasma sono stati diluiti con quantitativi crescenti di arginina vasopressina estratti con colonna ed analizzati secondo la procedura del dosaggio. I valori sono descritti in Table 15.

**Concentrazione Estrattiva: 96.7%.** Volumi crescenti di campioni di plasma umano contenenti una concentrazione bassa di arginina vasopressina sono stati inseriti nelle colonne di estrazione e estratti secondo il protocollo (vedi pagine 2ff). Ciascuno degli estratti risultanti è stato ricostituito in 1 ml di tampone fosfato e successivamente dosato secondo procedura. I valori sono descritti in Table 16 come pg/ml di arginina vasopressina.

**Specificità:** Le crossreazioni dell'antisiero vasopressina sono state determinate al 50% del legame e sono descritte in Table 17.

**Comparazione di Metodi:** Il dosaggio Vasopressina RIA è stato comparato con il dosaggio Vasopressina diretta RIA (RK-VPD, senza estrazione con la colonna). I risultati ottenuti con 28 donatori (plasma EDTA) presentano un'eccellente correlazione (vedi Figure 2).

---

### INTERVALLO DI REFERENZIA

In una valutazione che ha incluso campioni di plasma EDTA da 53 donatori diversi in buono stato di salute, abbiamo stabilito il range atteso e (95° percentile) di: 3.6 pg/ml (vedi Table 18).

Il range normale deve essere utilizzato solo come linea guida. Si consiglia ad ogni laboratorio di stabilire il proprio range atteso per la propria popolazione di pazienti.

I valori per i donatori possono essere leggermente elevati a causa di digiuno non noto e posizioni non note prima della donazione. La maggior parte delle procedure necessitano di test dinamici attraverso stimolazione o soppressione del rilascio di vasopressina.



**USO PREVISTO**

Este radioinmunoanálisis de doble anticuerpo ha sido diseñado para la determinación diagnóstica cuantitativa *in vitro* de **vasopresina arginina** inmunorreactiva (hormona antidiurética, ADH) en plasma con EDTA y orina después de la extracción (1-3).

**PRINCIPIOS BÁSICOS DEL ENSAYO**

La vasopresina arginina inmunorreactiva se mide con un radioinmunoanálisis de doble anticuerpo utilizando una modificación del método de Glick y Kagan (4). Las muestras de plasma extraídas con columna (o etanol) y los calibradores se preincuban durante 24 horas con el anticuerpo (Ac) anti-vasopresina. La <sup>125</sup>I-vasopresina compete entonces con la vasopresina presente en las muestras y en los calibradores por los mismos sitios de unión del anticuerpo. Después de una segunda incubación de 24 horas se añade el segundo anticuerpo de fase sólida a la mezcla, la fracción unida al anticuerpo finalmente precipita y se cuenta.

Para este procedimiento se recomienda una extracción de fase sólida de las muestras de plasma con columnas de fase inversa (fenilsililicio). Otra opción sería utilizar una extracción de muestras de plasma con etanol. Sin embargo, los valores obtenidos utilizando el procedimiento de etanol son algo superiores debido a efectos inespecíficos de la matriz (véase la página 18).

**REACTIVOS INCLUIDOS Y PREPARACIÓN**

Reactivos	Cantidad	Código	Reconstitución
<b>Columna de extracción<sup>1)</sup></b> Columnas de fase inversa de 1 ml con 100 mg de fenilsililicio	10 unidades	B-AEC	Para la preparación y el acondicionamiento de la columna véase el capítulo "Extracción".
<b>Tampón fosfato</b> Tampón liofilizado	1 vial	B-AR1-PB	Reconstituir con 100 ml de agua desionizada
<b>Antisuero</b> Ac anti-vasopresina de conejo liofilizado	1 vial	B-AR1-AS	Reconstituir con 10 ml de agua desionizada
<b>Trazador</b> <sup>125</sup> I-Vasopresina liofilizada	1 vial	B-ADH-TR	Reconstituir con 11 ml de tampón fosfato
<b>Calibrador<sup>1)</sup></b> Vasopresina arginina sintética liofilizada en tampón fosfato	1 vial	B-AR1-CA	Reconstituir con 5 ml de agua desionizada
<b>Controles normal / alto<sup>2)</sup></b> Vasopresina arginina en una matriz de tampón	2 viales	B-AR1-CONSET	Reconstituir con 5 ml de tampón fosfato
<b>Segundo anticuerpo</b> Anticuerpo anti-conejo recubierto con celulosa	1 vial 11 ml	B-AB2	Listo para usar

Tabla 9

<sup>1)</sup> La reconstitución del calibrador da como resultado una solución de stock de 80 pg/ml de vasopresina arginina.

<sup>2)</sup> Cantidades de vasopresina arginina en la matriz de tampón específicas del lote. Consulte las hojas de datos de control de calidad adicionales para las concentraciones exactas.

