

---

## TRABAJO ORIGINAL

---

# Controversias en la medición de 25 (OH) Vitamina D: comparación de dos metodologías

## Controversies in measuring 25 (OH) Vitamin D: comparison of two methodologies

Bordallo C.F., Saavedra M.S.

Bioquímica Especialista en Bioquímica Clínica, Área Endocrinología, UBA. Laboratorio del Centro Gallego de Buenos Aires

---

### RESUMEN

**Introducción:** Los métodos utilizados para la medición de Vitamina D tienen varios aspectos metodológicos sin definir: método de referencia, trazabilidad con estándar internacional, especificidad, etc.; situación que genera grandes controversias entre los resultados obtenidos.

**Objetivo:** Comparar los resultados de la medición de Vitamina D con dos inmunoensayos de diferente especificidad y estandarización, y su impacto en la interpretación clínica de los mismos en individuos no tratados y tratados con Vitamina D<sub>2</sub> o D<sub>3</sub>.

**Materiales y Métodos:** Para la comparación de los métodos se consideraron dos grupos: G1 (95 muestras de suero de pacientes algunos de los cuales recibían Vitamina D<sub>2</sub>, otros Vitamina D<sub>3</sub> y otros sin medicación) y G2 (40 muestras de suero luego de excluir a los 55 pacientes que recibían Vitamina D<sub>2</sub>).

**Resultados:** Al analizar las medias de los resultados obtenidos por cada método, se hallaron diferencias altamente significativas ( $p < 0.0001$ ) en G1 y diferencias significativas ( $p < 0.0038$ ) en G2. Cuando se compararon los resultados de EQLIA vs RIE, no se halló correlación ( $r = -0,00671$ ;  $p = 0,9483$ ) en G1 pero sí en G2. ( $r = 0.898$ ,  $p < 0.0000$ ). Si bien en G1 se halló concordancia entre los resultados de los métodos se observa gran dispersión de los mismos (media 20,8 ng/ml). En cambio en el G2 se observa una mejor concordancia entre ellos (media 6.4 ng/ml).

**Conclusiones:** Esta comparación de métodos nos permitió identificar las dos situaciones críticas que debemos considerar cuando nos solicitan la medición de Vitamina D: primero la condición del paciente en cuanto a si ha sido o no suplementado con Vitamina D y en ese caso si se le administró D<sub>2</sub> o D<sub>3</sub> y segundo: el método a emplear para su determinación. Las discrepancias entre los resultados de vitamina D obtenidos por diferentes metodologías impactarán en la utilidad clínica del informe emitido por el laboratorio y consecuentemente en la interpretación y decisión médica. **Rev Argent Endocrinol Metab 48: 69-77, 2011**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés

**Palabras clave:** 25 (OH) vitamina D<sub>3</sub>, vitamin D, medición de vitamina D

### ABSTRACT

**Introduction:** The methods used for vitamin D measurement have several methodological aspects still not defined, such as reference method, traceability of international standard, specificity, etc, which generates great discrepancies between the results obtained. **Objective:** To compare the results of vitamin D measurements obtained with two different immunoassays of different specificity and standardization, and their impact on clinical interpretation in patients treated and not treated with vitamin D<sub>2</sub> or D<sub>3</sub>.

**Materials and Methods:** Two groups are considered for comparison of the methods: G1 (95 serum samples from patients who were receiving vitamin D<sub>2</sub>, vitamin D<sub>3</sub> or no medication) and G2 (40 serum samples after excluding the 55 patients who received vitamin D<sub>2</sub>).

**Results:** There are great differences between the samples measured by both assays. We found highly significant differences between means in G1 ( $p < 0.0001$ ) and significant differences in G2 ( $p < 0.0038$ ). No cor-

relation was observed between EQLIA vs. RIA in the G1 ( $r = -0.00671$ ,  $p = 0.9483$ ) but good correlation in G2. ( $r = 0.898$ ,  $p < 0.0000$ ). Although ECLIA was in agreement with RIA, in G1 the results of the methods shows a wide dispersion around the mean of the difference 20.8 ng / ml. In contrast, in G2 there is a better match between results (mean of the difference 6.4 ng/ml).

**Conclusions:** This comparison of methods allowed us to identify two critical situations to consider when measuring vitamin D: first, whether the patient has been supplemented or not with Vitamin D, and in that case, if he/she has been given  $D_2$  or  $D_3$ , and secondly, the method used for measurement.

Discrepancies between the results of vitamin D measurements obtained by different methodologies will impact on the clinical usefulness of the report issued by the laboratory, and consequently in the interpretation and medical decision. **Rev Argent Endocrinol Metab 48: 69-77, 2011**

No financial conflicts of interest exist.

**Key words:** 25 (OH)vitamina D3, vitamin D, measurement of vitamin D

## INTRODUCCIÓN

La vitamina D fue considerada “*el nutriente de la década*” en el año 2008<sup>(1)</sup> no solo por su clásica acción en el metabolismo óseo y fosfocálcico, sino además por su rol en la proliferación y maduración celular, y la asociación de su deficiencia a un aumento de riesgo de cáncer de mama, colon, próstata y de enfermedades autoinmunes.

