

CONTROVERSIAS / *Controversies*

CONTROVERSIAS EN LA MEDICIÓN DE 25-HIDROXIVITAMINA D

Erich Fradinger*

Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires, Argentina.

Resumen

En los últimos años ha habido un importante incremento en la demanda a los laboratorios de determinaciones de vitamina D. Como consecuencia se han desarrollado varios ensayos automatizados para tratar de cubrir esa demanda, reemplazando los ensayos manuales. Los ensayos automatizados afrontan dificultades técnicas, como la naturaleza hidrofóbica de la 25-hidroxivitamina D, múltiples compuestos relacionados circulantes, fuerte afinidad a proteínas, linealidad de los ensayos, etc. La utilización de un método de referencia internacional, materiales estándar de referencia y procedimientos específicos proveen los medios para que los fabricantes estandaricen sus métodos. No hay duda de que los últimos ensayos automatizados y cromatográficos han mejorado sus *performances* pero aún existen discrepancias, lo que obliga a analizar cada ensayo con precaución. Dados los múltiples problemas que afectan el desempeño de los ensayos de 25-hidroxivitamina D sería esencial que los laboratorios implementaran estrictos procedimientos de control de calidad. La participación en con-

troles de calidad externos es también esencial, así como recomendable que los pacientes sean monitorizados en el mismo laboratorio y con la misma metodología.

Summary

CONTROVERSIES IN MEASURING 25-HYDROXYVITAMIN D

There has been an important increase in demand for the laboratory assessment of vitamin D. As a consequence, a number of automated assays have been developed to cope with that demand, replacing manual techniques. Automated assays confront with technical difficulties such as hydrophobic nature of 25-hydroxyvitamin D, multiple related compounds in serum, strong binding to proteins, assay linearity, etc. The use of an International Reference Method, Standard Reference Materials and specific procedures provide the means for manufacturers to accurately standardize their methods. There is no doubt that the latest automated

* Correo postal: Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires, Argentina. Libertad 836 1er piso. CABA. Correo electrónico: efradinger@idim.com.ar



and chromatographic assays have improved their performances, but discrepancies are still present so that each assay must be analyzed carefully. Given the multiple problems affecting the performance of 25-hydroxyvitamin D assays it would be essential that laboratories implement strict quality control procedures. Participation in external quality assessment schemes is also essential and it is recommended that each patient must be followed always at the same laboratory and with the same methodology.

Introducción

La vitamina D₃ (colecalfiferol) se sintetiza en piel a partir de su precursor 7-dehidrocolesterol por acción de los rayos ultravioleta tipo B, o se absorbe a nivel intestinal por ingesta. Circula en sangre unida a su proteína ligadora (DBP). En el hígado es hidroxilada en carbono 25 por la 25-hidroxilasa (enzima que no tiene regulación homeostática) generando 25-hidroxivitamina D (25OHD). Esta molécula tiene vida media larga y es utilizada como indicador del estado nutricional de vitamina D.

La vitamina D₂ (ergocalciferol) es de origen vegetal, se absorbe a nivel intestinal por ingesta y se hidroxila de forma similar a la vitamina D₃.

La 25OHD también circula unida a DBP y en riñón es hidroxilada en carbono 1 por la enzima 1 alfa-hidroxilasa generando la 1,25-dihidroxivitamina D. Si bien esta última es el metabolito activo, no se lo utiliza como marcador de estado nutricional por su vida media corta y porque su síntesis está estrictamente regulada por la hormona paratiroidea, el calcio, el fósforo y el FGF23.

