

# 25OH VITAMINA D TOTAL

## Uso Previsto:

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de la 25-hidroxivitamina D total en suero humano, plasma, homogeneizados de tejidos y otros fluidos biológicos.

## Resumen:

La vitamina D es una hormona esteroidea liposoluble precursora que se produce principalmente en la piel por exposición a la luz solar. La vitamina D es biológicamente inerte y debe someterse a pasos de hidroxilación para volverse activa.<sup>(1)</sup> Nuestro cuerpo sólo puede sintetizar vitamina D3. La vitamina D2 se ingiere con alimentos enriquecidos o se administra mediante suplementos. Fisiológicamente, las vitaminas D3 y D2 se unen a la proteína de unión a la vitamina D (VDBP) en el plasma y se transportan al hígado para convertirse en 25-hidroxivitamina D (vitamina D (25-OH)). Dado que la vitamina D (25-OH) representa la principal forma de almacenamiento, su concentración en sangre se utiliza para evaluar el estado general de la vitamina D. Más del 95 % de la vitamina D (25-OH), medible en suero, es vitamina D3 (25-OH) mientras que la vitamina D2 (25-OH) alcanza niveles medibles en sólo en pacientes que toman suplementos de vitamina D2.<sup>(1,2,3)</sup> La vitamina D es esencial para la salud ósea. En los niños, una carencia grave provoca raquitismo. En las personas mayores, el riesgo de caídas se ha atribuido a la carencia de vitamina D debido a la debilidad muscular. Además, las concentraciones bajas de vitamina D (25-OH) se asocian a una menor densidad mineral ósea. La insuficiencia también se ha relacionado con la diabetes, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y las enfermedades autoinmunes.<sup>(1)</sup> El 25-OH Vitamina D está destinado a la determinación cuantitativa de la vitamina D (25-OH) en suero humano, plasma, homogeneizados de tejidos y otros fluidos biológicos, como ayuda en la evaluación de la suficiencia de vitamina D.

## Principio de la Prueba:

Duración total del ensayo: 85 minutos.

- Se combinan la muestra, los micropocillos recubiertos con derivado de la 25-hidroxivitamina D y la enzima marcada Anti-25-Hydroxyvitamin D.
- Durante la incubación, el derivado de la 25-Hidroxivitamina D recubierto en los micropocillos y 25-Hidroxivitamina D presente en la muestra compiten por unirse a los anticuerpos marcados con la enzima.
- Tras el lavado, se genera un complejo entre la fase sólida y los anticuerpos marcados enzimáticamente mediante reacciones inmunológicas.
- A continuación, se añade una solución de sustrato que es catalizada por este complejo, dando lugar a una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbancia
- La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de 25-Hidroxivitamina D en la muestra.

## Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos, recubierta previamente con derivados de 25-Hydroxyvitamin D.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 6 ml de HRP (peroxidasa de rábano picante) etiquetado con anti-25-Hydroxyvitamin D monoclonal de oveja. Contiene de conservante ProClin300.
- Calibradores, 6 viales de 1 ml cada uno, listos para usar; con concentraciones A=0.0, B=7.5, C=15, D=30, E=75, F=150 ng/ml.
- Sustrato, 1 vial de 11 ml, listos para usar.
- Tampón de incubación, 1 vial de 6 ml. Contiene conservante ProClin300 al 0,2%.
- Solución de parada, 1 vial de 6 ml.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial de 25 ml (concentrado 40X), Contiene fosfato, NaCl y Tween-20.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

## Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 630 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas con precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

## Precauciones y Advertencias:

- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice las pruebas lejos de malas condiciones ambientales. P.ej. aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos 5 veces por completo. Cada pocillo debe llenarse completamente con solución de lavado. Sin embargo, evite que la fuerza en el llenado sea demasiado intensa para evitar desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos de cada pocillo.
- Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de residuos de agua.

