Determinazione quantitativa della 25-OH Vitamina D nel siero o nel plasma. Metodo immunoturbidimetrico, reagente al lattice.

REF TB1230 R1: 1x40 mL+ R2: 1x10 mL

PRINCIPIO DEL METODO

Test diretto mediante reazione immuno turbidimetrica. La Vitamina D è liberata dal legame con le proteine e reagisce con un anticorpo specifico coattato su particelle di lattice. La reazione di agglutinazione che ne deriva è direttamente proporzionale alla quantità di Vitamina D presente nel campione ed è misurabile fotometricamente alla lunghezza d'onda di 700 nm. Utilizzando un set di calibratori a concentrazione nota, è possibile costruire una curva di calibrazione su cui interpolare i campioni incogniti.

SIGNIFICATO CLINICO

La Vitamina D è un ormone steroideo coinvolto nell'assorbimento intestinale di calcio e nella regolazione della sua omeostasi.

La Vitamina D ha due forme: Vitamina D2 e Vitamina D3. La Vitamina D2 è introdotta nell'organismo per via alimentare (prodotti caseari) mentre la vitamina D3 è prodotta nella pelle dopo esposizione alla luce ultravioletta (luce solare). Nel fegato, la Vitamina D è idrossilata al suo atomo di carbonio 25 per formare la 25-OH Vitamina D. Questo metabolita è la forma circolante predominante di Vitamina D ed è considerato un indicatore accurato dello stato generale della Vitamina D di un individuo. La carenza di Vitamina D è stata collegata a molte malattie tra cui l'osteoporosi, il rachitismo e l'osteomalacia. La somma delle concentrazioni di 25-OH Vitamina D2 e 25-OH Vitamina D3, nel siero o nel plasma, è indicata come 25-OH Vitamin D Totale il cui monitoraggio accurato del livello ematico è determinante in numerosi contesti clinici.

I segni precoci di carenza di 25-OH Vitamina D sono la riduzione sierica di calcio e fosforo, l'iperparatiroidismo secondario e l'aumento della fosfatasi alcalina nel siero.

I segni più tardivi sono l'inadeguata mineralizzazione dello scheletro (rachitismo nei bambini, osteomalacia negli adulti), la debolezza muscolare, i dolori addominali.

Il rachitismo compare nei bambini tra i 4 e i 24 mesi di età e consiste fondamentalmente in una inadeguata mineralizzazione dell'osso in crescita, che comporta deformazioni dello scheletro.

L'osteomalacia si manifesta negli adulti con debolezza muscolare, dolori a livello del tratto dorso-lombare della colonna vertebrale, della cintura pelvica e delle cosce, fragilità ossea, densità ossea estremamente bassa e presenza di pseudo-fratture.

L'ipervitaminosi (eccesso di Vitamina D) determina un aumentato assorbimento intestinale e riassorbimento osseo del calcio, ipercalcemia, con concomitante diminuzione del PTH sierico (paratormone), nausea, vomito e diarrea, ipercalcemia e ipercalciuria, nefrocalcinosi, cardiocalcinosi e calcificazione dei tessuti molli.

L'eccessiva assunzione di Vitamina D con la dieta è estremamente improbabile, tenuto conto della sua ridotta quantità negli alimenti, così come non si conoscono casi di ipervitaminosi dovuta ad eccessiva esposizione al sole. È invece possibile intossicazione in seguito a somministrazione di calciferolo a scopo terapeutico.

COMPOSIZIONE DEI REAGENTI

R 1 (Tampone):

Tampone Fosfato (PBS) < 100 mmol/L

R 2 (Anticorpo):

Anticorpo policlonale anti Vitamina D adsorbito su particelle di lattice.

PREPARAZIONE E STABILITA' DEI REAGENTI

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta. Non congelare i reagenti. Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come il mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati. Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riporli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione. Prima dell'utilizzo, agitare i reagenti delicatamente per inversione evitando formazione di schiuma.

CAMPIONI

Siero fresco e privo di emolisi. Plasma da EDTA o eparina.

Evitare campioni emolizzati o lipemici. Separare il siero dal coagulo rapidamente. Effettuare un solo scongelamento. Stabilità: 7 giorni a 2-8° C, 3 mesi a -20° C. Prima di analizzare un campione conservato in frigo, attendere che esso si riporti spontaneamente a temperatura ambiente.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda: 700 nm
Temperatura: +37°C
Azzeramento: acqua distillata

Pipettare come segue:

Reagente (R1)	400 µL
Campione /Calibratore	10 µL
Miscelare ed attendere 4 minuti, poi aggiungere:	
Reagente (R2)	100 µL

Miscelare e dopo 30 secondi misurare la Assorbanza (Abs1).

Dopo altri 360 secondi leggere ancora l'Assorbanza (Abs2).

Calcolare il ΔAbs ($Abs2 - Abs1$) per campioni, controlli e calibratori.

CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

Utilizzare il seguente materiale di calibrazione (disponibile separatamente):

VITAMIN D CALIBRATION SET – REF: TUC1085 (5 x 1 mL)

un set di calibrazione composto da flaconi di calibratori pre diluiti, liquidi e pronti all'uso, con esatto valore indicato in etichetta.

