

25-HIDROXIVITAMINA D: ASPECTOS METODOLÓGICOS Y NIVELES ÓPTIMOS

ERICH FRADINGER*

Instituto de Investigaciones Metabólicas, Buenos Aires

Resumen

En la práctica bioquímica son comunes los problemas de estandarización, especificidad, sensibilidad, sensibilidad funcional, matriz, incertidumbre, etc. El dosaje de 25-hidroxitamina D (25D) no escapa a estos problemas. Los ensayos sin cromatografía previa dan valores más elevados, ya que no se separan metabolitos que interfieren en la reacción. Con cromatografía previa en fase reversa o normal se ha obviado este problema. Los radioinmunoensayos y los ensayos quimioluminiscentes (competitivos) automáticos han simplificado este proceso. Tanto HPLC como cromatografía gaseosa seguida de espectrometría de masa se han propuesto como métodos de referencia, pero es difícil realizarlos en laboratorios convencionales. La diversidad de métodos utilizados durante los últimos 20 años y la falta de un estándar de referencia internacional de 25D nos impone analizar en cada trabajo qué método se ha usado y evitar hacer comparaciones entre ellos, más aún si no se conoce algún factor de corrección que los haga comparables. Es muy importante evaluar con sumo cuidado la especificidad de cada ensayo. Si bien los insertos de los *kits* disponibles indican que reconocen tanto la 25D₃ como la 25D₂, esto no es así en todos los casos.

Hay una diferencia entre rango de referencia de 25D y rango “saludable” u “óptimo” de 25D. La distribución de los valores de 25D en una población, si bien típica, no puede considerarse dentro de la normalidad. Por esto se han descrito distintos criterios para definir el nivel óptimo de 25D. Uno de ellos es evaluar la relación entre parathormona (PTH) y 25D y definir a qué valor de 25D la PTH alcanza máxima supresión (si bien hay trabajos que no encuentran dicha supresión). Utilizando este criterio se han publicado distintos valores de 25D por varias razones, entre ellas los distintos métodos usados. Basado en algunos de estos trabajos, en los resultados sobre la disminución de la tasa de fractura con suplementos de vitamina D, y en otros criterios, el consenso actual del valor óptimo de 25D es muy superior al tradicional corte de 10-12 ng/ml, y promedia los 30 ng/ml.

Palabras clave: 25-hidroxitamina D; métodos; niveles séricos

Summary

25-HYDROXYVITAMIN D: METHOLOGICAL ASPECTS AND OPTIMAL SERUM LEVELS

In biochemical practice problems such as standardization, specificity, sensitivity, functional sensitivity, matrix, uncertainty, etc., are relatively common. Assay of 25-hydroxyvitamin D(25D) is not free of these problems. Assay systems without prior chromatography give higher values, due to lack of separation of interfering metabolites. With prior chromatography –either normal or in reverse phase– this problem is obviated. Radioimmunoassays, enzymeimmunoassays and automated assays have simplified the process. Both HPLC and gas chromatography, followed by mass spectrometry, have been proposed as reference methods, but they are difficult to perform in conventional laboratories. The variety of methods used along the last 20 years and the absence of an international 25D reference standard makes it necessary to evaluate, in every publication, which method has been employed; also, comparisons between papers should be made with caution, specially if no correction factor is known. Assay specificity should be always considered carefully. Although kit inserts claim that both 25D₃ and 25D₂ are recognized, this is not so in every case. There is a difference between the reference range and the “healthy” or “optimal” level of 25D. The distribution of 25D values in a population, although typical, cannot be considered normal. Because of this, different criteria have been described to define which is the optimal 25D level. One of them is to evaluate the relation between

* Dirección postal: Libertad 836, 1er. piso, (1012) Buenos Aires. Correo electrónico: efradinger@idim.com.ar

PTH and 25D, and to define at which 25D level PTH is maximally suppressed (although some studies have not found such suppression). Using this criterion, and based on some of the most recent papers examining the decrease in fracture rates with vitamin D supplements, as well as other elements, there is consensus nowadays that the optimal level of 25D is well above the traditional 10-12 ng/ml cut-off, and averages 30 ng/ml.

