

**VD-T**

**25-OH-Vitamin D Total (CLIA)**

**Use previsto**

Inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA) para la determinación cuantitativa de 25-OH-vitamina D total (VD-T) en suero o plasma

**Significación clínica**

La vitamina D es un precursor hormonal esteroide liposoluble necesario que puede verse influenciado por diferentes tipos de factores tales como luz solar, dieta, grasa, edad, raza, entre otros.

La vitamina D existe en dos formas principales. Alrededor del 90-95 % de la vitamina D es vitamina D3, que se produce a partir de la conversión de 7-dehidrocolesterol en la piel tras la exposición a la luz solar. La otra es la vitamina D2, que se adquiere a través de la dieta solamente.

La vitamina D procedente de la piel o de la dieta es biológicamente inactiva. Esta ingresa en la circulación unida a la proteína ligadora de vitamina D (DBP) y transportada hacia el hígado y el riñón para someterse a dos reacciones de hidroxilación. La primera hidroxilación convierte a la vitamina D en 25-OH-vitamina D en el hígado. La segunda hidroxilación convierte a la 25-OH-vitamina D en la forma biológicamente activa 1,25-di-OH-vitamina D en los riñones o en muchas otras células. La 25-OH-vitamina D está presente en la sangre en una concentración hasta 1000 veces más alta en comparación con la activa 1,25-di-OH-vitamina D. La 25-OH-vitamina D tiene una semivida de 2-3 semanas frente a las 4 horas de la 1,25-di-OH-vitamina D. Por lo tanto, la 25-OH-vitamina D es el mejor analito para evaluar con precisión el estado de vitamina D. La función principal de la vitamina D es el mantenimiento de la homeostasis del calcio y del fósforo. La deficiencia de vitamina D puede conducir a problemas en el sistema esquelético tales como recambio óseo, pérdida progresiva de la densidad ósea y osteoporosis. En estudios recientes se descubrió el receptor de la vitamina D en otros tejidos y órganos, lo que sugiere que la vitamina D también puede ser importante en los procesos biológicos no-esqueléticos. Por otro lado, la deficiencia de vitamina D puede asociarse con un mayor riesgo de cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades cardiovasculares y muchas enfermedades crónicas. Es esencial la evaluación del estado y de los suplementos personalizados de vitamina D.

**Fundamentos del método**

El **25-OH-Vitamin D Total (CLIA)** es un ensayo inmunoenzimático competitivo para determinar el nivel de 25-OH-vitamina D total. En el primer paso se agregan a una cubeta de reacción: la muestra, el reactivo de pretratamiento 1 (PT1) y el reactivo de pretratamiento 2 (PT2). Luego de la incubación, la VD-T unida se libera de la proteína transportadora de vitamina D.

En el segundo paso se agregan a otra cubeta de reacción, la muestra pretratada y el conjugado anti-VD-T-fosfatasa alcalina. Luego de la segunda incubación, la VD-T se une al conjugado formando un complejo.

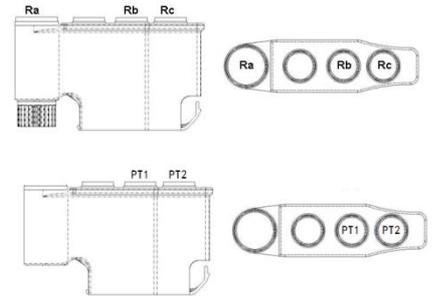
En el tercer paso se agregan a la cubeta de reacción, micropartículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina y VD-T biotinilada. Luego de la tercera incubación, la VD-T biotinilada se une al conjugado anti-VD-T-fosfatasa alcalina formando un complejo que se une a la estreptavidina de las de las micropartículas, las cuales se capturan magnéticamente. Las sustancias no unidas se eliminan por lavado.

En el cuarto paso, la solución de sustrato (Substrate Solution) se agrega a la cubeta de reacción. La reacción quimioluminiscente producida por el conjugado se mide como unidades relativas de luz (RLU). La cantidad de VD-T presente en la muestra es inversamente proporcional a la RLU generadas durante la reacción. La concentración de VD-T se determina mediante una curva de calibración.

**Reactivos provistos**

Ra	Micropartículas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina en buffer TRIS.
Rb	Conjugado de anticuerpo anti-VD-T-fosfatasa alcalina en buffer PBS.
Rc	VD-T biotinilada en buffer TRIS.
PT1	Reactivo de pretratamiento 1, buffer TRIS.
PT2	Reactivo de pretratamiento 2, solución de hidróxido de sodio.

La posición de los componentes del kit se muestra en la siguiente figura:



**Reactivos no provistos**

- 25-OH-Vitamin D Total Calibrators
- Metabolic Multi Control (L)
- Metabolic Multi Control (H)
- Wash Buffer
- Substrate Solution

Estos reactivos son provistos separadamente por Wiener lab.