CALCOLO

Calcolare per ogni campione in esame e per ogni calibratore il ΔAbs ($Abs2 - Abs1$). Costruire una curva di calibrazione (ΔAbs contro concentrazioni dei singoli calibratori) e su di essa riportare i valori del ΔAbs ($Abs2 - Abs1$) dei campioni in esame per ricavare le concentrazioni. Per calcoli automatici (previsti dagli analizzatori automatici), il metodo di elaborazione dati consigliato è la Curva SPLINE ma altri metodi possono essere utilizzati (Punto-Punto, Logit-Log 4P, etc.).

Fattore di Conversione: 1 nmol/L = 1 ng/mL x 2,5

CONTROLLO QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici a concentrazione nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Utilizzare il seguente prodotto MTD Diagnostics:

Vitamin D Control Set 2 Levels - REF: TUC1090 (2 x 1 mL)

Il range dei valori dei controlli deve essere valutato come una linea guida potendo esso essere determinato dall'applicazione del metodo o dalla manualità dell'utente o da altri fattori. I valori ottenuti devono essere utilizzati ai fini della valutazione della Precisione del metodo (Ripetibilità). Per la valutazione della Accuratezza del metodo (Riproducibilità) è necessario aderire ad un programma di Valutazione Esterna Qualità (VEQ) gestito da enti certificati.

VALORI DI RIFERIMENTO BIBLIOGRAFICI

Carenza:	< 10 ng/mL
Insufficienza:	10 – 30 ng/mL
Sufficienza:	30 – 100 ng/mL
Tossicità:	> 100 ng/mL

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 21,7; D.S. = 0,9; CV = 3,9%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 117,6; D.S. = 2,2; CV = 1,9%

ACCURATEZZA: Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 1.062 x - 3.03 \quad r = 0.978$$

SENSIBILITA': 7,6 ng/mL

LINEARITA': da 7,6 a 147,8 ng/mL.

SPECIFICITA' / INTERFERENZE

La Bilirubina fino a 40 mg/dL, L' Emoglobina fino a 600 mg/dL, Il Fattore Reumatoide fino a 200 IU/mL, le Proteine Totali fino a 12 g/dL, i Trigliceridi fino a 1000 mg/dL non interferiscono. Altre sostanze possono interferire.

NOTE

- Questo metodo può essere utilizzato con diversi strumenti. Qualsiasi applicazione a uno strumento deve essere validata per dimostrare che i risultati soddisfano le caratteristiche di prestazione del metodo.
- Il limite di linearità dipende dal rapporto campione / reagente e dall'analizzatore utilizzato. Sarà più alto diminuendo il volume del campione, anche se la sensibilità del test sarà diminuita proporzionalmente.
- Gli anticorpi eterofili possono interferire reagendo con l'anticorpo reagente. Ciò si verifica specie in pazienti che routinariamente sono esposti ad animali o prodotti biologici di origine animale.

PRECAUZIONI

L'anticorpo presente nel reagente è di origine animale e non è in grado di trasmettere malattie infettive all'uomo. Tuttavia, poiché non ci sono metodi per garantire la totale assenza di tali agenti infettivi, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente in grado di trasmettere malattie infettive di qualsiasi tipo, in conformità con gli standard della Buona Pratica di Laboratorio.

I sieri umani presenti nei Controlli e nei Calibratori sono stati testati con metodi marcati CE e approvati FDA e sono stati trovati negativi per presenza di

HBsAg, HIV 1&2, HCV. Tuttavia, poiché non ci sono metodi capaci di assicurare la totale assenza di tali agenti infettanti o di altri microbi, questo prodotto deve essere maneggiato come se fosse rischioso e potenzialmente capace di trasmettere malattie infettive di ogni tipo, in accordo con le norme di Buona Pratica di Laboratorio.

Il prodotto non contiene sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Il prodotto non è soggetto ad etichettatura secondo le direttive CE o le corrispondenti normative nazionali. Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorché maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti.

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
REF	Numero di catalogo		Scadenza
LOT	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

- Garland, C. F. et al. The Role of Vitamin D in Cancer Prevention. *Am J Public Health*. 2006, 96(2): 252-261.
- Giovannucci, E. The epidemiology of vitamin D and cancer incidence and mortality: a review (United States). *Cancer Causes Control*. 2005, 16(2):83-95.
- Van den Bermd, G. J., Chang, GT. Vitamin D and vitamin D analogs in cancer treatment. *Curr Drug Targets*. 2002, 3(1):85-94.
- Danik, J. S., Manson J. E. Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2012, 14(4): 414-424.
- Reid I. R.; Bolland M. J. Role of Vitamin D Deficiency in Cardiovascular Disease. *Heart*. 2012, 98(8):609-614.
- Bikle D. D. Vitamin D and the skin. *J. Bone Miner. Metab*. 2010, 28, 117-30.
- Moyad M. A. Vitamin D: a rapid review. *Dermatol Nurs.*, 2009, 21: 25-30.