El primer ensayo de 25OHD fue desarrollado por Haddad y col. en 1971¹; usaba como ligando la DBP y 25OHD tritiada como trazador, aislando la 25OHD con cromatografía a baja presión. Belsey y col.² lo simplificaron eliminando el paso cromatográfico (lo que se llamó ensayo directo), pero este tenía muchos

problemas de matriz y daba como resultado valores más elevados por interferencias de metabolitos que no eran purificados en la cromatografía. Este dato no es menor, ya que trabajos muy conocidos y citados a lo largo de los años usaron este método de análisis.³

El primer radioinmunoensayo que utilizó un anticuerpo específico para 25OHD₂ y 25OHD₃ fue desarrollado por Hollis usando como trazador 25OHD tritiada.⁴ Luego se modificó usando 25OHD yodada como trazador.⁵

Este ensayo se ha usado durante años para informar el estado nutricional de vitamina D internacionalmente y con él se han definido los actuales niveles de corte de deficiencia o suficiencia de vitamina D.⁶

Paralelamente también se desarrollaron técnicas como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía líquida asociada a espectrometría de masa (LC-MS/MS). Ambos métodos pueden cuantificar por separado la 25OHD₂ y la 25OHD₃.

Con el avance del conocimiento científico asociando niveles circulantes de 25OHD a acciones clásicas (metabolismo fosfocálcico) y no clásicas (enfermedad cardiovascular, diabetes, esclerosis múltiple, cáncer de mama, de colon, de próstata, etc.), las solicitudes de determinaciones de 25OHD a los laboratorios se ha incrementado en niveles difíciles de manejar con técnicas manuales. Por eso se han desarrollado ensayos comerciales adaptables a plataformas automáticas de más fácil acceso para facilitar la tarea a los laboratorios. La mayoría de estos ensayos usan anticuerpos coespecíficos para 25OHD₂ y 25OHD₃ y sus principales características se hallan bien descriptas.⁷

Las *controversias* que rodean la medición de 25OHD están directamente relacionadas con los problemas que existen para determinarla en el laboratorio: su naturaleza altamente hidrofóbica, su fuerte unión a la DBP, la presencia de múltiples metabolitos de vitamina D que pueden interferir en los ensayos, la estandarización adecuada, la linealidad de los ensayos, etcétera.

Disociación de la 25OHD de su proteína ligadora

Este paso es clave en el ensayo ya que se requiere para el análisis que la 25OHD no esté unida a su proteína ligadora. Con el radioinmunoanálisis (RIA) la precipitación de la muestra con acetonitrilo asegura la liberación de la 25OHD y el ensayo se lleva a cabo en un tubo distinto de aquel en el cual se hace la separación.

En los ensayos automatizados, cada proveedor tiene su propio sistema de liberación (cambios de pH, reactivos en concentraciones no divulgadas, etc.) y aseguran que la disociación de la 25OHD es total. Cabe destacar aquí que el ensayo se hace en la misma copa en la que se realiza la disociación, lo que hace que sea susceptible de interferencia con otros compuestos. Un estudio muy interesante demuestra que la misma DBP puede interferir en los ensayos automatizados al observarse una relación inversa entre concentración de DBP y 25OHD.⁸ Es decir, no todos los ensayos existentes podrían utilizarse en pacientes con distintas patologías en las que se encuentre alterada la concentración de DBP. Tener muy en cuenta a los pacientes hemodializados, pacientes críticos y embarazadas.

Especificidad

Este problema también es central. Resulta indispensable que el anticuerpo reconozca a la 25OHD₃ y la 25OHD₂ ya que en varios países medican a los pacientes con vitamina D₂. Cruzamientos menores con 25OHD₂ pueden subestimar los valores de 25OHD total. El caso más conocido fue el del inmunoensayo automatizado de Nichol's, que al poco tiempo de comercializado tuvo que ser dado de baja por subestimar la concentración de 25OHD₂.

Todos los ensayos (RIA y automatizados) cruzan 100% o más con el metabolito 24, 25 (OH)₂ D cuyos valores oscilan entre 10 y 15% del valor total de 25OHD. Esto obviamente sobreestima los valores de 25OHD total.

Los epímeros son moléculas con estruc-

tura idéntica pero con configuración estereoquímica diferente. Se ha informado que el C-3 epi-25OHD circula tanto en niños como en adultos. El cruzamiento con este compuesto está descrito según los fabricantes⁷ y la mayoría de los ensayos basados en LC-MS/MS cruzan con él.