Key words: 25-hydroxyvitamin D; methods; serum levels

Introducción

Es muy común en la práctica bioquímica enfrentar problemas de estandarización en cada lote, matriz, especificidad, sensibilidad, variabilidad intra-individual, incertidumbre, etc. Tres laboratorios en Argentina participan del control externo de calidad de vitamina D (DEQAS) con sede en Londres. Un solo vistazo a los valores de 25-hidroxivitamina D (25D) que se reciben cada tres meses es suficiente para concluir que la 25D no es ajena a la mayoría de los problemas mencionados. También hay que tener en cuenta la falta de un estándar internacional de referencia de 25D, las distintas metodologías que existen para dosar 25D y la experiencia que cada usuario tenga con un ensayo.

Métodos de medición de 25D

- 1) Métodos directos sin cromatografía.
 - 2) Métodos cromatográficos a baja presión
 - 3) Métodos cromatográficos a alta presión (HPLC)
 - 4) Inmunoensayos (RIA, ELISA)
 - 5) Métodos automáticos
 - 6) Espectrometría de masa.
-
- 1) Estos métodos fueron los primeros en utilizarse en la medición de 25D. Consisten en la precipitación, (en general con etanol) de las proteínas séricas, y el dosaje de 25D en el sobrenadante. En general utilizaban como proteína ligadora sueros diluidos de rata normal o con déficit de vitamina D o suero humano. Al ser un método directo, no purifican las distintas fracciones que pueden interferir en el ensayo de 25D, y además tienen un efecto “matriz” muy importante. Es decir, en el extracto etanólico quedan sustancias interfirientes y esto genera resultados más altos que los obtenidos con otros métodos que sí purifican las distintas fracciones. En la Figura 1 puede verse el gráfico de Bland y Altman comparando un método directo *versus* un método cromatográfico. Se ve claramente que un método mide hasta 15 o 20 ng/ml más que otro. Muchos autores en trabajos muy conocidos han utilizado este método,¹⁻⁶ por lo que hay que tener en cuenta estos resultados si los queremos comparar con otros trabajos.

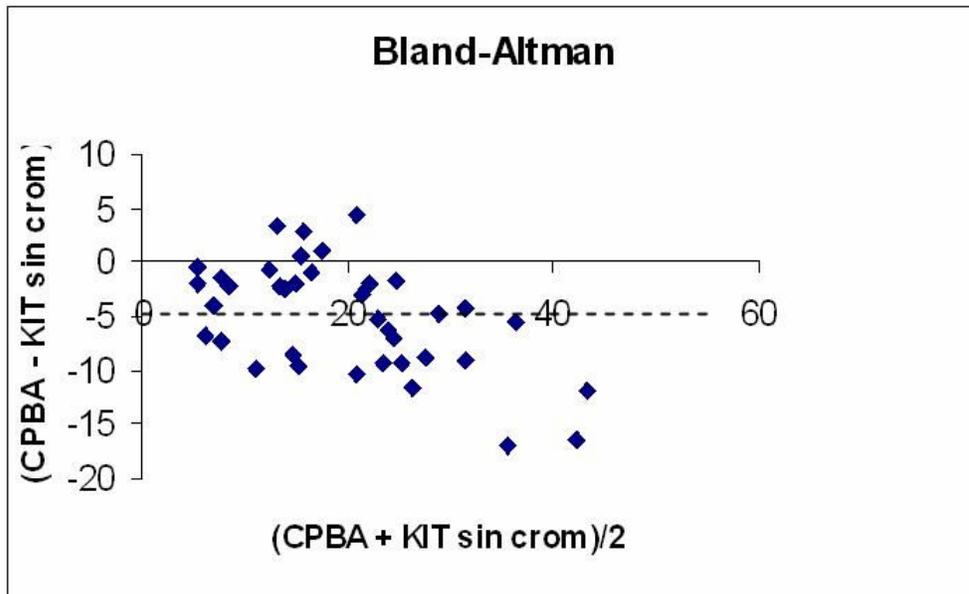


Figura 1. Gráfico de Bland y Altman comparando un método con purificación cromatográfica (CPBA) y un método directo sin cromatografía (kit sin crom).