**Nota:** NO EXTRAIGA NI LOS CONTROLES NI LOS CALIBRADORES.

**ALMACENAMIENTO Y DURACIÓN DE LOS REACTIVOS**

Reactivos sin abrir	
Las columnas de extracción son estables a 18-28°C. Los otros componentes del kit son estables a 2-8°C. No utilice el kit pasada la fecha de caducidad indicada en las etiquetas. No congele el segundo anticuerpo.	
Reactivos abiertos / reconstituidos	
Columnas de extracción	Las columnas usadas deben almacenarse a 18-28°C protegidas de la luz y del polvo.
Tampón fosfato	Estables durante 2 meses a 2-8°C
Antisuero	Estable durante 2 meses a -20°C.
Trazador	Almacénese a -20°C. Hacer partes alícuotas si se espera un uso repetido
Calibrador	Estable durante 2 meses a -20°C.
Controles	Hacer partes alícuotas si se espera un uso repetido
Segundo anticuerpo	Almacénese a 2-8°C (no lo congele)

Tabla 10

**PRECAUCIONES DE SEGURIDAD**

- Material radiactivo: Este kit contiene material radiactivo que no supera 56 kBq (1.5 µCi) de yodo 125.
- La recepción, adquisición, posesión, el uso y la cesión están sujetos a las normativas locales. Respecto a las precauciones adecuadas para la manipulación y eliminación de los reactivos del kit, material radiactivo, desechos radiactivos y especímenes de los pacientes, recomendamos encarecidamente que consulte primero las normativas locales especiales de su país.
- Reactivos que contienen material de origen humano: Todos los reactivos del kit excepto el segundo anticuerpo (B-AB2) contienen componentes de origen humano. Aunque se ha comprobado y encontrado negativo para el antígeno de superficie de HBV y anticuerpos HCV y VIH1/2, los reactivos deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones y deben manejarse de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio, tomando las precauciones adecuadas.

**PRECAUCIONES TÉCNICAS**

- Lea atentamente las instrucciones antes de realizar el ensayo. El rendimiento del ensayo se verá gravemente afectado si los reactivos son incorrectamente diluidos, modificados o almacenados en condiciones distintas a las que se detallan en estas instrucciones de uso.
- Los componentes no deben utilizarse después de la fecha de caducidad impresa en las etiquetas.
- No mezcle diferentes lotes de reactivos.
- Deje atemperar los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente. Reconstituir los reactivos liofilizados según las instrucciones. Mezcle bien (con agitador de vórtice) los reactivos antes de su uso.
- Si la lectura de la concentración inicial de una muestra desconocida es mayor que la del calibrador más alto, la muestra extraída debe diluirse con tampón fosfato y ensayarse de nuevo según el procedimiento del ensayo.
- El tiempo de recuento debe ser suficiente para evitar un error estadístico del recuento: p.ej., la acumulación de 2000 cpm producirá un error del recuento del 5%, 10000 cpm producirán un error de recuento del 1%.

**MATERIALES NECESARIOS NO INCLUIDOS**

- Pipetas de precisión de 100 µl, 400 µl, 500 µl, 1000 µl y 5000 µl (o preferiblemente una pipeta múltiple ajustable de 100 - 1000 µl) con puntas desechables.
- Pipeta volumétrica de 10 ml.
- Tubos de poliestireno desechables para la preparación de las disoluciones del calibrador.
- Tubos cónicos de poliestireno desechables para realizar el ensayo (p.ej. Sarstedt ref. 57.477).
- Tubos de polipropileno, poliestireno o vidrio desechables para la preparación de extractos de plasma.
- Cilindro para la preparación del tampón fosfato.
- Agua desionizada o destilada.
- Metanol p.a. (p.ej. Merck ref. 6009).
- HCl (ácido clorhídrico) 1 N (p.ej. Merck ref. 9057).
- Colector de vacío de extracción para aplicación a las columnas de extracción (opcional).
- Concentrador de vacío o dispositivo para nitrógeno sin partículas
- Centrífuga refrigerada.
- Agitador vórtice
- Barra de agitación y agitador magnético.

- Dispositivo de aspiración.
- Contador gamma.
- 

## RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS

La recogida adecuada de las muestras es esencial para asegurar la exactitud de los resultados del análisis de vasopresina. Las muestras hemolizadas, altamente ictericas o lipémicas pueden afectar de manera adversa a los resultados. Si el procedimiento requiere niveles basales verdaderos, el paciente debe ayunar durante 12 horas como mínimo y debe permanecer recostado, sin ningún estrés y en un entorno tranquilo, como mínimo 1 hora antes de la recogida de sangre.

Recoja como mínimo 5 ml de sangre en un **tubo de venipunción con EDTA** y coloque inmediatamente la muestra en hielo. Centrifugue a 2-8°C a 2000 g durante 15 minutos antes de 10 minutos tras la recogida de sangre. Separe el plasma de las células y congele el espécimen inmediatamente a -20°C o pase a los procedimientos de extracción (véase más abajo).

La vasopresina **en orina** permanece estable 2 meses como mínimo a -20°C, si dichas muestras se han acidificado con 10% (v/v) de HCl (ácido clorhídrico) 1N inmediatamente después de la recogida (6). Después de un breve paso de centrifugación, estas muestras se pueden añadir directamente a las columnas de extracción acondicionadas (véase más abajo). Este procedimiento requiere 1 ml de plasma con EDTA u orina para las determinaciones por duplicado.