Según Hollick: “la deficiencia de Vitamina D podría ser más prevalente en la población de lo que uno pensaría, como resultado de un inesperado y marcado aumento del número de mediciones de 25(OH)D realizadas en los laboratorios clínicos”<sup>(2)</sup>. En la literatura se hace referencia a esta situación de déficit de vitamina D en poblaciones de riesgo, por ejemplo ancianos y niños, midiendo vitamina D con diferentes metodologías hallando en algunos casos resultados discrepantes entre sí. La pregunta que surge es: ¿Cuál es el método, si lo hay, más adecuado para medir los niveles de Vitamina D?

El mayor problema para su medición deriva de la molécula en sí: por su carácter hidrofóbico, su unión a la proteína de transporte (DBP) y porque existe en dos formas, la  $25(OH)D_2$ <sup>(3)</sup> y  $25(OH)D_3$ <sup>(4)</sup>, sin contar las otras moléculas relacionadas por ej.:  $1,25(OH)_2D_2$ ,  $1,25(OH)_2D_3$ ,  $24,25(OH)_2D_3$ , todos compuestos insolubles en agua. Tabla I.

Hace casi cuatro décadas que comenzaron a desarrollarse los métodos para su medición, una breve reseña de los mismos nos permitirá entender las dificultades metodológicas actuales.

1971: Haddad<sup>(5)</sup> desarrolló un ensayo de unión competitivo (CPBA) usando a la proteína ligadora de la vitamina D (DPB) como agente primario de unión y  $^3H-25(OH)D_3$  como trazador. Su uso se limitó solo a laboratorios de investigación. Los CPBA tienen serios problemas analíticos por el “efecto matriz” que puede alterar la unión a la

DPB (se usaban extractos etanólicos) y la necesidad de realizar una cromatografía previa de purificación. Los CPBA reconocen la  $25(OH)D_2$  y  $25(OH)D_3$ , es decir miden Vitamina D total.

1977: Eisman<sup>(6)</sup> introdujo un método de HPLC directa con detección UV, que habitualmente no está al alcance de los laboratorios clínicos.

1985: Hollis<sup>(7)</sup> obtuvo un anticuerpo coespecífico para  $25(OH)D_2$  y  $25(OH)D_3$  y desarrolló un método de extracción simple seguido de una cuantificación no cromatográfica.

1992: Este método es modificado incorporando  $^{125}I$  como trazador y calibradores diluidos en matriz de suero. Se comercializa como el RIE-Marca Diasorin<sup>(8)</sup>.

2001: Nichols Diagnostic introdujo el método ADVANTAGE. Se trataba de un CPBA, que no requiere extracción previa, y usa como ligante a la DBP<sup>(9)</sup>. A pesar de que según su fabricante reconocía a la  $25(OH)D_2$  y  $25(OH)D_3$ , solo tenía capacidad de reconocer a la  $25(OH)D_3$ <sup>(10)</sup>. La compañía lo retiró del mercado en el año 2006.

2004: se postuló a la espectrometría de masa asociada a cromatografía gaseosa o líquida (MS-GC/LC), como el método más exacto para su cuantificación<sup>(11)</sup>. Este método es el elegido por varios laboratorios de referencia, pero no está estandarizada ni la preparación de los reactivos ni de los estándares utilizados, por lo cual esto también lleva a discrepancias en los resultados hallados entre laboratorios. Se ha demostrado que la MS-LC no es capaz de discriminar entre la  $25(OH)D_3$  y su isómero el 3-epi- $25(OH)D_3$ , sin actividad biológica pero que está presente en la circulación de los niños recién nacidos<sup>(12)</sup>. Este método requiere de personal capacitado y no es el más adecuado para el uso en el laboratorio asistencial

2004: Diasorin Corporation introdujo el LIAISON 25(OH)D Total<sup>(13)</sup>, que es un método quimio-

TABLA I. Compuestos relacionados a la Vitamina D, origen y actividad biológica

Molécula	Origen	Acción Biológica
Vitamina D	Provitamina liposoluble del grupo de los esteroides. Éste nombre se dio a dos sustancias relacionadas: D <sub>3</sub> y D <sub>2</sub> . Vitamina D <sub>3</sub> o colecalciferol: Se sintetiza en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol (provitamina D <sub>3</sub> ). El colecalciferol es la forma fisiológica de la Vitamina D en los seres humanos, constituye el 98 % del total de Vitamina D en el organismo. Vitamina D <sub>2</sub> o ergocalciferol: De origen vegetal o que se produce artificialmente por irradiación del ergosterol (provitamina D <sub>2</sub> ), y puede utilizarse como suplemento.	No
25(OH) Vitamina D <sub>3</sub>	Marcador de estado nutricional; su concentración es el índice más fiable para definir déficit, insuficiencia o suficiencia de vitamina D. Se origina en hígado (y también otros tejidos), donde ocurre el primer paso de activación, hidroxilación en el C 25, por acción de la enzima mitocondrial p450C27 (CYP27A1).	No
1,25(OH) <sub>2</sub> Vitamina D <sub>3</sub>	Hormona: Se forma, a partir de la 25(OH)D <sub>3</sub> en el riñón por acción de la 1α hidroxilasa (CYP27B1 o CYP1α), Paso limitante para la bioactivación de la Vitamina D y es el que está estrechamente regulado por PTH, Ca, P y la propia 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> . La síntesis extrarrenal de 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> se estimula por influencia de citoquinas (interferón γ y TNF preferentemente) más que por la PTH, y resulta poco inhibida por el calcio y el fósforo. La normal función de la CYP1α extrarrenal explica la importante regulación autocrina y paracrina de la 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> producida localmente.	Sí
24,25(OH) <sub>2</sub> y 1,24,25(OH) <sub>3</sub> Vitamina D <sub>3</sub>	Metabolitos inactivos Cuando la síntesis de 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> es suficiente, la enzima 25-dihidroxivitamina D 24-hidroxilasa (CYP24A1) a nivel renal es la responsable de la hidroxilación en C 24 de la 25(OH)D <sub>3</sub> y de la 1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> para formar: 24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> y 1,24,25(OH) <sub>3</sub> D <sub>3</sub> respectivamente.	No