- 2) Estos métodos incorporaron, luego de la precipitación, la cromatografía a baja presión, con cartuchos de sílica o combinación de cartuchos de C18 y sílica. Con distintos solventes se purifica exclusivamente la 25D y se eliminan los metabolitos que interfieren en la reacción, superando los problemas de los ensayos directos. Como agente ligante en general utilizan lo mismo que los ensayos directos.
- 3) Los métodos de HPLC en fase normal o reversa han sido utilizados en importantes trabajos de investigación. La cuantificación es por absorción al ultravioleta; los distintos tiempos de retención de las moléculas permiten separar los interferentes de la reacción y discriminan entre el 25-hidroxicolecalciferol (25D₃) y el 25-hidroxi ergocalciferol (25D₂). Los resultados son comparables con los ensayos con cromatografía a baja presión, si bien estos últimos no discriminan las dos moléculas mencionadas.
- 4) Los inmunoensayos se desarrollaron a partir de antígenos que generaron anticuerpos específicos para 25D₃ y 25D₂. La iodación con ¹²⁵I de estos antígenos dio origen a varios ensayos comerciales actualmente utilizados en la rutina diaria.⁷ La Figura 2 muestra el gráfico de Bland y Altman comparando un método cromatográfico a baja presión *versus* un RIA comercial. El sesgo aquí es nulo, lo que muestra que la incorporación de anticuerpos ha superado los problemas de purificación, permitiendo dejar de lado los métodos cromatográficos.

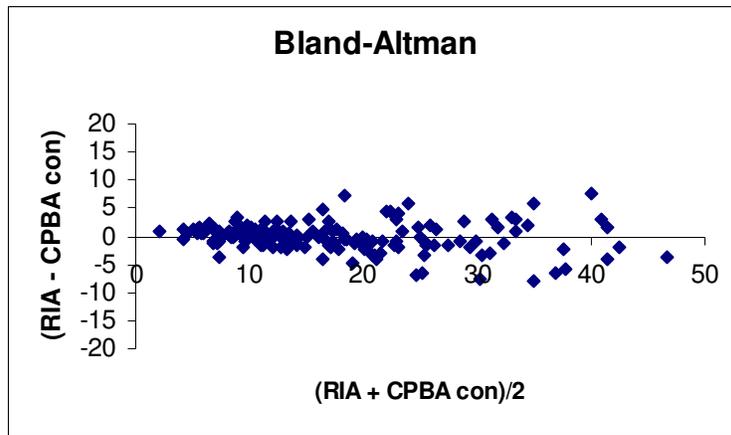


Figura 2. Gráfico de Bland y Altman comparando un radioinmunoensayo (RIA) y un método con purificación cromatográfica (CPBA con).

5) Dos métodos automáticos están disponibles actualmente. Uno de ellos es un ensayo directo y el agente ligante es la proteína transportadora de vitamina D humana. Al ser un ensayo directo, no es sorprendente que sus resultados sean mayores comparados con otros métodos.^{8, 9} Recientemente se ha publicado un trabajo –y es de esperar que se publiquen más con este método–,¹⁰ por lo que la comunidad médica debe conocer estos detalles metodológicos y analizar con precaución estos resultados.¹¹

El otro método automático utiliza el mismo anticuerpo que un RIA comercial muy difundido en la actualidad. Trabajos preliminares han arrojado valores menores a los RIA comerciales.

6) Si bien no hay método de referencia para 25D, la espectrometría de masa, asociada a cromatografía gaseosa o líquida, sea tal vez el método más exacto para su cuantificación.¹² Este método requiere de personal capacitado y no es el más adecuado para el uso rutinario.

Ante esta diversidad de métodos y resultados entre unos y otros, los valores de estado nutricional de vitamina D o los valores de 25D alcanzados luego de una suplementación determinada (con colecalciferol o ergocalciferol) deben manejarse o interpretarse con precaución. Una aproximación a la interpretación de estos problemas son los trabajos publicados en donde se comparan distintas metodologías.¹³ En este trabajo se describe que los métodos directos miden aproximadamente un 30% más que los métodos cromatográficos. En la Tabla 1 se detallan algunos trabajos muy citados en la literatura y sus respectivos métodos. Chapuy y col.¹ consiguen valores de 42 ng/ml con 800 UI de colecalciferol partiendo de valores basales de 16 ng/ml. Estos valores son altos comparados con otros estudios en los que los pacientes han recibido las mismas dosis. Aplicando el

factor de corrección correspondiente al uso de distinta metodología,¹³ el valor corregido a valores de RIA sería de 29 ng/ml.