## EXTRACCIÓN

Recomendamos un procedimiento de extracción con una columna de fase inversa que sea muy específica para la adsorción y la elución posterior de vasopresina arginina. Otra opción sería utilizar un método de extracción con etanol.

- Las columnas de extracción suministradas con este kit pueden **utilizarse hasta cinco veces cada una** si se usan de acuerdo con los procedimientos de extracción descritos en este protocolo. Las columnas usadas deben almacenarse a 18-28°C protegidas de la luz y del polvo.
- Los métodos de extracción con columna descritos más abajo dan como resultado **recuperaciones** superiores al 90% con la adición de <sup>125</sup>I-vasopresina o <sup>3</sup>H-vasopresina a muestras de plasma humano con EDTA.
- Si hay que medir muestras que contengan concentraciones muy bajas de vasopresina arginina, el volumen de aplicación de la muestra puede aumentarse hasta 4 ml sin que haya un cambio importante en las recuperaciones de la extracción (véase más abajo Concentración de la extracción en el rendimiento del ensayo).
- Los procedimientos de extracción con columnas fueron **probados y validados para** muestras de **plasma humano con EDTA y orina**. Si se utilizan otros especímenes tales como **plasma animal**, se recomienda validar la recuperación de la extracción utilizando especímenes enriquecidos con <sup>125</sup>I-vasopresina. La alta fuerza iónica de la **orina** debida a las elevadas concentraciones de sales podría interferir en el radioinmunoanálisis de vasopresina. Por lo tanto, se recomienda encarecidamente la extracción con columna de muestras de orina tras la acidificación con HCl (6). Sin embargo, Panzali y col. (8) han ensayado 17 muestras de orina sin extracción con columna y han encontrado unos resultados similares a los obtenidos con las muestras extraídas.

## Procedimiento de extracción utilizando centrifugación

### Pretratamiento de las muestras

- Marque un tubo de polipropileno, poliestireno o vidrio para cada muestra que haya que extraer.
- Añada 1 ml de la correspondiente muestra de plasma.
- Añada 100 µl de HCl 1 N, agite con el vórtex y centrifugue durante 5 minutos a 2000 x g.
- Utilice el sobrenadante del plasma acidificado en el paso de aplicación de la muestra

### Preparación y acondicionamiento de la columna

- Marque una columna de extracción para cada muestra que se deba extraer y colóquelas en tubos de centrifugación de polipropileno, poliestireno o vidrio.
- Añada 1 ml de metanol a las columnas y centrifugue durante 1 minuto a 200 x g. Repita este paso una vez.
- Añada 1 ml de agua destilada o desionizada a las columnas y centrifugue durante 1 minuto a 200 x g. Repita este paso una vez.
- Vacíe los tubos para evitar que las puntas de las columnas de extracción entren en contacto con los eluatos.

### Aplicación de las muestras

- Cargue 1 ml de muestra acidificada en la correspondiente columna marcada y centrifugue durante 1 minuto a 200 x g.

### Lavado

- Añada 1 ml de agua destilada o desionizada a las columnas y centrifugue durante 1 minuto a 500 x g. Repita este paso una vez.

### Elución del extracto

- Coloque cada columna de extracción en un tubo limpio de polipropileno, poliestireno o vidrio marcado de manera correspondiente.
- Añada a las columnas 1 ml de solución de metanol que contenga 0,5 % (v/v) HCl 1 N y centrifugue durante 1 minuto a 200 x g.
- Utilice la columna para la extracción de la siguiente muestra (hasta 5 veces) o almacene la columna a 18-28°C y protegida de la luz y del polvo.

### Evaporación y reconstitución del extracto

- Evapore la solución de metanol hasta la sequedad utilizando un concentrador de vacío con una trampa de frío. Alternativamente, utilice una estufa o baño maría a 37°C y evapore el metanol hasta la sequedad con una corriente de nitrógeno sin partículas.
- Reconstituya las muestras con 1 ml de tampón fosfato y agite con el vórtex.
- Equilibre los extractos durante 30 minutos a 2-8°C y agítelos de vez en cuando con el vórtex. Almacene los extractos reconstituidos tapados y congelados a -20°C si no se realizan los ensayos inmediatamente.

## Procedimiento de extracción utilizando colector de vacío

Pase los líquidos a través de la columna con la ayuda de presión negativa. Este procedimiento es el mismo que el que se describe en el Procedimiento de extracción utilizando centrifugación.

Será necesario utilizar los siguientes flujos:

- La aplicación y la elución de la muestra debe realizarse a un flujo de 2 ml/min
- Todos los demás líquidos pueden pasar por la columna a un flujo de 5 ml/min.

## Extracción con etanol de las muestras

Las muestras también se pueden extraer utilizando una "precipitación de etanol".