luminiscente automatizado que a pesar de usar el mismo anticuerpo que el RIE subestimaría a la 25(OH)D<sub>2</sub><sup>(14)</sup>.

2008: Roche Diagnostic introdujo un método electroquimioluminiscente automatizado, para la medición específica de la 25(OH)D<sub>3</sub>.

Recién a partir del año 2000 comienzan a desarrollarse los métodos de medición de Vitamina D en plataformas automatizadas, destinados al uso en laboratorios clínicos. Estos presentan muchos aspectos metodológicos sin definir, por ejemplo método de referencia, estándares internacionales, trazabilidad con estándar internacional, especificidad, etc.; situación que genera grandes controversias entre los resultados obtenidos.

Esta situación hace que al revisar retrospectivamente la literatura, hallemos discrepancias entre los resultados de algunos autores, que emplean diferentes metodologías para la medición de Vitamina D. En 1984 se publicó un estudio internacional donde participaron 19 laboratorios para comparar ensayos para la medición de 25(OH)D<sub>3</sub>, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> en plasma y concluyen que: "los resultados de diferentes laboratorios no pueden ser comparables entre sí, sin hacer una comparación de sus procedimientos analíticos, y que en el caso de ser aplicados clínicamente, cada laboratorio debería establecer

sus propios valores de referencia y se debería contar, además, con una muestra de control interno para asegurar la precisión de sus procedimientos"<sup>(15)</sup>.

En el año 2008 comenzó la comercialización, en nuestro medio, de un nuevo inmunoensayo automatizado para la medición de Vitamina D de Roche Diagnóstica para su plataforma Elecsys-Cobas. Ante la posibilidad de incorporar esta medición al laboratorio, se comparó y analizó al nuevo inmunoensayo de Electroquimioluminiscencia (EQLIA) con el Radio-inmunoensayo (RIE) empleado hasta ese momento comercializado por DIASORIN.

## OBJETIVOS

Comparar los resultados de la medición de Vitamina D a través de 2 inmunoensayos con diferente especificidad y estandarización, y analizar su impacto en la evaluación clínica de individuos no tratados y tratados con Vitamina D<sub>2</sub> o D<sub>3</sub>.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se compararon los resultados de 25(OH)D medidos por RIE DIASORIN 25(OH)D Total y por EQLIA Elecsys 25(OH)D<sub>3</sub> en 95 muestras de suero de

pacientes, de los cuales 55 estaban suplementados con Vitamina D<sub>2</sub> y los 40 restantes no recibían medicación o estaban suplementados con Vitamina D<sub>3</sub>.

El ensayo RIE que mide 25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub> y otros metabolitos asociados a la Vitamina D, es un procedimiento de dos pasos: el primer paso consiste en extraer rápidamente 25(OH)D y otros metabolitos hidroxilados de suero o plasma con acetónitrilo, luego la muestra extraída se somete a un RIE competitivo en fase líquida.

La especificidad analítica de este ensayo según su fabricante se muestra en la Tabla II.

El fabricante sugiere en el inserto del producto como valor de referencia una media de 23.0 ng/ml ( $\pm$  2SD: 9-37.6 ng/ml) obtenido en una población de 44 individuos (23-67 años, 20 hombres, 24 mujeres).

El ensayo EQLIA Elecsys 25(OH)D<sub>3</sub> que utiliza un anticuerpo policlonal dirigido contra la 25(OH)D<sub>3</sub>, es un método competitivo con duración total de 18 minutos.

La especificidad analítica de este ensayo según su fabricante se muestra en la Tabla III.

**TABLA II.** Especificidad del RIE según su fabricante. Los datos sobre reactividad cruzada del antisuero utilizada en este equipo se expresan como la relación entre la concentración de 25(OH)D y la concentración de la sustancia que presente reactividad cruzada con una inhibición del 50 % de unión máxima.

	Reactividad cruzada %
Vitamina D <sub>2</sub>	0.8
Vitamina D <sub>3</sub>	0.8
25-OH-D <sub>2</sub>	100
25-OH-D <sub>3</sub>	100
24,25-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>2</sub>	100
24,25-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub>	100
25,26-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>2</sub>	100
25,26-(OH) <sub>2</sub> -D <sub>3</sub>	100
1,25-(OH)-D <sub>2</sub>	11.0
1,25-(OH)-D <sub>3</sub>	11.0

**TABLA III.** Especificidad del EQLIA según su fabricante

	Concentración analizada (ng/ml)	Reactividad cruzada %
25(OH)D <sub>2</sub>	1000	<10
24,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1000	<20
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	100	Hasta 100
Colecalciferol(Vitamina D <sub>3</sub> )	5000	<1
Ergocalciferol(Vitamina D <sub>2</sub> )	5000	<1

Los Valores de referencia de este método están definidos como: Valores consensuales mínimos para la 25(OH)D<sub>3</sub> de 20-32 ng/ml y concentración deseable en estado general de salud  $\geq$  30 ng/ml.