Tabla1. Valores de 25D reportados por varios autores usando diversos métodos.

Autor	Referencia	Publicado ng/ml	“Corregido” ng/ml	Método
Chapuy y col.	1	42	29	DIRECTO
Krall y col.	3	38	26	DIRECTO
Dawson-Hughes y col.	14	44	31	DIRECTO
Tangpricha y col.	15	35	25	DIRECTO
Vieth y col.	16	24	24	RIA

Krall y col.³ describen que a valores de 25D de 38 ng/ml la parathormona suprime su variación estacional; este valor sería de 26 ng/ml. En otro trabajo, Dawson-Hughes y col.¹⁴ alcanza valores de 44 ng/ml con 700 UI de colecalciferol, que corregido sería de 30,8 ng/ml. Un trabajo del grupo de Holick describe que a finales del invierno, en Boston, individuos mayores de 50 años, con suplementos de 400 UI, tienen una media de 35 ng/ml.¹⁵ Corrigiendo nuevamente, obtendríamos un valor de 25 ng/ml. Este valor se acerca bastante a los valores publicados por Vieth y col. en Toronto, para un mismo grupo etario, con los mismos suplementos, pero no con metodología directa.¹⁶

Especificidad

En la piel se sintetiza vitamina D₃ (colecalciferol) y por suplementos farmacológicos podemos ingerir tanto vitamina D₃ como vitamina D₂ (ergocalciferol). A partir de estos sustratos, en el hígado se sintetiza 25D₃ y 25D₂, por lo que se necesitan métodos que puedan reconocer ambos metabolitos para la medición exacta del estado nutricional de vitamina D.

No existen mayores problemas con la medición de 25D₃, todos los métodos la reconocen perfectamente. Hay equipos comerciales que sólo reconocen esta molécula y no reconocen

a la 25D₂. Esta información está descripta en el inserto de los *kits*, por lo que simplemente hay que leer estos insertos. En la Figura 3A se muestra la asociación entre un método que sólo reconoce a la 25D₃ (eje *y*) y un método que reconoce ambas moléculas (eje *x*). Los pacientes elegidos sólo tienen 25D₃ circulante ya que no consumen vitamina D₂. El elevado coeficiente de correlación nos indica que no hay diferencias entre ambos métodos. En la Figura 3B se muestran los dos métodos anteriores, pero con pacientes que han tomado vitamina D₂. Claramente la correlación se ha perdido y se pueden cometer errores graves, tales como informar con un método (eje *y*) niveles de 10 ng/ml, cuando en realidad el paciente tiene 60 ng/ml (eje *x*).

En cuanto a la especificidad con la 25D₂, debemos tener más precauciones. Existen en la literatura reportes en donde se describe la existencia de *kits* comerciales que no reconocen en un 100% la 25D₂.^{17, 18} También hay reportes que indican que el método automático directo no reconoce totalmente la 25D₂.¹⁹ Esto ha sido reconocido por el fabricante y expresamente lo advierte a sus usuarios.

La molécula 24,25-dihidroxitamina D circula en concentraciones muy bajas en el organismo (1-4 ng/ml). Sin embargo, al hablar de especificidad, es necesario recalcar que todos los *kits* comerciales cruzan un 100% con esta molécula.

