

## RESUMEN Y APLICACIÓN

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 en general de un individuo. La deficiencia de vitamina D se ha relacionado con muchas enfermedades incluyendo la osteoporosis, el raquitismo, la osteomalacia, cánceres, y enfermedades cardiovasculares. 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". Supervisión precisa de nivel total de 25-OH vitamina D es crítica en entornos clínicos. La vitamina D en pacientes con deficiencia que se prescriben un suplemento de vitamina D todos los días debe monitorear regularmente su suero o plasma de los niveles de vitamina D con el fin de llegar a un nivel óptimo y evitar que sus concentraciones de 25-OH vitamina D alcance niveles excesivos que se consideran toxic1-5.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit es una fase sólida ligada a enzima inmunoensayo (ELISA), basados en el principio de unión competitiva. Los pozos de anticuerpo anti-vitamina D recubiertas se incubaron con las normas de la vitamina D, los controles, las muestras y el conjugado de vitamina D Biotina a temperatura ambiente durante 120 minutos. Durante la incubación, una cantidad fija de marcado con biotina vitamina D compite con la vitamina D endógena en la muestra, estándar, o suero de control de calidad para un número fijo de sitios de unión en el anticuerpo anti vitamina D. Después de una etapa de lavado, la vitamina D-biotina unido fue detectada con estreptavidina-HRP. Estreptavidina-HRP inmunológicamente unido al pozo disminuye progresivamente a medida que la concentración de vitamina D en los aumentos de muestras. A continuación se retira el conjugado no ligado SA-HRP y los pocillos que se lavan. A continuación, se añade una solución de TMB que se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, lo que resulta en el desarrollo del color azul. El desarrollo de color se detuvo con la adición de solución de parada, y la absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm. Una curva estándar se obtiene mediante el trazado de la concentración de la estándar 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 2,5 horas.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Placa de micropozos recubiertos con anti-vit. D	12x8x1
2. Estándares de vit. D: 7 viales (listos para su uso)	0.5 ml
3. Controles: 2 viales (listos para su uso)	0.5 ml
4. Solución Biotina-25(OH) D (51x)	0.55 ml
5. Diluyente del ensayo: 1 bote	24 ml
6. Estreptavidina –HRP: 1 bote	23 ml
7. Solución de paro	12 ml
8. Sustrato TMB: 2 botes	12 ml
9. Solución de lavado 20X	25 ml

## MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Pipetas de precisión.
2. Puntas de pipeta desechables.
3. Lector de ELISA capaz de leer absorbancia 450nm.
4. Mezclador Vórtex de cabeza plana.
5. Agitador de platina.
6. Papel cuadrulado.

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Almacene el equipo entre 2° - 8° C. Mantenga las tiras de pocillos selladas en la bolsa de aluminio. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.

## RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Muestras de plasma suero, plasma heparinizado o EDTA pueden ser utilizados para el ensayo.

- Para el suero, recoja la sangre por punción venosa y permita la coagulación.

- En cuanto al plasma, mezcle la muestra mediante una inversión suave antes de la centrifugación.

Centrifugue y separe el suero o plasma tan pronto como sea posible después de la recolección. No utilice muestras hemolizadas. Las muestras se pueden refrigerar entre 2-8 °C durante dos semanas. Para el almacenamiento a largo plazo, se pueden almacenar a 20°C. Evite los ciclos de congelación-descongelación. Permita que las muestras refrigeradas o congeladas-descongeladas alcancen la temperatura ambiente durante 30 minutos antes de usarla.

## PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. 51X biotina conjugado: Prepare la solución de trabajo 1X a la 1:51 con el diluyente de muestra (por ejemplo, 0.1 ml biotina conjugado concentrado de vitamina a 5 ml de diluyente de muestra)
2. Prepare Solución de lavado 1X añadiendo el contenido de la botella (25 ml, 20X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conserve a temperatura ambiente (18-26° C).

