

## *Immunoensayo de la Enzima para la Determinación Cuantitativa de la 25-Hidroxi (25-OH) Vitamina D en Muestras de Suero*

**Solo para diagnóstico In Vitro**  
**Para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete**  
**Conservar entre 2°C a 8°C**

### NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de 25(OH)D

### USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de la 25-hidroxi vitamina D en muestras de suero humano.

### INTRODUCCIÓN

La vitamina D es una hormona esteroidea implicada en la absorción intestinal de calcio activo 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 es hidroxilada en el 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 de la situación general de la vitamina D de un individuo. La deficiencia de vitamina D ha sido vinculada a muchas enfermedades como la osteoporosis, raquitismo, osteomalacia, cáncer y enfermedades cardiovasculares. Ambos suplementos dietéticos de la vitamina D están actualmente disponibles en el mercado (vitamina D2 y vitamina D3), los cuales se convierten en la 25-OH vitamina D en el hígado. La suma de los las concentraciones de 25-OH vitamina D2 y 25-OH vitamina D3, en suero o plasma, se refiere como "Total 25-OH vitamina D". El control preciso del nivel total de 25-OH vitamina D es esencial para entornos clínicos. En pacientes con deficiencia de vitamina D que se prescriben un suplemento diario de vitamina D deben revisar constantemente su suero o plasma de los niveles de vitamina D con el fin de alcanzar un nivel óptimo y evitar que su concentración de 25-OH vitamina D alcance niveles excesivos considerados tóxicos.

### PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Este kit es un inmunoensayo ligado a enzima en fase solida (ELISA), basada en el principio de unión competitiva. Los pocillos recubiertos con anti-vitamina D se incuban con estándares de vitamina D, controles, muestras y conjugado de vitamina D-Biotina a temperatura ambiente durante 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad fija de biotina marcada con 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 del ciclo de lavado es ligada y detectada la vitamina D-Biotina con la estreptavidina-HRP- El conjugado estreptavidina-HRP es inmunológicamente unido al pocillo y disminuye progresivamente a medida que la concentración de vitamina D aumenta en las muestras. El conjugado SA-HRP no unido se retira a continuación y los pocillos son lavados. Posteriormente, una solución de TMB se añade y se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos, lo que resulta en el desarrollo de un color azul. El desarrollo de color se

detiene con la adición de la solución de paro, y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450 nm. Se obtiene una curva estándar debido a la concentración de los estándares frente a la absorbancia. La intensidad de color es inversamente proporcional a la cantidad de 25(OH) D en la muestra. El ensayo mide tanto la vitamina D2 y la vitamina D3. El tiempo de procedimiento completo del ensayo es de 2.5 horas.

### REACTIVOS

#### **Materiales abastecidos con el equipo de prueba**

1. Placa de microtira revestida con anti-vitamina D con 96 pozos
2. Juego de estándares de vitamina D (listo para su uso)
3. Juego de controles de vitamina D (listo para su uso)
4. Reactivo conjugado biotina 25 (OH) D. (51x)
5. Diluyente de ensayo
6. Estreptavidina-HRP (listo para su uso)
7. Solución de paro (listo para su uso)
8. Substrato TMB (listo para su uso)
9. Cubierta adhesiva
10. Buffer concentrado de lavado 20x
11. Instructivo

#### **Materiales requeridos pero no abastecidos**

1. Pipetas de precisión
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Mezclador Vórtex o equivalente.
4. Papel absorbente o toalla de papel
5. Papel cuadriculado
6. Un lector de MicroElisa.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Posibles materiales biopeligrosos: Todos los productos que contienen componentes de fuente humana han sido probados con reactivos con licencia del FDA y no se han encontrado reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B así como del anticuerpo contra HIV. Sin embargo, ya que no existe un método de prueba que pueda ofrecer un aseguramiento completo que el HIV, el virus de Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén ausentes, estos reactivos deben ser manejados al Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades/Institutos Nacionales del manual de Salud, "Bioseguridad en Laboratorios Microbiológicos y Biomédicos." 1984.
2. Este kit está diseñado para la cuantificación de 25-OH Vitamina D Total, en suero humano.
3. No utilice la pipeta oralmente. No fume, coma, ni beba en las áreas en las cuales los especímenes o los reactivos del equipo de prueba están manejándose.
4. Los compuestos en este equipo de prueba están destinados para su uso como una unidad integral. Los compuestos de lotes diferentes no deben ser mezclados.
5. Se recomienda que los estándares, controles y muestras de pacientes se corran por duplicado.
6. Los resultados óptimos se obtienen por la adhesión estricta a este protocolo. El pipeteado preciso y exacto, tiempos exactos y los re-



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

#### **Distribuido por:**

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.  
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria  
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México  
**Lada sin costo:** 01 800 440 0404 c/ 10 líneas  
**Tel:** 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

quisitos de la temperatura prescrita son esenciales. Cualquier desviación de esto puede producir datos no válidos.

### RECOLECCIÓN DEL ESPÉCIMEN Y MANEJO

Muestras de suero, plasma heparinizado o con EDTA se pueden utilizar para el ensayo.

- Para suero: recoger la sangre total por punción venosa y permitir la coagulación.
- Para plasma: mezclar la muestra gentilmente por inversión antes de la centrifugación.

Centrifugar y separar 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, pueden ser almacenadas a -20 °C. Evitar repetidos ciclos de congelación y descongelación. Dejar que las muestras refrigeradas o congeladas-descongeladas alcancen temperatura ambiente durante 30 minutos antes de su uso, las muestras se deben mezclar bien antes del análisis.

### PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Estándares y Reactivos: Los estándares son basados en suero y soluciones estables cuando se almacenan a -2-8 °C hasta la fecha de vencimiento en la etiqueta. Equilibrar el volumen necesario de estándares y reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
2. Conjugado biotina 51x: Inmediatamente antes de su uso, preparar la solución de trabajo 1x a 1:51 con el diluyente de ensayo (por ejemplo, añadir 0.1 mL de la vitamina D-biotina conjugada concentrada a 5 mL de diluyente de ensayo). *El diluyente de ensayo restante debe ser almacenado entre 2-8°C en la oscuridad y cerrado herméticamente.*
3. Preparar buffer de lavado 1x añadiendo el contenido de la botella (25 mL, 20x) a 475 mL de agua destilada o desionizada. Conservar a temperatura ambiente (18-24 ° C).

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

*Todos los reactivos y las muestras se debe permitir que lleguen a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben ser cuidadosamente mezclados sin formación de espuma. Una vez que el procedimiento ha comenzado, todos los pasos deben llevarse a cabo sin interrupción.*

1. Dispense 10 µL de estándares, controles y muestras en los pozos apropiados.
2. Dispense 200 µL de reactivo solución de trabajo biotina 1x 25(OH) D en cada pozo.
3. Cubra la placa con la cubierta adhesiva y mezcle perfectamente el contenido en los pozos por 20 segundos utilizando un mezclador de placas a 200 - 400 RPM (o movimiento equivalente)
4. **INCUBACIÓN #1** – Remueva del mezclador de placas e incube por 90 minutos a temperatura ambiente.
5. Retire con cuidado la cubierta adhesiva de la microplaca
6. Vacíe el contenido de los pozos en un contenedor para desechos
7. **LAVADO #1** – Dispensar 300 µL de Buffer de lavado 1X en cada pozo, vacíe el contenido en un contenedor para desechos. Repita dos veces más, para un total de 3 lavados. Seque perfectamente en un papel absorbente.
8. Dispense 200 µL de enzima conjugada (estreptavidina-HRP) en cada pozo
9. **INCUBACIÓN #2** – Incube por 30 minutos, a temperatura ambiente.
10. Vacíe el contenido de los pozos en un contenedor para desechos.
11. **LAVADO # 2** – Dispensar 300 µL de Buffer de lavado 1X en cada pozo, vacíe el contenido en un contenedor para desechos. Repita

dos veces más, para un total de 3 lavados. Seque perfectamente en un papel absorbente.

12. Utilizando una pipeta multicanal, dispense 200 µL de Substrato TMB en cada pozo.
13. **INCUBACIÓN #3** – Incubar 30 minutos a temperatura ambiente, preferentemente en la oscuridad.
14. **STOP** – Dispense 50 µL de solución de paro en cada pozo para detener la reacción enzimática. Mezcle cuidadosamente el contenido de la placa durante 20 - 30 segundos.
15. Lea la absorbancia en un lector de ELISA a 450 nm durante los primeros diez minutos de añadir la solución de paro

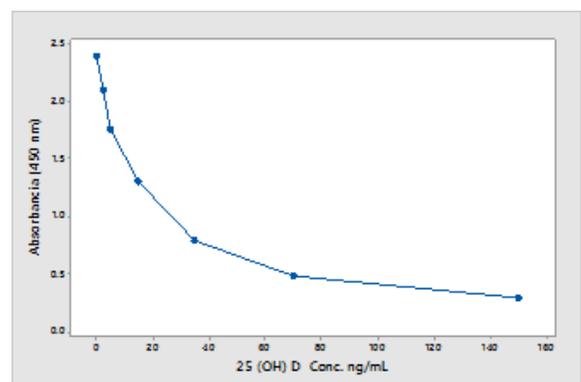
### CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcule el valor de absorbancia media ( $A_{450}$ ) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en ng/mL sobre un papel cuadrícula, con valores de absorbancia sobre el eje Y o vertical y las concentraciones sobre el eje X u horizontal.
3. Utilizando los valores de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de 25 (OH) VITAMIN D EIA en ng/mL desde la curva estándar.

### EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450 nm mostradas en el eje (Y) contra las concentraciones de 25-OH VITAMIN D mostradas en el eje (X). Esta curva estándar es con el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.

25(OH)D (ng/mL)	Absorbancia (450 nm)
0.0	2.214
2.5	1.920
5.0	1.683
15.0	1.137
35.0	0.737
70.0	0.425
150.0	0.267



## CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

### PRECISIÓN

#### Intra-ensayo

Suero	No. Replicas	Media ng/mL	SD	CV (%)
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. Replicas	Media ng/mL	SD	CV (%)
1	10	7.9	0.36	4.55
2	10	23.4	1.63	6.95
3	10	37.6	2.02	5.38

### SENSIBILIDAD

La sensibilidad de este kit es 0.67 ng/mL. La sensibilidad fue determinada calculando la media de 2SD del estándar cero en una corrida con 20 repeticiones.

### RANGOS DE REFERENCIA

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus valores normales correspondientes a la población de su región. Sin embargo, hasta que se establezcan dichos rangos específicos locales, las siguientes referencias de la literatura que se muestran pueden utilizarse.

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

### CONTROL DE CALIDAD

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

### RESULTADOS

Los resultados son expresados en ng/mL.

*Nota: Para convertir en nmol/L, multiplicar los resultados por 2.5. Ejemplo: 10ng/mL = 25 nmol/L*

### 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.

**Diagnóstica**  
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

**FABRICADO POR:**  
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS  
1155 CHESS DRIVE No. 121  
FOSTER CITY, CA 94404 USA