- Se recomienda a lave la microplaca con un lavador automático de tiras de microplacas.
- No eliminar adecuadamente la solución adherida en la aspiración o decantación durante el lavado pueden dar resultados deficientes o falsos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.
- Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.
- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer el plato.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- La humedad atmosférica en placas frías reduce significativamente su vida útil.
- Después de obtener el número requerido de tiras, la placa debe colocarse en la bolsa de plástico con cierre con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo.
- Usar el pozo en blanco para corregir el cero punto de lectura si se utiliza un lector de longitud de onda única. Si los lectores de doble longitud de onda con 450nm y 630nm son usados, no hay necesidad de corregir el punto cero.

## Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C.
- Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con cierre hermético y regréselo a 2-8°C, bajo cuyas condiciones los pozos permanecerán estables por 2 meses, o hasta que la fecha de caducidad.
- Selle y devuelva los calibradores no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso prolongado, almacene los calibradores y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad etiquetada.

## Recolección y Preparación de Muestras:

- Recoger muestras de suero de acuerdo con las prácticas de laboratorio correctas.
- Las muestras de suero pueden analizarse mediante este procedimiento, separe suero del coágulo tan pronto como sea posible para evitar la hemólisis.
- Tapar y conservar las muestras a 18-25 °C durante un máximo de 8 horas. Estable durante 3 días a 2-8 °C, y 1 mes a -20 °C. Recuperación dentro del 90-110 % del valor del suero o pendiente 0,9-1,1. Congelar una sola vez.
- Centrifugar muestras que contengan precipitados antes de realizar el ensayo. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice muestras y controles estabilizados con azida.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba que debe ser eliminado por centrifugación. Asegúrese de que la formación completa del coágulo en las muestras de suero ha tenido lugar antes de la centrifugación.

## Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener muestras de controles en los niveles bajo, normal y rango elevado para monitorear el rendimiento de la prueba. Debe haber controles tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado. El requisito de controles recomendados para este ensayo es utilizar un control por separado y probarlos junto las muestras dentro de la misma corrida. El resultado es válido si los valores de control están dentro de la concentración rangos impresos en las etiquetas.

## Solución de Lavado (Dilución 40X):

Diluya 25 ml de Solución de Lavado Concentrada en 975 ml de agua desionizada, para un volumen final de 1000 ml. Estable por 2 meses a temperatura ambiente.

## Procedimiento de Prueba:

- Utilice sólo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra a realizar. Todos los calibradores y los controles deben establecer duplicado.
- Agregue 50 µL de calibradores o muestras a cada pocillo.
- Agregue 50 µL de tapón de incubación a cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 5 minutos para mezclar.
- Agregue 50 µL de enzima conjugada a cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a 37°C durante 60 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
- Agregue 350 µl de solución de lavado, 10 segundos por cada lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.
- Dispense 100 µl de sustrato en cada pocillo (no agite los pocillos).
- Cubra la placa con la tapa placa e incube a temperatura ambiente (18-25 °C) en la oscuridad durante 20 minutos.
- Agregue 50 µl de solución de parada a cada pocillo.

- Agite de 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Importante: Asegúrese de que el color cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pozo dentro de los primeros 30 minutos a 450nm (usando 620 a 630nm como longitud de onda secundaria para minimizar las imperfecciones del pocillo) en un lector de microplacas.

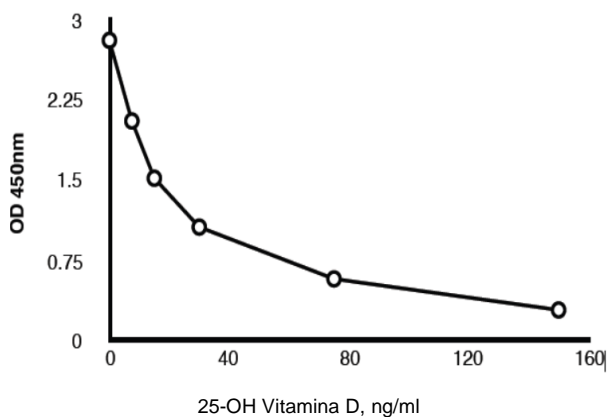
#### Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
- Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
- Trace el logaritmo común de la absorbancia frente a la concentración en ng/ml para cada calibrador.
- Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrado lineal.

