

Para nuestra población, en donantes aparentemente sanos, el rango de referencia (suero) es de: 15 – 60ng/ml.

## DESCRIPCION DE LAS CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO DEL PRODUCTO

### 1. Precisión:

#### Intra-Ensayo

| Suero | No de Réplicas | Media, ng/ml | Desvío Estandar | Coefficiente de Variación (%) |
|-------|----------------|--------------|-----------------|-------------------------------|
| 1     | 16             | 8.1          | 0.315           | 3.87                          |
| 2     | 16             | 25.3         | 1.608           | 6.36                          |
| 3     | 16             | 35.9         | 1.661           | 4.62                          |

#### Inter Ensayo

| Suero | No de Réplicas | Media, ng/ml | Desvío Estandar | Coefficiente de Variación (%) |
|-------|----------------|--------------|-----------------|-------------------------------|
| 1     | 10             | 7.9          | 0.36            | 4.55                          |
| 2     | 10             | 23.4         | 1.63            | 6.95                          |
| 3     | 10             | 37.6         | 2.02            | 5.38                          |

### 2. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba es de 0.67 ng/ml, determinada al calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Holick, MF. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation and Clinical Application. *Ann Epidemiol.* 2009, 19(2):73 – 78.
- Morris H. A. Vitamin D: A Hormone for All Seasons-How Much is enough? *Clin. Biochem. Rev.*, 2005, 26, 21-32.
- Bikle D. D. Vitamin D and the skin. *J. Bone Miner. Metab.*, 2010, 28, 117-30.
- Zerwekh J. E. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 87, 1087S-91S.
- Moyad M. A. Vitamin D: a rapid review. *Dermatol Nurs.*, 2009, 21, 25-30.

### INDICACIONES AL CONSUMIDOR

#### Establecimiento importador:

Laboratorios Bacon S.A.I.C.

Uruguay 136, Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires, Argentina

Teléfono/Fax/E-mail: 4709-0171 / 4709-2636 / pzubata@bacon.com.ar

#### Establecimiento elaborador:

Calbiotech, Inc

1935 Cordell Ct. El Cajon, CA 92020, EE.UU

Directora Técnica: Patricia Zubata, Farmacéutica. M.N. N° 10.965

Autorizado por la ANMAT PM-128-6

#### Uso Profesional Exclusivo

Autorizado por la ANMAT PM-128-6



CEpartner4U, 3951DB; 13. NL. tel:  
+31 (0)6.516.536.26



## 25 (OH) Vitamina D ELISA

Número de Catálogo . VD220B (96 Pruebas)

### USO PREVISTO:

El kit ELISA in situ 25 OH Vitamina D de Calbiotech, Inc. se utiliza para la cuantificación del total de 25-OH Vitamina D en suero o plasma.

### RESUMEN

La vitamina D es una hormona esteroide que participa en la absorción intestinal activa de calcio y en la regulación de su homeostasis. La vitamina D tiene dos isómeros: La vitamina D2 y vitamina D3. La vitamina D2 se obtiene a partir de productos lácteos mientras que la vitamina D3 se produce en la piel después de la exposición a la luz ultravioleta. En el hígado, la vitamina D se hidroxila en su carbono 25 para formar 25-OH vitamina D. Este metabolito es la forma circulante predominante de la vitamina D y se considera que es un indicador preciso del estado de vitamina D de un individuo en general. La deficiencia de vitamina D se ha relacionado con muchas enfermedades incluyendo la osteoporosis, el raquitismo, la osteomalacia, cáncer, y enfermedades vasculares. Ambos suplementos dietéticos de vitamina D que se encuentran disponibles actualmente en el mercado (vitamina D2 y vitamina D3) se convierten a 25-OH vitamina D en el hígado. La suma de las concentraciones de 25-OH vitamina D2 y 25-OH vitamina D3, en suero o plasma, se conoce como "total 25-OH vitamina D". La supervisión precisa de nivel total de 25-OH vitamina D es crítica en entornos clínicos. La vitamina D en pacientes con deficiencia a los cuales se les prescribe un suplemento de vitamina D a diario, debe ser monitoreada regularmente en su suero o plasma, a fin de que los niveles de Vitamina D lleguen a un nivel óptimo y evitar que las concentraciones de 25-OH vitamina D alcance niveles excesivos, considerados tóxicos<sup>1,5</sup>.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Vitamina D ELISA es un inmunoensayo en una fase sólida ligada a enzima, basado en el principio de unión competitiva. Los micropocillos recubiertos de anticuerpo anti-vitamina D son incubados con los estándares, controles, las muestras y el conjugado Vitamina D-Biotina, a temperatura ambiente durante 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad fija de Vitamina D ligada a Biotina, compite con la vitamina D endógena en la muestra, estándar, o suero de control de calidad por un número fijo de sitios de unión en el anticuerpo anti vitamina D. Después del lavado, la vitamina D-Biotina es unida a Streptavidina-HRP (SA-HRP) El conjugado de Streptavidina-HRP, inmunológicamente unido al pocillo, disminuye progresivamente a medida que la concentración de vitamina D en las muestras se incrementa. Seguidamente es retirado el conjugado SA-HRP no unido y los micropocillos son lavados. A continuación, se añade una solución de TMB que se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos, lo que resulta en el desarrollo del color azul. El desarrollo de color es frenado con la adición de solución de detención, y la absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm. Una curva estándar se obtiene mediante el trazado de la concentración de los estándares frente a la absorbancia. La intensidad del color será inversamente proporcional a la cantidad de 25 (OH) D en la muestra. El ensayo mide tanto la vitamina D2 y D3. El tiempo total de procedimiento de ensayo de ejecución es de 2 horas y 30 minutos.