**Estadística:** Los valores de 25(OH)D mostraron una distribución no gausseana, por lo cual se aplicaron Tests no paramétricos: Test de Mann-Whitney para muestras independientes. Coeficiente de Correlación de Spearman y Comparación de métodos por Bland & Altman. Se considera diferencia significativa una  $p < 0.05$ . Programa MedCalc, versión 9.6.

## RESULTADOS

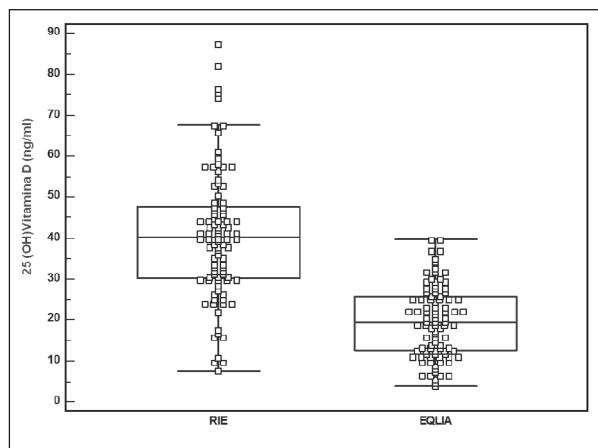
Para la comparación de los métodos se consideraron dos grupos: G1 (95 muestras de suero de pacientes algunos de los cuales recibían Vitamina D<sub>2</sub>, otros Vitamina D<sub>3</sub> y otros sin medicación) y G2 (40 muestras de suero luego de excluir a los 55 pacientes que recibían Vitamina D<sub>2</sub>).

Los resultados hallados de 25 (OH) vitamina D medidos por EQLIA y RIE en los dos grupos se resumen en la Tabla IV. Al comparar las medias obtenidas por cada método, se hallaron diferencias altamente significativas ( $p < 0.0001$ ) en el G1, y diferencias significativas ( $p < 0.0038$ ) en el G2. (Gráficos 1 y 2).

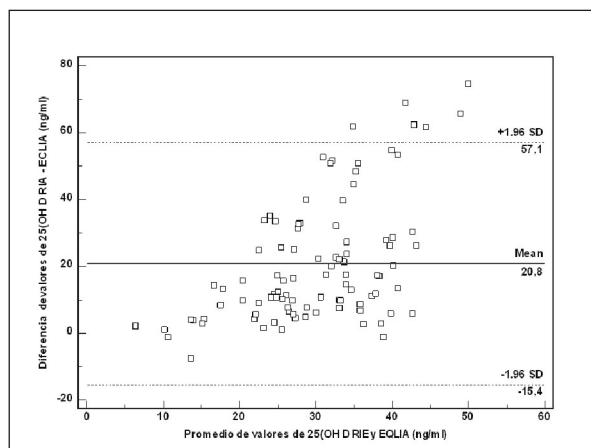
Cuando se compararon los métodos en muestras correspondientes al G1, no se halló correlación ( $r: -0,00671$ ;  $p = 0,9483$ ) (Gráfico 3). En este gráfico se pueden observar 3 grupos de datos: valores de 25(OH)D altos por RIE y bajos por EQLIA, que corresponderían a los pacientes tratados con Vitamina D<sub>2</sub>, valores de 25(OH)D bajos por RIE y EQLIA, que serían de los pacientes deficientes sin suplementación y por último valores de 25(OH)D por RIE y EQLIA por encima de 20 ng/ml que se corresponderían a los pacientes insuficientes/suficientes o suplementados con Vitamina D<sub>3</sub>.

**TABLA IV.** Resultados de Vitamina D medida por RIE y por EQLIA en G1: todos los pacientes (n=95) y en G2: pacientes sin suplementación o suplementados con Vitamina D3

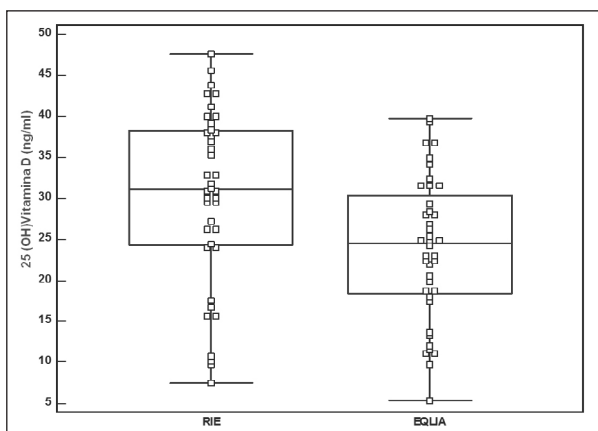
25(OH) Vitamina D	N	Media	SD	Mediana	Mín.	Máx.
G1-RIE	95	40,4	15,86	40,1	7,4	87,3
G1-EQLIA	95	19,6	8,67	19,3	3,9	39,7
G2-RIE	40	30,2	10,66	31,1	7,4	47,5
G2-EQLIA	40	23,9	8,72	24,6	5,3	39,7