Los isóbaros son moléculas con el mismo peso molecular que la 25OHD y que interfieren específicamente en los ensayos LC-MS/MS, ya que generan pares iónicos con la misma relación carga/masa que la 25OHD. Ejemplos de isóbaros son el 7 α -hidroxi-4-colesten-3-uno (precursor de ácido biliar) y el 1 α -OHD₃, fármaco utilizado en pacientes renales crónicos.⁹

Estandarización

Según informes recientes del Programa de Control de Calidad Externo DEQAS (*Vitamin D External Quality Assessment Scheme*), se ha verificado una mejora en la precisión entre todas las metodologías utilizadas en los laboratorios participantes.¹⁰ Sin embargo, esto no implica una mayor exactitud en los resultados. Para avanzar en el tema se necesitan un método de referencia internacional, materiales de referencia estándar (SRM) y procedimientos específicos para asegurar la estandarización. Estos temas ya han sido publicados y explicados en detalle.¹¹⁻¹³

El SRM 972 ha sido suplantado por el SRM 972a por problemas de conmutabilidad para los inmunoensayos, pero el SRM 2972 (calibradores en solución alcohólica) sigue vigente.

Un problema muy común en el análisis bioquímico de esteroides es la preparación de los estándares utilizados en cada ensayo. Algunos se presentan como "basados en suero humano" ("human serum based"), preparados con sueros a los que se les efectuó la remoción de los esteroides con carbón activado, técnica que requiere la acidificación de estos. Esto crea una matriz distinta del suero del paciente y puede ser otra causa de diferencias entre métodos.



Para proseguir con el proceso de mejora continua, el NIH (*National Institute of Health*) en colaboración con el NIST (*National Institute for Standards and Technology*), el CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) y la Universidad de Ghent en Bélgica han lanzado el Programa de Estandarización de Ensayos de vitamina D (VDSP), con el que se espera que todos los proveedores de reactivos y laboratorios con ensayos propios (*in-house*) logren una adecuada estandarización.¹⁴

Ensayos

La literatura en los últimos dos años es abundante en cuanto a comparaciones entre los recientes ensayos automatizados vs. RIA o vs. HPLC o vs. LC-MS/MS.¹⁵⁻²³ Es esperable que por todo lo planteado anteriormente se compruebe variabilidad entre los ensayos automatizados, variabilidad con respecto a LC-MS/MS, variabilidad en respuesta a los SRM, distinta linealidad, etc. Diferentes cálculos estadísticos: regresiones Passing-Bablok u otras, análisis de Bland-Altman, coeficientes de correlación de concordancia (CCC), análisis Kappa, confirman esas diferencias. Es imprescindible que cada método sea evaluado con precaución, ya que dos métodos pueden ser comparables en ciertos rangos de concentración de 25OHD y no en otros rangos. Las diferencias entre métodos ponen en duda el uso de un único valor de corte y sugieren que la prevalencia de déficit es dependiente del ensayo. Es decir, un paciente puede ser clasificado como suficiente o insuficiente según el método que se use. Más aún, debido a estas diferencias se ha propuesto calcular un valor de corte específico para cada ensayo, lo que dificultaría también el seguimiento del paciente en el tiempo, ya que el laboratorio puede cambiar el método.

Es muy interesante observar el comportamiento de los ensayos en programas conducidos por organismos especializados. El NIST instauró el "*Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program*" (VitDqap). En forma gratuita, los laboratorios pueden inscribirse, re-

cibir las muestras del programa y evaluar sus resultados comparando con valores medidos en el NIST con métodos de referencia.²⁴ Para casi todos los SRM enviados por VitDqap, los laboratorios que usan inmunoensayos y los que usan LC-MS/MS informan resultados más altos que el NIST; muy probablemente este desvío se deba a los factores anteriormente expuestos.