| MATERIALES PROVISTOS                                       | 96 Pruebas |
|--|------------|
| 1. Micropocillos recubiertos con Anti-Vitamina D           | 12x8x1     |
| 2. Estándares de Vitamina D: 7 viales (listos para su uso) | 0.5 ml     |
| 3. Controles de Vitamina D: 7 viales (listos para su uso)  | 0.5 ml     |
| 4. Reactivo 25(OH) Vitamina D Biotilado: 1 vial (51X)      | 0.55 ml    |
| 5. Diluyente de la Prueba: 1 frasco                        | 24 ml      |
| 6. Streptavidina-HRP: 1 frasco (listo para su uso)         | 23 ml      |
| 7. Solución de Detención: 1 botella (listo para su uso)    | 12 ml      |
| 8. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)              | 24 ml      |
| 9. Film de sellado para micropocillos                      | 2          |
| 10. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 frasco           | 25 ml      |

**MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS**

1. Pipetas de precisión.
2. Puntas de pipetas desechables.
3. Lector de Microplacas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD ó mayor
4. Mezclador Vortex de cabeza plana.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel milimetrado.

**CUIDADOS Y PRECAUCIONES**

1. Potencial riesgo biológico de los materiales. Los calibradores contienen componentes de origen humano, que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo, no hay método de prueba que pueda ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Manuales de los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984
2. No se debe pipetear con la boca. No fumar, comer o beber en el área de trabajo donde se realice este ensayo.
3. Los componentes de este kit son para uso como una unidad integral. No se deben mezclar los componentes de diferentes lotes.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se ensayen por duplicado
5. Para obtener resultados óptimos, este protocolo debe ser llevado a cabo de forma estricta. Es esencial que el pipeteado sea exacto y preciso, así como el control de la hora y la temperatura prescrita. Cualquier desviación puede resultar en datos no válidos.

**INSTRUCCIONES PARA SU CONSERVACION**

Conservar entre 2 – 8 °C. No utilizar pasada la fecha de caducidad.

**RECOLECCION Y MANEJO DE LA MUESTRA**

Para este ensayo pueden ser utilizadas muestras de suero, plasma heparinizado o con EDTA:

- Para el suero, recolecte sangre por venopunción y permita su coagulación.
- En cuanto al plasma, mezcle gentilmente por inversión antes de centrifugar

Centrifugue y separe el suero o plasma tan pronto como sea posible luego de la recolección. No utilice muestras hemolizadas. Las muestras pueden ser refrigeradas por dos semanas a 2 - 8°C. Para el almacenamiento a largo plazo, deberán ser almacenadas a - 20°C. Evite ciclos de congelamiento – descongelamiento. Permita que las muestras refrigeradas o descongeladas se equilibren a temperatura ambiente por 30 minutos previos a su uso. Las muestras deben ser mezcladas previo al análisis.

**PREPARACION DEL REACTIVO**

Antes de llevar a cabo el test, realice los siguientes preparados:

1. **ESTANDARES Y REACTIVOS:** Los estándares, que son soluciones basadas en suero, se mantienen estables, mientras hayan sido almacenadas a 2 - 8°C, y no hayan sido expuestas a luz intensa, hasta su fecha de expiración. Equilibre los volúmenes necesarios de estándares y reactivos a temperatura ambiente, previo a ser usados.
2. **CONJUGADO 51X BIOTINA** Inmediatamente antes de su uso, prepare 1X de solución de trabajo a 1:51 con diluyente de muestra. *EJEMPLO: Agregue 0.1 ml de conjugado 51X Vitamina D-Biotina a 5 ml de diluyente de la muestra. El sobrante del diluyente de muestra deberá ser almacenado a 2 - 8°C, bien cerrado y en un lugar oscuro.*
3. **BUFFER DE LAVADO** Prepare una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml.20 X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conserve a temperatura ambiente 18 - 24°C.

**PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO**

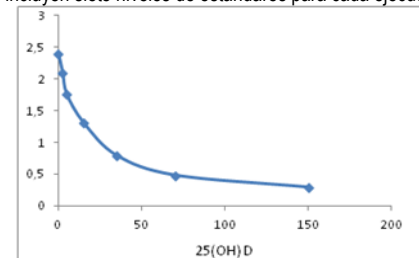
Todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26° C) antes de su uso. Mezcle gentilmente todos los reactivos previo a su uso, sin dejar que se forme espuma. Una vez iniciado el proceso, deben respetarse todos los pasos, sin interrupción.

1. Verter 10µl de estándares de 25-OH Vitamina D, controles y muestras en los micropocillos designados.
2. Dispensar 200µl de solución de trabajo 25 (OH) D Biotinilada en los micropocillos designados.
3. Mezclar suavemente los pocillos en agitador a 200-400 rpm por 20 segundos. Retirar la microplaca del agitador y cubrir completamente con el film de sellado, asegurándose que cada micropocillo quede completamente sellado.
4. **INCUBACION #1:** Incubar la microplaca sellada a temperatura ambiente (18-25° C) por 90 minutos

5. Retirar cuidadosamente el film de la microplaca.
6. Sacudir enérgicamente el contenido de los micropocillos en un depósito de residuos.
7. **LAVADO #1:** Dispensar 300µl de lavado en cada micropocillo y sacudir enérgicamente el Buffer de Lavado 1X en un depósito de residuos. Luego agitar enérgicamente el Buffer de lavado 1X dentro de un depósito de residuos. Golpear los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales. Repetir dos veces para un total de tres lavados.
8. Agregar 200 µl de Conjugado Enzimático Streptavidina-HRP en cada pocillo.
9. **INCUBACION #2:** Incubar a temperatura ambiente (18-25° C) por 30 minutos.
10. Sacudir enérgicamente el contenido de los micropocillos en un depósito de residuos.
11. **LAVADO #2:** Dispensar 300µl de lavado en cada micropocillo y sacudir enérgicamente el Buffer de Lavado 1X en un depósito de residuos. Luego agitar enérgicamente el Buffer de lavado 1X dentro de un depósito de residuos. Golpear los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales. Repetir dos veces para un total de tres lavados.
12. Usando una pipeta de múltiples canales, dispensar 200µl de sustrato de TMB en cada pocillo.
13. **INCUBACION #3:** Incubar a temperatura ambiente (18-25° C) por 30 minutos, preferentemente en la oscuridad.
14. **FRENADO:** Frene la reacción agregando 50 µl de Solución de Detención a cada pocillo. **Mezclar los contenidos de los micropocillos cuidadosamente por 20-30 segundos.**
15. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 10 minutos después de haber agregado la solución de detención.

**CURVA STANDARD**

Se incluyen siete niveles de estándares para cada ejecución. Un modelo típico de curva estándar se muestra debajo:



| 25(OH)D, (ng/ml) | Absorbancia (450nm) |
|------------------|---------------------|
| 0                | 2.40                |
| 2.5              | 2.10                |
| 5                | 1.76                |
| 15               | 1.31                |
| 35               | 0.79                |
| 70               | 0.48                |
| 150              | 0.29                |

**DESCRIPCION DE LOS PROCEDIMIENTOS DE CÁLCULOS Y OBTENCIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA MEDICIÓN:**

Los resultados se expresan en ng/ml. Para convertirlo en nmol/L, multiplicar los resultados por 2.5. Ejemplo: 100 ng/ml=25 nmol/L.

**INFORMACIONES SOBRE LAS LIMITACIONES DEL PROCESO DE MEDICIÓN** No aplica.**ORIENTACIONES SOBRE EL CONTROL INTERNO DE CALIDAD A SER ADOPTADO POR EL USUARIO PARA EL CORRECTO DESEMPEÑO DEL PROCESO DE MEDICIÓN**

Se recomienda que cada laboratorio utilice los controles de la vitamina 25-OH para validar el funcionamiento de los reactivos.

**INFORMACIÓN SOBRE LOS VALORES DE REFERENCIA OBTENIDOS EN POBLACIONES SANAS O VALORES DEMOGRÁFICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, ESTADÍSTICOS, DESEABLES, TERAPÉUTICOS O TÓXICOS****Rango de Referencia:**

Calbiotech recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia. Hasta que ello suceda, la siguiente lista puede ser utilizada como referencia:

| Nivel        | Rango de Referencia |
|--------------|---------------------|
| Deficiente   | <10ng/ml            |
| Insuficiente | 10ng/ml – 30ng/ml   |
| Suficiente   | 30ng/ml – 100ng/ml  |
| Intoxicación | >100ng/ml           |