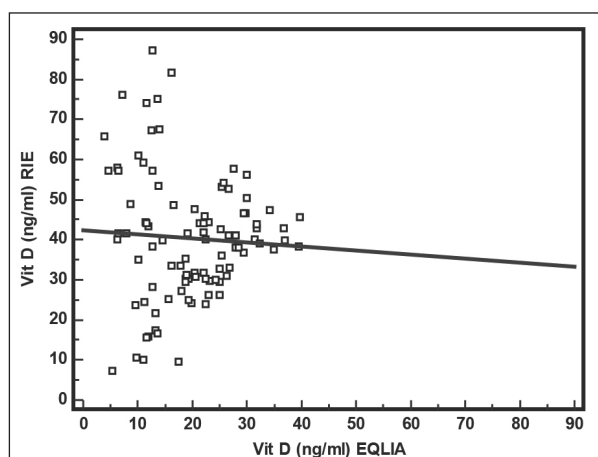
**Gráfico 1.** Comparación de niveles de 25(OH)D ( ng/ml), medidos por RIE vs. EQLIA en el Grupo 1, hallándose diferencias altamente significativas ( $p < 0.0001$ ;  $n = 95$ )



**Gráfico 4.** Comparación de métodos por Bland & Altman RIE vs. EQLIA para el Grupo 1.



**Gráfico 2.** Comparación de niveles de 25(OH)D<sub>3</sub> ( ng/ml), medidos por RIE vs. EQLIA en Grupo 2, hallándose diferencias significativas ( $p < 0.0038$ ;  $n = 40$ )



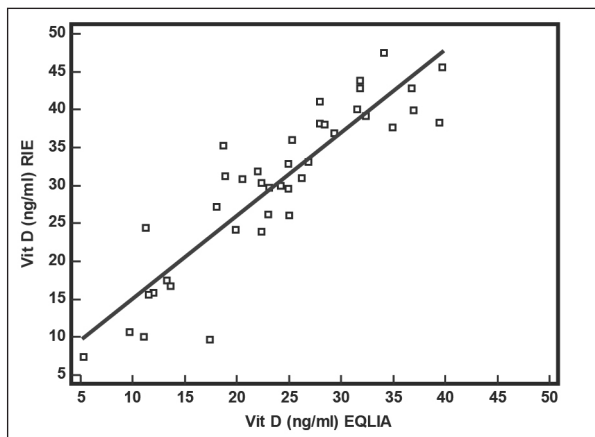
**Gráfico 3.** Correlación Vitamina D, RIE vs. EQLIA del Grupo 1, ( $r: -0,00671$ ;  $p = 0,9483$ )

Al comparar los resultados de los inmunoensayos por el método de diferencias de Bland & Altman en el G1 (Gráfico 4), si bien se observa concordancia porque el valor de diferencia cero está incluido en el rango de desvío medio  $\pm 1.96$  SD), los datos no se distribuyen homogéneamente por encima y por debajo de la media (20,8 ng/ml). Se observa un desvío positivo del RIA respecto del EQLIA y hay 2 grupos de datos que se corresponderían a los pacientes suplementados con Vitamina D<sub>2</sub> o Vitamina D<sub>3</sub>.

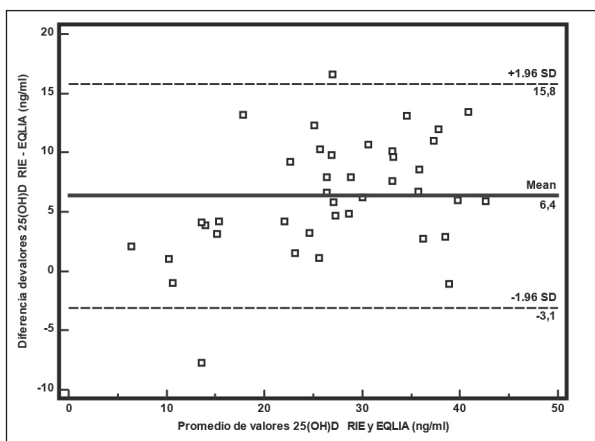
En el G2 (pacientes sin suplementación o suplementados con Vitamina D<sub>3</sub>), se halló una correlación altamente significativa entre RIE y EQLIA, ( $r = 0.898$ ,  $p < 0.0000$ ) (Gráfico 5). Cuando comparamos los resultados por Bland & Altman, vemos que éstos son concordantes entre sí, (6.4 ng/ml) (Gráfico 6). Se observa que el RIE sobrestima los valores de 25(OH)D<sub>3</sub> respecto al EQLIA, hallándose más variabilidad entre los métodos a dosis altas, donde el aporte de la 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> y otros metabolitos de 25(OH)D<sub>3</sub> es más significativo cuando los niveles de la 25(OH)D<sub>3</sub> están por encima de 30 ng/ml<sup>(16)</sup>. Por lo cual dependerá de la especificidad de los anticuerpos usados en el diseño de los inmunoensayos, su capacidad de reconocer o no estas moléculas, biológicamente inactivas, relacionadas a Vitamina D.