- Mezcle 1 ml de cada muestra del paciente con 5 ml de etanol al 98 % (v/v) refrigerado. Agite con el vórtex durante 1 minuto.
- Centrifugue durante 20 minutos a 2-8°C y 1000 x g. Decante en otro tubo limpio de polipropileno, poliestireno o vidrio.
- Seque el sobrenadante en un concentrador de vacío. Alternativamente, utilice una estufa o baño maría a 37°C y

evapore el etanol hasta la sequedad con una corriente de nitrógeno o aire a presión y sin partículas.

- Reconstituya las muestras con 1 ml de tampón fosfato, agite con el vórtex y almacénelas congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  si no se realiza el ensayo inmediatamente.

Con la extracción de etanol, las muestras tienen unas recuperaciones habituales de 65-80%. Por lo tanto, recomendamos utilizar como control interno de recuperación 1 ml de plasma con EDTA enriquecida con  $50\ \mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I}$ -Vasopresina. Comparado con la actividad total, este factor puede utilizarse para calcular la proporción de recuperación.

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Para obtener una curva estándar completa se preparan diluciones en serie del calibrador del modo siguiente:

- Etiquete ocho tubos A hasta H y pipetee 1,0 ml de tampón fosfato en los tubos B hasta H.
- Pipetee 1,0 ml de la solución stock de calibrador reconstituido (80 pg/ml) en los tubos A y B y agite con el vórtex.
- Transfiera 1,0 ml del tubo B al tubo C y agite con el vórtex.
- Continúe con la transferencia de 1,0 ml de cada tubo hasta que se complete la serie de diluciones. Las concentraciones correspondientes de vasopresina arginina serán:

A 80 pg/ml (73,6 pmol/l)	E 5,0 pg/ml (4,6 pmol/l)
B 40 pg/ml (36,8 pmol/l)	F 2,5 pg/ml (2,3 pmol/l)
C 20 pg/ml (18,4 pmol/l)	G 1,25 pg/ml (1,1 pmol/l)
D 10 pg/ml (9,2 pmol/l)	H 0,63 pg/ml (0,6 pmol/l)

**Nota: Deje que todos los reactivos de los pasos 1 a 4 alcancen la temperatura ambiente (18-28°C) antes de su uso.**

1. Etiquete 11 tubos de poliestireno por duplicado: A a H (Calibradores), NSB (blanco), MB (máxima unión) y T (actividad total). Etiquete tubos de poliestireno adicionales por duplicado para las muestras de los pacientes y los controles.
- 2a. Pipetee 500  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato en los tubos NSB y 400  $\mu\text{l}$  en los tubos MB.
- 2b. Pipetee 400  $\mu\text{l}$  de cada uno de los calibradores A a H en los tubos correspondientes.
- 2c. Pipetee 400  $\mu\text{l}$  de las muestras extraídas de los pacientes y de los controles (sin extracción) en cada uno de los tubos correspondientes.
3. Añada 100  $\mu\text{l}$  del antisuero de vasopresina a todos los tubos excepto a los tubos NSB y T. Agite con el vórtex.
4. Incube durante 24 horas ( $\pm 3$  horas) a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
5. Añada 100  $\mu\text{l}$  del trazador de vasopresina a todos los tubos. Agite con el vórtex. Tape y retire los tubos T. No necesitarán más procesamiento hasta el paso 12 de recuento.
6. Incube durante 24 horas ( $\pm 3$  horas) a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
- 7a. Invierta varias veces la botella que contiene el segundo anticuerpo de fase sólida, añada una barra de agitación y coloque la botella en un agitador magnético.
- 7b. Mientras se agita de manera continuada, añada 100  $\mu\text{l}$  de la suspensión en cada tubo de ensayo (excepto en los tubos T). Agite con el vórtex.
8. Incube durante 20 minutos ( $\pm 1$  minuto) a  $18-28^{\circ}\text{C}$ .
9. Añada 1 ml de agua desionizada a todos los tubos (excepto a los tubos T) **sin volver a suspender los precipitados.**
10. Centrifugue durante 5 minutos a  $2-8^{\circ}\text{C}$  y  $1000 \times g$ .
11. Aspire todos los sobrenadantes (**excepto en los tubos T**) y conserve los precipitados para el recuento.
12. Cuento todos los tubos durante 1 minuto en un contador gamma.

### RESULTADOS Y ESTANDARIZACIÓN

Registre las cpm de todos los tubos (T, NSB, MB, calibradores A-H, muestras y controles) y calcule el promedio de cpm de cada par de tubos. Reste el promedio del blanco del ensayo (tubos NSB) del promedio respectivo de cada par de tubos:

$$\text{cpm netas} = \text{cpm}_{\text{Promedio}} - \text{cpm}_{\text{Promedio de NSB}}$$

Calcule la unión de cada par de tubos como un porcentaje de la máxima unión (tubos MB), considerando las cpm de los tubos MB corregidas por el NSB como el 100%.

$$\text{porcentajeunido} = \frac{\text{cpm netas}}{\text{cpm MBnetas}} \times 100$$

Prepare un papel gráfico semilogarítmico y represente el porcentaje unido en el eje vertical frente a la concentración de vasopresina (pg/ml) en el eje horizontal para cada uno de los calibradores. Dibuje la mejor curva de ajuste o calcule la curva estándar utilizando un algoritmo de cuatro parámetros. Determine las concentraciones de vasopresina para las muestras de los pacientes y los controles a partir de esta curva estándar. Son aceptables igualmente métodos alternativos de reducción de datos.