**Instrucciones para su uso**

Los reactivos son listos para usar

**Precauciones**

- Para uso diagnóstico "in vitro".
- Mantener el kit de reactivos en posición vertical para asegurar que no se pierdan micropartículas antes del uso.
- No utilizar reactivos de otro origen.
- No utilizar reactivos después de la fecha de vencimiento.
- No intercambiar reactivos de distintos lotes.
- Todas las muestras de pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infección.
- Utilizar los reactivos respetando las precauciones habituales de trabajo en el laboratorio bioquímico.
- Todos los reactivos y las muestras deben descartarse de acuerdo a la normativa local vigente.

**Estabilidad e instrucciones de almacenamiento**

El kit es estable a 2-8°C hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja

**Material requerido (no provisto)**

Analizador de quimioluminiscencia Wiener lab. CLIA series

**Muestra**

Suero o plasma

- Recolección:** obtener la muestra de la manera habitual. No utilizar muestras fuertemente hemolizadas ni inactivadas por calor.
- Aditivos:** en caso de utilizar plasma, se recomienda el uso de heparina sódica o heparina de litio como anticoagulantes.
- Centrifugar** las muestras y separar el suero o plasma antes de las dos horas.
- Estabilidad e instrucciones de almacenamiento:** las muestras deben ser preferentemente frescas. Si no se procesan dentro de las 8 horas posteriores a la recolección, las muestras deben conservarse a 2-8°C. De esta manera, son estables hasta 4 días refrigeradas a 2-8°C, o hasta 180 días congeladas a -20°C o menos. Evitar los ciclos de congelado y descongelado.

**Procedimiento**

Antes de cargar los reactivos en el analizador se debe invertir suavemente el frasco de reactivos sin abrir por lo menos 30 veces para resuspender las micropartículas sedimentadas durante el almacenamiento. Realizar una inspección visual del frasco para asegurar la resuspensión de las micropartículas. Si las mismas continúan adheridas al frasco, seguir invirtiéndolo hasta su resuspensión completa. Si aún así las micropartículas no se resuspenden, se recomienda desechar el frasco. El ensayo requiere 40 µl de muestra. En este volumen no se incluye el volumen muerto del contenedor de muestras.

**Calibración**

El kit **25-OH-Vitamin D Total (CLIA)** de Wiener lab. ha sido estandarizado con un ensayo de VD-T comercial (CLIA).

La información específica de la curva maestra de calibración está contenida en el código bidimensional provisto. Se utiliza junto con los calibradores para la calibración del lote de reactor específico. Al realizar la calibración, se debe escanear primero la información de la curva maestra de calibración del código bidimensional en el sistema. A continuación, utilizar los calibradores a tres niveles. Se requiere una curva de calibración válida antes de cualquier prueba de VD-T. Se recomienda una recalibración cada 4 semanas, cuando se utilice un nuevo lote de reactivos o los controles de calidad no se encuentren dentro de los intervalos especificados. Para obtener información detallada sobre la calibración, consulte el manual de funcionamiento del analizador.

**Control de calidad Metabolic Multi Control (L) y Metabolic Multi Control (H) de Wiener lab.**

**Cálculo de los resultados**

El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra a partir de la curva maestra de calibración leída del código bidimensional y un ajuste de la curva logística de 4 parámetros (4PLC) con las RLU generadas por los 3 niveles de calibradores. Los resultados se muestran en ng/mL. Factor de conversión: ng/mL x 2,5 = nmol/L.

**Valores esperados**

- Valores de referencia conforme a la salud: La mayoría de los expertos están de acuerdo en definir la deficiencia de vitamina D de la siguiente manera:

Status de vitamina D	Concentración de 25-OH-vitamina D
Deficiente	< 20 ng/mL
Insuficiente	20-30 ng/mL
Suficiente	> 30 ng/mL

- Valores de referencia medidos en una población aparentemente sana: Un estudio sobre una población de 138 individuos sanos ha determinado el siguiente intervalo de referencia:

Categoría	Número de muestras	Percentilo 2,5-97,5%
Suero	138	4.9~55.8 ng/ml

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.

**Limitaciones del procedimiento**

El límite superior del ensayo es de 150 ng/mL. Se puede determinar cuantitativamente una muestra con una concentración de VD-T inferior al límite superior, pero una muestra con una concentración mayor que el límite superior se

informará como >150 ng/mL.

La concentración de VD-T en una muestra ensayada con distintos kits comerciales, puede variar debido a diferencias en los métodos de ensayo, calibración y especificidad de los reactivos. Los resultados del ensayo se deben utilizar junto con otros datos, como síntomas, resultados de otras pruebas, historia clínica, etc. Muestras de individuos expuestos a anticuerpos monoclonales de ratón pueden contener anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). Estas muestras pueden mostrar valores falsamente elevados o bajos con kits que utilicen anticuerpos de ratones monoclonales. Sin embargo, no se observaron interferencias evidentes de HAMA en este ensayo.