## DISCUSIÓN

Al comparar los dos inmunoensayos RIE Y EQLIA, no solo se pusieron en evidencia las diferencias metodológicas, sino también el impacto en los



**Gráfico 5.** Correlación Vitamina D, RIE vs. EQLIA para Grupo 2. ( $r=0.898$ ,  $p<0.0000$ ).



**Gráfico 6.** Comparación de métodos por Bland & Altman RIE vs. EQLIA para el Grupo 2.

resultados de la utilización de diferentes formas farmacológicas con la que se suplementan a los pacientes deficientes. Ambos métodos son útiles y comparables en aquellos pacientes que no reciben ninguna suplementación con Vitamina D, no así cuando son suplementados.

Desde el punto de vista analítico deberíamos usar aquel método que tenga una especificidad definida, por ejemplo que mida correctamente la  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , precursor y reservorio de la forma activa la  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , y que esté calibrado frente un método considerado de referencia, como es el caso del EQLIA. Pero este método solo sería útil para el diagnóstico de deficiencia y en el seguimiento de aquellos pacientes suplementados con Vitamina  $\text{D}_3$  y no para los suplementados con Vitamina  $\text{D}_2$ .

Por otro lado el RIE es un método ampliamente difundido en nuestro medio, empleado para el diagnóstico de deficiencias y el seguimiento de

pacientes suplementados con Vitamina  $\text{D}_2$  o Vitamina  $\text{D}_3$ . Si se desea evaluar aquellos pacientes suplementados con vitamina  $\text{D}_2$ , sería de utilidad su uso pero ¿el resultado refleja realmente el estado vitamínico de los pacientes?, ya que no solo mide el principio activo sino una mezcla de moléculas relacionadas a la Vitamina D (Tabla II), la mayoría de ellas con menor o ninguna actividad biológica, sobreestimando a dosis mayores de 30 ng/ml.

En la medición de la Vitamina D, al igual que otros analitos medidos habitualmente en el laboratorio clínico, por ejemplo los esteroides, cuando comparamos diferentes metodologías nos encontramos frente a:

- Falta de trazabilidad de los estándares empleados por los fabricantes.
- Diferente especificidad de los inmunoensayos por los anticuerpos empleados en sus diseños.
- Falta de estandarización frente a un método patrón (aún no disponible).
- Falta de valores de referencia semejantes entre métodos, aun teniendo en cuenta otras variables: edad, sexo, raza, época del año, situación geográfica.

Los informes de programas de calidad externo como el DEQAS (Internacional Vitamin D External Quality Assessment Scheme) reflejan las diferencias metodológicas. En un informe<sup>(17)</sup> se ha demostrado que para las muestras enviadas a los laboratorios participantes, aquellas que contenían solo  $25(\text{OH})\text{D}_3$ , la mayoría de los métodos comerciales eran capaces de informar resultados cercanos al valor esperado, pero que sus resultados eran operador dependiente. Para muestras que contenían predominantemente  $25(\text{OH})\text{D}_2$  algunos de los métodos informaron valores significativamente más bajos, a pesar de que algunos fabricantes anunciaban igual especificidad para ambas formas de la Vitamina D. Según Binkley<sup>(18)</sup> la marcada variabilidad de las mediciones de Vitamina D en diferentes laboratorios, no ha sido eliminada con los avances metodológicos y una *definición arbitraria de una concentración adecuada de Vitamina D no es posible hasta que se logre una estandarización internacional de los métodos*". En el año 2008 basándose en sus análisis de variabilidad biológica y analítica expresa que un valor mayor de 30 ng/ml sería un valor adecuado de vitamina D<sup>(19)</sup>.

Por último cabe hacer referencia a un artículo de opinión publicado recientemente<sup>(20)</sup>, donde el Dr. Carter, miembro del DEQAS, analiza la imprecisión de los ensayos de vitamina D y concluye: "Los errores de calibración de los ensayos

son un problema que podría llegar a solucionarse si todos los métodos usaran el mismo calibrador”, concluye diciendo que de acuerdo a su experiencia en organizar el DEQAS, está convencido que hoy no hay ningún método que pueda monopolizar la medición de Vitamina D.

La NIST (National Institute of Standards and Technology) fabricó un suero de referencia, un control que contiene 25(OH)D<sub>2</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>, y el metabolito 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> a cuatro concentraciones diferentes (SRM 972) con valor asignado por LC-MS/MS, ésto probablemente ayudará a mejorar la exactitud de los métodos<sup>(21)</sup>.

### Factores preanalíticos de la medición de 25 (OH) vitamina D

#### a) Tipo de muestra:

- Suero: es la muestra preferida, recogida en tubos estándar o en tubos conteniendo gel de separación.
- Plasma: también resultan satisfactorias las muestras de plasma obtenido con EDTA tripotásico y Heparina de Litio.

#### b) Estabilidad:

La 25(OH) D<sub>3</sub> tanto en muestra de suero como de plasma tiene una estabilidad de: 8 h a 18-25° C, más de 2 semanas a 30° C y no se ve afectada por más de 4 ciclos de congelado-descongelado<sup>(22)</sup>. En el almacenado de las muestra a -20° C, hasta un año no se han reportado causa de pérdida de los metabolitos de la 25(OH)D<sub>3</sub><sup>(23)</sup>.