Para obtener las concentraciones de los resultados en pmol/l, multiplique los valores en pg/ml por un factor de 0,92.

Véanse Figure 1 y Table 11 para ejemplos de resultados y curvas estándar. *Estos resultados y curvas estándar se ofrecen únicamente con propósitos de demostración. Se debe generar una curva estándar para cada conjunto de muestras que se ensaye.*

**Estandarización:** El Calibrador BÜHLMANN de vasopresina arginina está pesado en material que se calibró contra la preparación de referencia de la OMS 77/501.

### CONTROL DE CALIDAD

Es necesario comprender totalmente estas instrucciones de uso para que la utilización del producto dé unos resultados satisfactorios. Sólo se obtendrán resultados fiables utilizando técnicas de laboratorio precisas (guías de Buenas Prácticas de Laboratorio actuales) y siguiendo cuidadosamente estas instrucciones de uso.

La exactitud de cada lote de calibrador efectivo se controla cada tres meses comparándolo con la preparación de referencia de la OMS 77/501.

La reproducibilidad de los parámetros de la curva estándar y de los valores de control debe encontrarse dentro de los límites establecidos de aceptabilidad del laboratorio. Los límites de confianza para los controles son específicos del lote y están impresos en la hoja de datos de control de calidad adicional del kit.

Si la precisión del ensayo no se correlaciona con los límites establecidos y la repetición excluye errores de la técnica, compruebe los siguientes aspectos: i) instrumentos de pipeteado, control de temperatura y tiempo ii) fechas de caducidad de los reactivos iii) condiciones de almacenamiento e incubación iv) pureza del agua.

### LIMITACIONES DE RENDIMIENTO

- Es fundamental utilizar únicamente plasma con EDTA para inhibir las actividades de las metaloproteasas. No puede usarse plasma con heparina en el ensayo directo con vasopresina e interferirá con la unión del anticuerpo.
- Se recomienda encarecidamente el uso de tubos cónicos de poliestireno. Se conseguirá un pellet más sólido durante el paso 10 del procedimiento del ensayo y la posterior aspiración del sobrenadante puede ser mucho más fácil.
- Las muestras de los pacientes que no se recojan y manipulen adecuadamente pueden causar resultados

inexactos de vasopresina arginina (véase Recogida de muestras). La congelación inmediata de las muestras de plasma o su extracción sin demora preservará la integridad de la concentración de vasopresina en el momento del muestreo.

- Los resultados del ensayo deben interpretarse considerando la información disponible de la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- La vasopresina es extramente inestable. Entonces las muestras deben ser transportado congeladas a - 20 °C.

#### CARACTERÍSTICAS DE EFICIENCIA

Las características de rendimiento del análisis han sido validadas por duplicado.

**Precisión intra-ensayo (dentro de la prueba): 7,6%.** La precisión intra-ensayo se calculó a partir de los resultados de 20 pares de valores de 3 muestras de plasma extraídas con columna enriquecidas con varias cantidades de vasopresina arginina en una única prueba. Los valores se presentan en Table 12.

**Precisión inter-ensayo (prueba a prueba): 10,0%.** La precisión inter-ensayo se determinó a partir de los resultados de 20 pares de valores de 2 muestras de plasma extraídas con columna y 2 muestras de plasma no extraídas ensayadas en 20 pruebas consecutivas. Los valores se presentan en Table 13.

**Linealidad/paralelismo de dilución: 95,9%.** Se diluyó en serie una muestra de plasma humano con tampón fosfato antes y después de la extracción con columna y posteriormente se ensayó según los procedimientos del ensayo. Los valores se presentan en Table 14.

**Recuperación del *spiking*: 93,4%.** Se enriquecieron tres muestras de plasma con cantidades crecientes de vasopresina arginina sintética, se extrajeron siguiendo el método de extracción con columna y se analizaron según el procedimiento del ensayo. Los valores se presentan en Table 15.

**Concentración de la extracción: 96,7%.** Se aplicaron volúmenes crecientes de una muestra de plasma humano que contenía una baja concentración de vasopresina arginina en las columnas de extracción y se extrajeron de acuerdo con el protocolo (véanse las páginas 3 y siguientes.). Cada uno de los extractos resultantes se reconstituyeron en 1 ml de tampón fosfato y se ensayaron posteriormente siguiendo los

procedimientos del ensayo. Los valores se presentan en Table 16 como pg/ml de vasopresina arginina.

**Límite del blanco (LoB): 0,39 pg/ml (0,36 pmol/l).** Se ensayaron veinte duplicados del calibrador cero (tampón fosfato) en una única prueba. La sensibilidad analítica de la vasopresina se calculó restando dos desviaciones estándar del promedio de las cpm de la máxima unión y calculando la intersección de este valor con la curva estándar obtenida en la misma prueba.