#### Performance

**a) Sensibilidad analítica:**  $\leq 3,0$  ng/mL

**b) Rango de medición:** 3,0-150 ng/mL.

#### c) Especificidad:

- No se observan interferencias por hemoglobina hasta 50 mg/dL, bilirrubina hasta 20 mg/dL, triglicéridos hasta 1500 mg/dL, proteínas totales hasta 10 g/dL, factor reumatoide hasta 400 UI/mL ni anticuerpo antinuclear.

- El calibrador C0 de **25-OH-Vitamin D Total Calibrators** se enriqueció con análogos de VD-T en las concentraciones específicas indicadas en la tabla. No se observó reactividad cruzada evidente. Los resultados se resumen a continuación:

Sustancia	Concentración (ng/mL)	Reactividad cruzada
Vitamina D2	100	no detectable
Vitamina D3	100	no detectable
25-hidroxivitamina D2	100	96.33 %
25-hidroxivitamina D3	100	98.02 %
1,25-dihidroxivitamina D2	100	97.80 %
1,25-dihidroxivitamina D3	100	97.88 %
24,25-dihidroxivitamina D3	100	no detectable
Epímero C3 de 25-hidroxivitamina D3	100	48.00 %

#### d) Exactitud:

Se usaron dos controles con valores trazables y predefinidos para verificar la exactitud de este ensayo. Los resultados demostraron que las desviaciones relativas eran inferiores a  $\pm 10$  %. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

Muestra	VD-T medida (ng/mL)	VD-T predefinida (ng/mL)	Desvío relativo
Nivel 1	15,42	15,34	0,52%
Nivel 2	41,82	41,05	1,88%

#### e) Precisión:

El ensayo de VD-T serie CL está diseñado para La precisión se determinó mediante el protocolo EP5-A2 del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS). Se probaron dos niveles de controles de calidad por duplicado en

dos series independientes por día, durante un total de 20 días.

Muestra	Valor medio (ng/mL)	CV Intra-ensayo	CV Inter-ensayo	CV total
1	15.32	3.39 %	2.94 %	3.80 %
2	38.74	2.79 %	2.61 %	3.27 %

**f) Linealidad:** la reacción es lineal entre 3.0 y 150 ng/mL.

#### g) Correlación:

El ensayo de **25-OH-Vitamin D Total (CLIA)** de Wiener lab. se comparó con un kit comercial de características similares, utilizando 307 muestras. Los datos estadísticos obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

Intervalo de concentración (ng/mL)	Pendiente	Intersección	Coefficiente de correlación
3.0~150	0.9732	1.0714	0.9752

#### Presentaciones

- 1 x 50 tests (cód. 1001001)
- 1 x 100 tests (cód. 1001002)

#### Referencias

- Pilz S, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. Nat. Rev. Cardiol. 2009; 6: 621-30.
- Holick M. Vitamin D: the underappreciated D-lightful hormone that is important for skeletal and cellular health. Curr Opin Endocrinol Diabetes 2002; 9(1):87-98.
- Cavalier E, Vitamin D: current status and perspectives. Chem Lab Med 2009; 47(2):120-27.
- Hart GR, Furniss JL, Laurie D y otros. Measurement of vitamin D Status: background, clinical use and methodologies. Clin Lab 2006; 52(7-8):335-343.
- Passeri G y otros. Low vitamin D status, high bone turnover, and bone fractures in centenarians. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88: 5109-5115.
- Souberbielle JC y otros. Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. Autoimmunity Reviews 2010; 9: 709-715.
- Boscatto LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988; 34:27-33.
- Kricka L. Interferences in immunoassays - still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037-1038.
- Bjerner J y otros. Immunometric assay interference: incidence and prevention. Clin Chem 2002; 48: 613-621.

#### SÍMBOLOS

 Este producto cumple con los requerimientos previstos por la Directiva Europea 98/79 CE de productos sanitarios para el diagnóstico "in vitro"

 Representante autorizado en la Comunidad Europea

 Elaborado por

 Uso diagnóstico "in vitro"

 Consultar instrucciones de uso

 Este lado arriba

 Límite de temperatura (conservar a)

 Número de lote

 Fecha de caducidad

 Número de catálogo

 Riesgo biológico

 Contenido

 SHENZHEN MINDRAY BIO-MEDICAL ELECTRONICS CO., LTD.  
Mindray building. Keji 12th Road South. Hi-tech Industrial Park.

Fabricado para:  
Wiener Laboratorios S.A.I.C.  
Riobamba 2944  
2000 Rosario - Argentina  
<http://www.wiener-lab.com>  
Producto Autorizado por A.N.M.A.T.  
PM-1102-144.  
Dir. Téc.: Viviana E. Cétola  
Bioquímica