### Factores analíticos de la medición de 25 (OH) vitamina D

En junio del 2009, Stöckl, D' Hondt y Thienpont<sup>(24)</sup> publicaron que dadas las divergencias en la calidad analítica de las mediciones en suero y plasma de 25(OH)D es necesario definir las especificaciones de veracidad y precisión de un sistema de medición de referencia.

Estos autores recomiendan como especificaciones de calidad analítica de las mediciones en suero y plasma de 25(OH)D en los procedimientos de rutina un coeficiente de variación (CV<sub>a</sub>%) menor de 10 % y un desvío menor de 5 %. En nuestra experiencia el EQLIA cumple con estas especificaciones analíticas, CV % 8-10 % y un desvío <2.0 % en los tres niveles del control comercial (23,8; 33.9; 72.5 ng/ml).

La variabilidad biológica de la Vitamina D entre individuos (VB<sub>G</sub>%) varía desde un 40 % en población general, no seleccionada<sup>(14)</sup> hasta alrededor de un 20 % en poblaciones estratificadas (edad, sexo, etc.), con un 8 % de VB intraindividuo (VB<sub>I</sub>%)<sup>(25)</sup>.

### Informe de los resultados

El informe del laboratorio debe ser claro:

- a) La denominación del análisis debe expresar lo que mide el método empleado.

En el caso del EQLIA: 25(OH)D<sub>3</sub> y en el RIE “25(OH) Vitamina D Total.

Aquellos métodos como HPLC o MS que miden separadamente 25(OH) D<sub>3</sub> y 25(OH) D<sub>2</sub> debería informarse como 25(OH) Vitamina D Total para evitar una mala interpretación de los resultados<sup>(26)</sup>.

- b) Debe incluirse en el informe el método que se emplea.

- c) Es aconsejable incorporar el concepto de “niveles saludables o deseables” y no de “niveles normales”. En la literatura surgen evidencias que reafirman a los 30 ng/ml como valor de corte. Entre ellos Chapuy y col., Heaney y col.<sup>(27)</sup>, Trivedi y col.<sup>(28)</sup>, Bischoff-Ferrari<sup>(29)</sup> y Dawson-Hughes B<sup>(30)</sup>.

- d) Hoy se consideran los siguientes valores de 25(OH)Vitamina D para identificar población de riesgo de deficiencia / insuficiencia<sup>(31)</sup>.

- Menor de 10 ng/ml: Deficiencia, con riesgo de raquitismo en los niños y osteomalacia en los adultos.

- Entre 10-29 ng/ml: Insuficiencia, que significa sustrato insuficiente para la síntesis de 1,25(OH)<sub>2</sub>D, y que puede ser evaluada también por el aumento de los niveles de PTH.

- Mayor de 30 ng/ml: Suficiencia/Niveles Óptimos/Deseables. Se asocian tanto con el concepto de falta de alteración del metabolismo mineral como con aquellos niveles relacionados a una absorción máxima de calcio y a la disminución en el número de caídas, la pérdida ósea y el riesgo de fracturas osteoporóticas en adultos mayores. Es importante recordar que niveles mayores de 30 ng/ml: son requeridos para las acciones o efectos no clásicos de la Vitamina D.

Seguramente esta clasificación será modificada cuando logremos estandarizar los métodos para la medición de Vitamina D.

e) Ante la variedad de métodos que se están usando actualmente, y aunque resulte una obviedad, sugerimos realizar el control del paciente con la misma metodología a lo largo del tratamiento.

## CONCLUSIONES

El análisis de los resultados de esta comparación de métodos nos permitió identificar las dos situaciones críticas que debemos considerar cuando nos solicitan la medición de Vitamina D: 1ª) la condición del paciente, si recibe o no medicación y si es así, ¿cuál? y 2ª) el método a emplear para la determinación de la misma.

En la evaluación inicial del estado nutricional de un individuo no tratado y en aquellos pacientes suplementados con Vitamina D<sub>3</sub>, cualquier método es válido para la medición de 25(OH)D. Sin embargo, en aquellos pacientes suplementados con Vitamina D<sub>2</sub>, se deberá utilizar un método que mida 25(OH)D total para su seguimiento.

La discrepancia entre resultados de vitamina D obtenidos por diferentes metodologías impactará en la utilidad clínica del informe emitido por el laboratorio y consecuentemente en la interpretación y decisión médica.