**Límite de cuantificación (LoQ): 1,9 pg/ml (1,75 pmol/l).** Se probaron cinco muestras distintas de suero con valores entre 1,3 y 4,1 pg/ml 10 veces cada una por duplicado como un intra-ensayo. Se calcularon el CV y los valores medios de cada muestra. La dosis mínima detectable funcional (DMDF) se calculó en 10% CV.

**Especificidad:** Se determinaron reacciones cruzadas del antisuero de vasopresina en el 50% de unión. Estos datos se encuentran en Table 17.

**Comparación del método:** El RIA de vasopresina se ha comparado con el RIA directo de VASOPRESINA (RK-VPD, sin extracción con columna). Los resultados obtenidos con 28 donantes de sangre (plasma con EDTA) muestran una correlación excelente (véase Figure 2).

#### INTERVALOS DE REFERENCIA

En una evaluación que incluía muestras de plasma con EDTA de 53 donantes de sangre aparentemente sanos, hemos establecido un intervalo de referencia (percentil 95) de: 3,6 pg/ml (véase Table 18).

Este intervalo normal debe utilizarse únicamente como orientativo. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo esperado para su población de pacientes. Los valores de los donantes de sangre pueden ser ligeramente elevados a causa de las condiciones desconocidas de ayuno y de posición previas a la donación. Por lo tanto, se espera que los valores basales recogidos correctamente estén en el intervalo bajo o incluso indetectable. Muchos procedimientos necesitan pruebas dinámicas con estimulación o supresión de la liberación de vasopresina.

La validez clínica del RIA de vasopresina Bühlmann (RK-AR1) se ha demostrado en muchas publicaciones clínicas y de investigación (5-7).

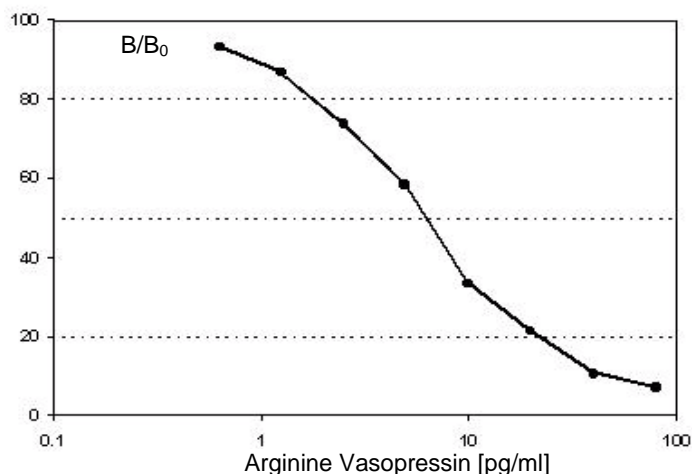
Table 11 **Example of Results**  
(Incubation at 28°C)

	cpm	B/T [%]	B/B <sub>0</sub> [%]	Conc [pg/ml]	CV [%]
Total	18212	100.0			
Total	18187	100.0			
<b>Total Avg.</b>	18200	100.0			
NSB	216	1.2			
NSB	210	1.2			
<b>NSB Avg.</b>	213	1.2			
MB	5743	31.6	100.0	0	
MB	6054	33.3	100.0	0	
<b>MB Avg.</b>	5898	32.4	100.0	0	
Calibrator H	5524	30.4	93.4	0.63	
Calibrator H	5490	30.2	92.8	0.63	
<b>Calibrator H Avg.</b>	5507	30.3	93.1	0.63	4.8
Calibrator G	5081	27.9	85.6	1.25	
Calibrator G	5208	28.6	87.8	1.25	
<b>Calibrator G Avg.</b>	5144	28.3	86.7	1.25	11.2
Calibrator F	4365	23.9	74.0	2.5	
Calibrator F	4359	23.9	73.9	2.5	
<b>Calibrator F Avg.</b>	4362	23.9	73.9	2.5	0.5
Calibrator E	3548	19.5	58.7	5	
Calibrator E	3520	19.3	58.1	5	
<b>Calibrator E Avg.</b>	3533	19.4	58.4	5	3.9
Calibrator D	2165	11.9	34.3	10	
Calibrator D	2082	11.4	32.9	10	
<b>Calibrator D Avg.</b>	2124	11.7	33.6	10	3.9
Calibrator C	1509	8.3	22.8	20	
Calibrator C	1348	7.4	20.0	20	
<b>Calibrator C Avg.</b>	1428	7.9	21.4	20	11.4
Calibrator B	826	4.5	10.8	40	
Calibrator B	819	4.5	10.7	40	
<b>Calibrator B Avg.</b>	823	4.5	10.7	40	1.1
Calibrator A	642	3.5	7.5	80	
Calibrator A	596	3.3	6.7	80	
<b>Calibrator A Avg.</b>	619	3.4	7.1	80	16.1
Control Normal	3340		55.0	5.1	
Control Normal	3335		54.9	5.1	
<b>Control Norm Avg.</b>	3337		55.0	5.1	0.2
Control High	1633		25.0	15.4	
Control High	1517		22.9	17.2	
<b>Control High Avg.</b>	1575		24.0	16.3	7.6