#### Intervalos de Referencia:

Los datos que figuran a continuación son sólo para demostración, cada laboratorio debe realizar y utilizar sus intervalos de referencias.

Muestra	Valor (ng/ml)	Absorbancia
Calibrador A	0	2.818
Calibrador B	7.5	2.060
Calibrador C	15	1.522
Calibrador D	30	1.063
Calibrador E	75	0.576
Calibrador F	150	0.284
Control 1	16.41	1.479
Control 2	37.48	0.982
Paciente	21.41	1.326



#### Limitaciones e Interferencias:

- El ensayo no se ve afectado por ictericia (bilirrubina < 600 µmol/L o < 35mg/dL), hemólisis (Hb < 0.559 mmol/L o < 0.9 g/dL), lipemia (Intralipid < 1200 mg/dL), y biotina < 94 nmol/L o < 23 ng/ml.
- Criterio: Recuperación dentro de ± 10 % del valor inicial.
- Anticuerpos heterofílicos y factores reumatoides en las muestras pueden interferir con los resultados de la prueba. Los anticuerpos heterofílicos en suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas del reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro.
- Los pacientes expuestos habitualmente a animales o a productos de suero de animales pueden ser propensos a esta interferencia y pueden observarse valores anómalos. Puede ser necesaria información adicional para el diagnóstico. Este tipo de muestras no son aptas para ser analizadas mediante este ensayo.

#### Límites y Rangos:

Rango de medición:

2,0-150 ng/ml (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Los valores por debajo del límite de detección se notifican como < 2,0 ng/ml.

Los valores por encima del rango de medición se notifican como > 150 ng/ml.

Límite inferior de detección: 2,0 ng/ml.

El límite de detección representa el nivel más bajo de analito que puede distinguirse de cero. Se calcula como el valor situado dos desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1 - 2 SD, estudio de repetibilidad, n = 21).

#### Valores Esperados:

Nivel	ng/ml
Deficiente	<10
Insuficiente	10-29
Suficiente	30-100
Potencialmente Tóxico	>100

#### Precisión:

La precisión se determinó utilizando reactivos, sueros humanos agrupados y controles en un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): 2 veces al día durante 20 días (n = 40). Se obtuvieron los siguientes resultados:

Muestra	Media ng/ml	Repetibilidad*		Precisión Intermedia	
		SD ng/ml	CV %	SD ng/ml	CV %
Suero Humano 1	8.2	0.6096	7.4	0.6972	8.5
Suero Humano 2	21.4	1.3268	6.2	1.5423	7.2
Suero Humano 3	33.5	2.0544	6.1	1.9754	5.9
Control Universal 1	13.3	0.9773	7.3	0.9877	7.4
Control Universal 2	30.1	1.4050	4.7	1.8523	6.2

#### Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo 25-OH Vitamina D RJL (y) con Roche Elecsys 25-OH Vitamina D (x) utilizando muestras clínicas dio las siguientes correlaciones:

Número de muestras medidas: 105

Regresión lineal:

$$y = 0,9437x + 0,8223$$

$$r = 0,9594$$

Las concentraciones de las muestras se situaron entre aprox. 2,0 y 148 ng/ml.

#### Referencias:

1. Holick, M.F. (2007). Vitamin D de ciencia. N Engl J Med, 357:266-281.
2. Houghton, L.A., Vieth, R. (2006). The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. Am J Clin Nutr, 84:694-697.
3. Hart, G.R., Furniss, J.L., Laurie, D., et al. (2006). Measurement of vitamin D Status: background, clinical use and methodologies. Clin Lab, 52(7-8):335-343.