La clínica

Con todas las fuentes de variables expuestas, la pregunta que puede surgir en la comunidad médica es qué hacer ante un resultado de vitamina D. Por supuesto que lo ideal es que los proveedores continúen (y lo hacen) mejorando sus ensayos para lograr mayor precisión, mayor exactitud, trazabilidad a métodos y utilización de estándares de referencia, reformulación de sus curvas de calibración, disminución de la variabilidad lote a lote, etc. Se debe considerar que todo valor que se obtiene de una técnica analítica es solo una estimación del valor real, debido a la incertidumbre de la medida.²⁵ Si hablamos de un valor de corte, siempre es importante conocer la incertidumbre alrededor de ese valor de corte. Mientras tanto, las Guías Clínicas de la Endocrine Society⁶ sugieren textualmente: "todas las metodologías son adecuadas si uno apunta a valores más altos que los actuales puntos de corte". Esto concuerda con Cavalier y col.,²⁶ en un trabajo de 2009 en el cual (por la fecha en que se realizó) no se evaluaron todos los ensayos hoy disponibles. Considerando la incertidumbre de la medida, sugirieron que el valor "real" de un paciente va a ser mayor de 32 ng/ml, si el valor medido es mayor de 40 ng/ml. Textualmente: "si el médico considera que el status adecuado de vitamina D es definido como mayor a 32 ng/ml, deberá asegurarse que el paciente tenga un valor mayor a o igual a 40 ng/ml". En un editorial reciente, un reconocido experto en el tema²⁷ sugiere que no hay mayores problemas (desde el punto de vista clínico) si los informes del control de cali-

dad de cada laboratorio entran en la media del control externo DEQAS, sumado a un estricto control interno (CV interensayo <10%).

En esta misma sección y revista, Mastaglia y col.²⁸ describieron perfectamente las diferencias de criterios entre el IOM (*Institute of Medicine*) y la CMI (Comunidad Médica Internacional especializada en vitamina D) acerca de los niveles adecuados de vitamina D. Un análisis muy detallado sobre la base de Medicina Basada en la Evidencia se ha publicado recientemente.²⁹ Asimismo, Sánchez y col.³ publicaron la *Guía práctica de diagnóstico, prevención y tratamiento de la hipovitaminosis D*, donde también se analizan estos temas. Cuando se habla de valores de corte tan definidos (20 ng/ml o 30 ng/ml) sería muy importante tener en cuenta todos los factores aquí enunciados.

Cabe hacerse otra pregunta: con el advenimiento del método de referencia LC-MS/MS establecido por organismos especializados, ¿no sería necesario reevaluar el corte de 30 ng/ml? ¿o el de 20 ng/ml? Es una tarea extremadamente difícil, ya que habría que volver a estudiar la 25OHD poblacional (medida por ese método) y relacionarla con absorción de calcio, supresión de hormona paratiroidea, densidad mineral ósea, reducción del riesgo de caídas y fracturas, riesgo de osteomalacia, acciones no clásicas, etcétera.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener conflictos de intereses.

(Recibido: enero 2014.
Aceptado: marzo 2014)

Referencias

- Haddad JG, Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33: 992-5.
- Belsey RE, DeLuca HF, Potts JT Jr. A rapid assay for 25OHvitamin D without preparative chromatography. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38: 1046-51.
- Sánchez A, Oliveri B, Mansur JL, Fradinger E, Mastaglia S. Diagnóstico, prevención y tratamiento de la hipovitaminosis D. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo* 2013; 50: 140-56.
- Hollis B, Napoli JL. Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem* 1985; 31: 1815-9.
- Hollis B, Kamerud JQ, Selvaag SR, Lorenz JD, Napoli JL. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an ¹²⁵I-labeled tracer. *Clin Chem* 1993; 39: 529-33.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, y col. Evaluation, Treatment, and Prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1911-30.
- Farrell CJ, Herrmann M. Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2013; 27: 675-88.
- Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem* 2012; 58: 543-8.
- Shah I, James R, Barker J, Petroczi A, Naughton D. Misleading measures in vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars. *Nutr J* 2011; 10:46.
- Carter GD. 25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte. *Clin Chem* 2012; 58:486-8.
- Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in human serum using isotope-dilution liquid chromatog-