ED-20 = 20.3 pg/ml

ED-50 = 6.1 ng/ml

ED-80 = 1.8 pg/ml

Figure 1 **Example of a Standard Curve**Table 12 **Intra-Assay Precision (Within-Run)**

Sample	Mean Value [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
Plasma 1	1.9	0.2	8.5
Plasma 2	4.6	0.3	7.6
Plasma 3	10.1	0.7	6.6
Mean			7.6

Table 13 **Inter-Assay Precision (Run-to-Run)**

Sample	Mean Value [pg/ml]	SD [pg/ml]	CV [%]
Plasma 4	2.3	0.2	11.0
Plasma 5	10.2	0.9	9.1
Plasma 6*	2.6	0.3	11.4
Plasma 7*	16.5	1.4	8.6
Mean			10.0

\*non-extracted samples

Table 14 **Dilution Linearity/Parallelism**

Sample	Dilution	Observed [pg/ml]	Expected [pg/ml]	O/E [%]
Plasma 6 before extraction	1:1	18.9	--	--
	1:2	9.2	9.5	97
	1:4	4.6	4.7	98
	1:8	2.2	2.4	92
	1:16	1.2	1.2	98
Plasma 6 after extraction	1:1	17.6	--	--
	1:2	8.9	8.8	101
	1:4	4.3	4.4	98
	1:8	2.1	2.2	95
	1:16	1.0	1.1	88
Mean				95.9

Table 15 **Spiking Recovery**

Sample	Spiked with Vasopressin	Observed Value [pg/ml]	Expected Value [pg/ml]	Recovery [%]
EDTA Pool1	5 pg/ml	4.9	5.8	84.9
	25 pg/ml	26.0	25.8	100.5
	50 pg/ml	51.7	50.8	101.7
EDTA Pool 2	5 pg/ml	5.3	6.0	86.9
	25 pg/ml	25.8	26.0	98.9
	50 pg/ml	48.6	51.0	95.3
EDTA Pool 2	5 pg/ml	5.1	6.0	84.0
	25 pg/ml	25.0	26.0	96.0
	50 pg/ml	47.2	51.0	92.4
Mean				93.4

Table 16 **Extractive Concentration**

Sample	Sample Load	Observed [pg/ml]	Expected [pg/ml]	O/E [%]
Plasma 9	1 ml	1.8	--	--
	2 ml	3.6	3.6	100
	3 ml	5.4	5.4	100
	4 ml	6.5	7.2	90
Mean				96.7

Table 17 **Specificity**

Peptide	Cross-Reaction [%]
Arginine vasopressin	100
Arg8-Vasotocin	<0.001
<b>Lysine vasopressin*</b>	<b>0.016</b>
Desmopressin (DDAVP)	0.056
Oxytocin	<0.001

\*In Pigs and Hippopotamus the arginine at position eight is replaced by lysine

Figure 2 Method Comparison RK-VPD vs. RK-AR1

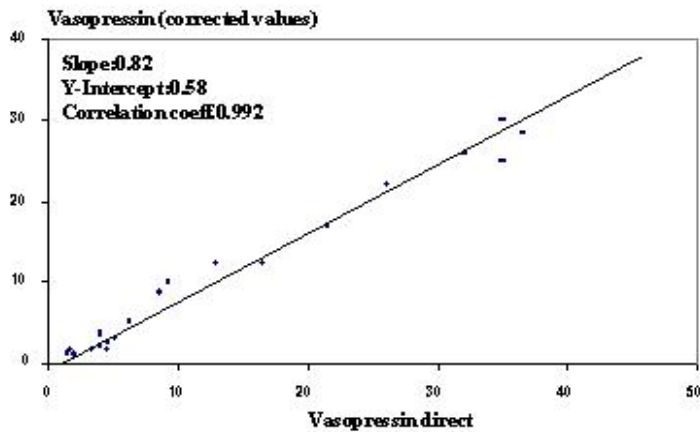


Table 18 Expected Values

	[pg/ml]
n	53
Mean	2.2
Median	2.1
SD	0.88
5th - 95th percentile	1.0 - 3.6
Min / Max	0.9 / 4.7
Mean + 2SD	3.96

**Table description:** cf. "Interpretation of RESULTS & Standardization" (page 4), "Performance Characteristics" and "REFERENCE INTERVALS" (page 5).

**Tabellenbeschreibung:** siehe "Berechnung der Ergebnisse & Standardisierung" (Seite 7), "Leistungsmerkmale" und "Referenzbereiche" (Seite 8).