Es por ello que se deberían estandarizar urgentemente los métodos de medición de 25 (OH) vitamina D. Un prerrequisito para la estandarización es conocer ¿qué se debe medir y con qué se debería suplementar, con Vitamina D<sub>2</sub> o D<sub>3</sub>? Mientras la industria diagnóstica espera para definir las características analíticas de sus métodos, los bioquímicos debemos esforzarnos en mantener la calidad de nuestros resultados e informar a los médicos sobre la especificidad de los ensayos con los que medimos la Vitamina D.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Brody JE.** An oldie vies for nutrient of decade. NY Times Feb 19; Sect G: 1 (col 1), 2008.
2. **Holick MF.** Vitamin D Deficiency. The New England Journal of Medicin; 357: 266-281, 2007.
3. **Lips P.** Vitamin D physiology. Progress in Biophysics and Molecular Biology:92,4-8, 2006.
4. **Högstrom M, Nordström A, Nordström P.** Relationship between Vitamin D metabolites and bone mineral density in young males:a cross sectional and longitudinal study. Calcif Tissue 79, 95-101, 2006.
5. **Haddad JC, Chyu KJ.** Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. J Clin Endocrinol Metab 33: 992-995, 1971.
6. **Eisman JA, Shepard RM, DeLuca HF.** Determination of 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma using high-pressure liquid Chromatography. Anal Biochem 90: 298-305, 1977.
7. **Hollis BW, Napoli JL.** Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. Clin Chem 31: 1815-1819, 1985.
8. **Hollis BW, Kamerud JQ, Selvaag SR, Larenz JD, Napoli JL.** Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an 125I-labeled tracer. Clin Chem 39: 529-533, 1993.
9. Product insert Nichols ADVANTAGE 25-hydroxyvitamin D Assay. San Juan Capistrano, CA: Nichols Institute Diagnostics, 2001.
10. **Carter GD, Carter R, Jones J, Berry J.** How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the International Vitamin D External Quality Assessment Scheme. Clin Chem 50: 2195-7, 2004.
11. **Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, and Kobold U.** Candidate Reference Method for the quantification of Circulating 25-Hydroxyvitamin D3 by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Clin Chem 50: 1415-1417, 2004.
12. **Singh RJ, Taylor RL, Reddy S, Grebe SKG.** C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. J Clin Endocrinol. Metab 91: 3055-61, 2006.
13. Product insert 2004 LIAISON chemiluminescence 25-hydroxyvitamin D Assay. Stillwater, MN: DiaSorin Corporation
14. **Souberbielle J Fayol V, Sault C Lawson-Body C, Kahan A, Cormier C.** Assay-Specific Decision Limits for Two New Automated Parathyroid Hormone and 25-Hydroxyvitamin D Assays. Clin Chem 51:(2); 395-400, 2005.
15. **Jongen MJ, Van Ginkel FC, van der Vijgh WJ, Kuiper S, Netelenbos JC, and Lips P.** An International comparison of vitamin D metabolite measurements. Clin Chem 30: 399-403, 1984.
16. **Holick M.** Authors' Response: 25-OH-Vitamin D Assays. J Clin Endocrinol Metab; (11): 6337-6340, 2005.
17. **Carter G, Carter R, Jones J and Berry J.** How Accurate Are Assays for 25-Hydroxyvitamin D? Data from the International Vitamin D External Quality Assessment Scheme. Clin Chem 50: 2195-2197, 2004.
18. **Binkley N, Krueger D, Cowgill S, Plum L, Hansen E, DeLuca F.** Assay Variation Confounds the Diagnosis of Hypovitaminosis D: A Call for Standardization. J Clin Endocrinol Metab 89: 3152-3157, 2004.
19. **Binkley N, Krueger D, Gemar D, Drezner MK.** Correlation among 25-Hidroxy-Vitamin D Assays. J Clin Endocrinol Metab. 93: 1804-180, 2008.
20. **Carter Graham.** 25-Hidroxy-Vitamin D Assays;

- The Quest for Accuracy. *Clin Chem* 55 (7): 1300-1302, 2009.
21. **Phinney Karen W.** Development of a standard reference material for vitamin D in serum. *Am J Clin Nutr.* 2008; 88(suppl): 511S-512S.
  22. Letters to the Editor. Preanalytical Stability of 25(OH) Vitamin D<sub>3</sub> in Human Blood or Serum at Room temperature: solid as a rock. *Clinical Chemistry* 55(8): 1584-1585, 2009.
  23. **Zerwekh JE.** The measurement of Vitamin D: analytical aspects. *Ann Clin Biochem* 41: 272-281, 2004.
  24. **Stöckl D, D'Hondt H, Thienpont IM.** Method validation across the disciplines critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877: 2180-2190, 2009.
  25. **Jakobsen J, Bysted A, Andersen R y col.** Vitamin D status assessed by a validated HPLC method: within and between variation in subjects supplemented with vitamin D<sub>3</sub>. *Scand J Clin Lab invest.*; 21: 1-8, 2008
  26. **Binkley N, Drezner M, and Hollis B.** Laboratory Reporting of 25-Hydroxyvitamin D Results: Potential for Clinical Misinterpretation *Clin. Chem*; 52: 2124-2125, Nov 2006.
  27. **Heaney R, Dowell M, Hale C, Bendich A.** Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr.*; 22: 142-6, 2003.
  28. **Trivedi D, Doll R, Khan K.** Effect of four monthly oral vitamin D<sub>3</sub> supplementation on fracture and mortality in men and women living in the community: randomized doubleblind controlled trial. *Br Med J*; 326: 469-74, 2003.
  29. **Bischoff-Ferrari H, Dietrich T, Orav E, Dawson-Hughes B.** Positive association between 25(OH) D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *Am J Med.* 16: 634-9, 2004.
  30. **Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, et al.** Estimates of optimal Vitamin D status. *Osteoporosis Int*; 16: 713-716, 2005.
  31. **Oliveri B.** Identificación de la población en riesgo de deficiencia/insuficiencia de Vitamina D. Dosis para su prevención. *Actualizaciones en Osteología.*; Vol. 1 (Inaugural): 16-21, 2005.