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

**Todos los reactivos y muestras deben alcanzar la temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben ser mezclados suavemente sin formar espuma.**

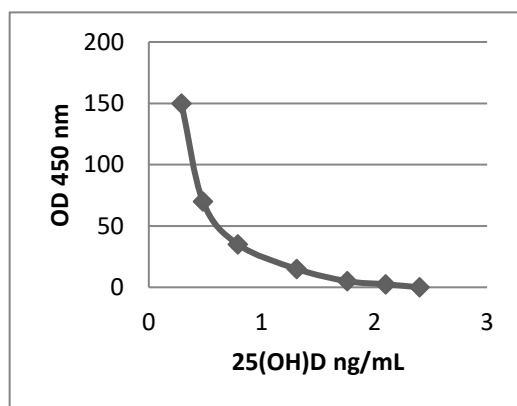
1. Dispense 10µl de estándar 25-(OH) D, controles y muestras en cada pocillo, como es requerido.
2. Dispense 200µl de solución de trabajo de reactivo biotina 25-(OH), en cada pocillo.
3. Cubra la placa y proceda a mezclar el contenido en los pozos durante 20 segundos utilizando un agitador de placas a 200 RPM (o movimiento equivalente).
4. **INCUBACIÓN # 1** – Incubar la placa sellada durante 90 minutos a temperatura ambiente.
5. Retire con cuidado el sello de la placa.
6. Sacuda energicamente el contenido de los pocillos en un depósito de residuos.
7. **LAVADO # 1** - Dispense 300 µl de solución de lavado 1X a cada pocillo, y después agite energicamente la solución de lavado 1X dentro de un depósito de residuos. Golpee los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales. Repita 2 veces más.

8. Dispense 200 µl de conjugado enzimático (estreptavidina-HRP) en cada pocillo.
9. **INCUBACIÓN # 2** - Incube durante 30 minutos, a temperatura ambiente.
10. Sacuda enérgicamente el contenido de los pocillos en un depósito de residuos.
11. **LAVADO # 2** - Dispense 300 µl de solución de lavado 1X a cada pocillo, y después agite enérgicamente la solución de lavado 1X dentro de un depósito de residuos. Golpee los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales. Repita 2 veces más.
12. Dispense 200 µl de sustrato de TMB en cada pocillo.
13. **INCUBACIÓN # 3** - Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente, preferentemente en la oscuridad.
14. Dispense 50 µl de solución de paro en cada pocillo para detener la reacción enzimática.
15. Lea la absorbancia en un lector de ELISA a 450 nm dentro de los 10 minutos de la adición de la solución paro.

### CALIBRACIÓN

Se necesitan siete niveles de calibración para cada ejecución.

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



### CONTROL DE CALIDAD

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

### RESULTADOS

Los resultados se expresan en ng/ml. Nota: Las muestras con valores superiores a 140ng/ml deben ser reportados como > 140 ng/ml.

### LIMITACIONES DEL ENSAYO

1. Materiales biológicos peligrosos potenciales:  
La Norma contiene componentes de origen humano que han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B y de anticuerpos del VIH con reactivos con licencia del FDA. Sin embargo, como no existe un método de prueba que pueda ofrecer completa seguridad de ausencia de virus de la Hepatitis B VIH u otros agentes infecciosos, estos reactivos deben ser manipulados en el nivel 2 de bioseguridad, según se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades/Institutos Nacionales de la Salud manual "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos." 1984.
2. Este kit está diseñado para uso en investigación. No debe utilizarse en los procedimientos de diagnóstico.
3. No pipetear con la boca. No fumar, comer o beber en las áreas en las que las muestras o los reactivos del kit.
4. Los componentes de este kit están pensados para su uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben ser mezclados.
5. Se recomienda que las muestras estándares, de control y de suero se realicen por duplicado.
6. Los resultados óptimos se obtienen por el estricto cumplimiento de este protocolo. El pipeteado exacto y preciso, así como seguir los requisitos exactos de tiempo y temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

### RANGO DE REFERENCIA

Se recomienda que cada laboratorio establezca el rango de los valores normales que corresponde a la población de su región.

Nivel	Rango ng/mL
Deficiente	< 10
Insuficiente	10-30
Suficiente	30-100
Intoxicación	>100

### REFERENCIAS

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