**Explications relatives aux tableaux:** voir « Resultats », « Caractéristiques de Performance » (page 11) et « Domaines de référence » (page 12)

**Descrizione tavola:** cf. "Risultati", "Caratteristiche delle Prestazione" (pagina 15) e "Intervallo di referenzia" (pagina 16)

**Explicaciones relativas a las Tablas:** ver „Resultados“ (página 19), "Características de Eficiencia" y "Intervalos de referenzia" (página 20)

## APPENDIX III






### REFERENCES/ LITERATURREFERENZEN/ REFERENCES/ RIFERIMENTI/ REFERENCIAS

1. Zane Burday, S., Streck, W. F.: *Diabetes insipidus and SIADH*. In: Streck, W.F., Lockwood, D.H.: *Endocrine Diagnosis: Clinical and laboratory approach*, 107-124 (1983).
2. Oelkers, W.: *Hyponatremia and inappropriate secretion of vasopressin in patients with hypopituitarism*. *N. Engl. J. Med.* 321, 492-496 (1989).
3. Kamoi, K. et al.: *Atrial natriuretic peptide in patients with the syndrome of inappropriate anti-diuretic hormone secretion and with diabetes insipidus*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 70, 1385-1390 (1990).
4. Glick, S.M., Kagan, A.: *Radioimmunoassay of arginine vasopressin*. In: Jaffe, B.M., Behrmann, H.R.: *Methods of hormone radioimmunoassays*. Academic Press, New York (1979).
5. Jacobson, S. et al.: *Development of hypertension and uraemia after pyelonephritis in childhood: 27 year follow up*. *Br. Med. J.* 299, 703-709 (1989).
6. Ferrari, R. et al.: *Sample treatment for long-distance transport of plasma for hormone assay*. *Clin. Chem.* 35, 331-332 (1989).
7. Serrière V et al.: *Vasopressin receptor distribution in the liver controls calcium wave propagation and bile flow*. *FASEB J.* 15, 1484-6 (2001)
8. Panzali, A. et al.: *Direct determination of arginine-vasopressin in urine*. *Clin. Chem.* 36, 384-385 (1990).

**RADIOIMMUNOASSAY PROCEDURE**

Polystyrene tubes in duplicate	Phosph. Buffer (µl)	Standard, Control, Sample (µl)	Antiserum (µl)		Tracer (µl)		Second Antibody (µl)	
Total	--	--	--		100		--	Vortex and incubate for 20 minutes (± 1 min) at 18-28°C
NSB	500	--	--		100		100	
MB	400	--	100		100		100	
Std A 80 pg/ml	--	400	100		100		100	
Std B 40 pg/ml	--	400	100	Vortex and incubate at 2-8°C for 24 hours (± 3hrs)	100		100	Add 1ml of deionized water (except T tubes) and centrifuge for 5 minutes at 2-8°C and 1000 x g
Std C 20 pg/ml	--	400	100		100		100	
Std D 10 pg/ml	--	400	100		100		100	
Std E 5 pg/ml	--	400	100		100		100	
Std F 2.5 pg/ml	--	400	100		100		100	
Std G 1.25 pg/ml	--	400	100		100		100	
Std H 0.63 pg/ml	--	400	100		100		100	
Control NORMAL	--	400	100		100		100	Aspirate supernatant (except t tubes) and count for 1 minute
Control ELEVATED	--	400	100		100		100	
Sample	--	400	100		100		100	

SYMBOLS/ SYMBOLE/ SYMBOLES/ SIMBOLI/ SIMBOLOS

Symbol	Explanation
	Use By Verwendbar bis Utiliser jusqu'au Utilizzare entro Fecha de caducidad
<b>REF</b>	Catalogue number Bestellnummer Référéce du catalogue Numero di catalogo Número de catálogo
<b>LOT</b>	Batch code Chargenbezeichnung Code du lot Codice del lotto Codigo de lote
<b>IVD</b>	<i>In Vitro</i> Diagnostic Medical Device <i>In Vitro</i> Diagnostikum Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Temperature limitation Zulässiger Temperaturbereich Limites de température Limiti di temperatura Limite de temperatura
	Consult Instructions for Use- Gebrauchsanweisung beachten Consulter le mode d'emploi Consultare le istruzioni per l'uso Consulte las instrucciones de uso
	Contains sufficient for <n> tests Ausreichend für „n“ Ansätze Contenu suffisant pour „n“ tests Contenuto sufficiente per „n“ saggi Contenido suficiente para <n> ensayos
	Radioactive Material Radioaktives Material Matériel radioactif Materiale radioattivo Material radiactivo

Symbol	Explanation
<b>AEC</b>	Extraction Columns Extraktionssäulen Colonne d'extraction Colonne d' estrazione Columnas de extracción
<b>BUF H3PO4</b>	Phosphate Buffer Phosphat-Puffer Tampon phosphate Tampone fosfato Tampón fosfato
<b>Ab</b>	Antiserum Antiserum Antisérum Antisiero Antisuero
<b>TR</b>	Tracer Tracer Traceur Tracciante Trazador
<b>CAL</b>	Calibrator Kalibrator Calibreur Calibratore Calibrador
<b>CONTROL N</b>	Control Normal Normalkontrolle Contrôle normal Controllo normale Control normal
<b>CONTROL H</b>	Control High Kontrolle hoch Contrôle élevé Controllo alto Control alto
<b>Ab2</b>	2 <sup>nd</sup> Antibody 2. Antikörper 2 <sup>ème</sup> Anticorps Secondo anticorpo Segundo anticuerpo



Printing Date  
2013-01-14