- raphy/tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2010; 82: 1942-8.
12. Phinney K. Development of a standard reference material for vitamin D in serum (review). *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 511-2S.
 13. Thienpont L, Stepman H, Vesper H. Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand J Clin Lab Invest* 2012; 72:41-9.
 14. Sempos CT, Vesper H, Phinney K, Tienpoint L, Coates P. Vitamin D status as an international issue. National surveys and the problem of standardization. The VDSP. *Scand J Clin Lab Invest* 2012; 242:32-40.
 15. Farrell SJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State of the art Vitamin D assays. Comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem* 2012; 58:531-42.
 16. Ong L, Saw S, Sahabdeen N, Tey K, Ho C, Sethi S. Current 25-hydroxyvitamin D assays: Do they pass the test? *Clin Chim Acta* 2012; 413:1127-34.
 17. Moon H, Cho J, Song J, Park C, Yun Y, Kim J. Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem* 2012; 45:326-30.
 18. Chen Y, Kinney L, Bozovic A, et al. Performance evaluation of Siemens ADVIA Centaur and Roche MODULAR analytcs E170 total 25-OH vitamin D assays. *Clin Biochem* 2012; 45:1485-90.
 19. Tahsin-Swafiri A, Blanco Navarro I, Pérez Sacristán B, Millán I, Granado-Lorencio F. The prevalence of vitamin D deficiency in clinical practice is assay-dependent. *Clin Nutr* 2012; 6: 1011-4.
 20. Shu I, Pina Oviedo S, Quiroga Garza G, Meng Q, Wang P. Influence of vitamin D2 percentage on accuracy of 4 commercial total 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Chem* 2013; 59:1273-5.
 21. Glendenning P, Inderjeeth C. Vitamin D: Methods of 25 hydroxyvitamin D analysis, targeting at risk populations and selecting thresholds of treatment. *Clin Biochem* 2012; 45:901-6.
 22. Janssen M, Wielders J, Bekker C, et al. Multicenter comparison study of current methods to measure 25-hydroxyvitamin D in serum. *Steroids* 2012; 77:1366-72.
 23. Farrell C, Soldo J, Williams P, Herrmann M. 25-hydroxyvitamin D testing: challenging the performance of current automated immunoassays. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50:1953-63.
 24. Bedner M, Lippa K, Tai S. An Assessment of 25-hydroxyvitamin D measurements in comparability studies conducted by the Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program. *Clin Chim Acta* 2013; 426:6-11.
 25. Cembal S, Ambrosio J, Aranda C, et al. Intra-assay total uncertainty of results in immunoassay techniques. *J Immunoassay Immunochem* 2004; 25: 1-15.
 26. Cavalier E, Rozet E, Gadisseur R, Carlisi A, Monge M, Chapelle J, et al. Measurement uncertainty of 25-OH vitamin D determination with different commercially available kits: impact on the clinical cut offs. *Osteoporosis Int* 2010; 21:1047-52.
 27. Vieth R. The future of vitamin D, i.e. 25-hydroxyvitamin D, testing. *Clin Biochem* 2013; 46: 189.
 28. Mastaglia S, Watson D, Oliveri B. Controversia sobre los niveles adecuados de vitamina D para la salud ósea propuestos por el Instituto de Medicina de los Estados Unidos y la Comunidad Internacional. *Actual Osteol* 2013; 9:207-16.
 29. Bouillon R, Van Schoor N, Gielen E, Boonen S, Mathieu C, Vanderschueren D, Lips P. Optimal vitamin D status: a critical analysis on the basis of evidence-based medicine. *J Clin Endoc Metab* 2013; 8:1283-304.