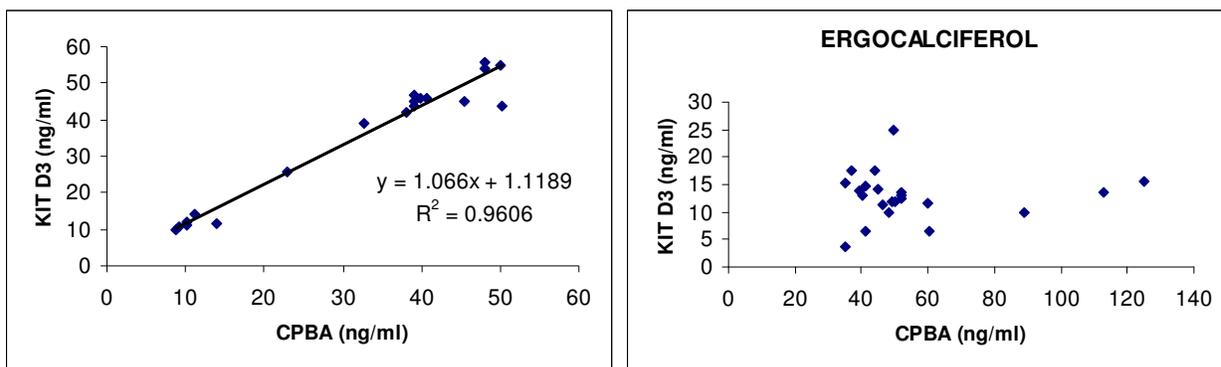


Figura 3A (izq.). Comparación entre un método que sólo reconoce 25D₃ (eje *y*) vs. un método cromatográfico que reconoce 25D₃ y 25D₂ en pacientes que no consumen ergocalciferol.

Figura 3B (der.). Comparación entre un método que sólo reconoce 25D₃ (eje *y*) vs. un método cromatográfico que reconoce 25D₃ y 25D₂ en pacientes que consumen ergocalciferol.

Niveles óptimos de 25D

La 25D no está bajo control homeostático y sus niveles en sangre dependen de muchas variables ambientales (latitud, vestimenta, melanina, uso de pantallas solares, etc.). Por lo tanto un rango de referencia no es de mucha utilidad. La mayoría de los *kits* sugieren un rango de normalidad de 9-10 hasta 40-50 ng/ml. Un valor de, por ejemplo, 14 ng/ml puede ser frecuente, pero no “normal”.

Desde hace unos años se ha intentado incorporar el concepto de niveles “saludables” y no “normales” de 25D. Distintos criterios han sido usados para hallar un valor óptimo (o de “corte”) de 25D:

- 1) Correlación entre 25D y 1,25-dihidroxitamina D (1,25D): el valor óptimo sería la concentración de 25D por sobre el cual la 1,25D ya no aumenta.
- 2) Valor de 25D hasta que la 1,25D aumenta luego de suplementación con colecalciferol.
- 3) Relación positiva entre 25D y densidad mineral ósea: el valor de 25D por sobre el cual la asociación entre 25D y densidad mineral llega a un *plateau*.
- 4) Valor de 25D por debajo del cual la PTH empieza a aumentar poblacionalmente. Por encima de ese valor, la relación PTH vs. 25D llega a un *plateau*.

El criterio número 4 es el que más ha sido citado en la literatura. Es muy conocido el trabajo de Chapuy y col.²⁰ donde se describe que la PTH comienza a aumentar poblacionalmente por debajo de niveles de 25D de 31 ng/ml. También el trabajo de Dawson Hughes y col.² donde el valor de corte según este criterio sería 40 ng/ml. Un trabajo muy interesante, dinámico, es el publicado por Malabanan y col.²¹ en el cual los pacientes con valores basales de 20 ng/ml de 25D, luego de recibir 50.000 UI por semana de vitamina D₂, no modificaron los niveles de PTH. Por lo tanto, el valor óptimo según este trabajo sería de 20 ng/ml.

Si bien las edades de los individuos estudiados en estos trabajos difieren, es necesario aclarar que estos trabajos han usado distintos métodos para medir 25D, lo cual puede explicar parte de la gran diferencia entre los distintos valores de corte.

Utilizando otros modelos estadísticos no se ha encontrado un *plateau* entre PTH y 25D,¹⁶ por lo cual deberíamos elevar indefinidamente el valor de 25D para seguir bajando la PTH circulante.

Es bien conocida la clasificación de McKenna y col.²² en la cual se define deficiencia (menor de 10 ng/ml), insuficiencia (menor de 20 ng/ml), hipovitaminosis D (menor de 40 ng/ml) y niveles deseables (mayor de 40 ng/ml). Este estudio se hizo con los datos de 22 trabajos, los cuales utilizaban todas las metodologías existentes para medir 25D. Conociendo todas las diferencias metodológicas y los problemas arriba expuestos, habría que tomar con cierta precaución dicha clasificación.

En un intento de simplificar ésta y otras clasificaciones,²³ Hollis ha sugerido definir como deficiencia de vitamina D a todo valor menor a 30 ng/ml, niveles adecuados de 30 a 100 ng/ml y toxicidad a valores mayores a 100 ng/ml.²⁴

Al seleccionar trabajos en donde se utiliza la misma metodología para medir 25D, surgen evidencias que reafirman los 30 ng/ml como valor de corte. Entre ellos, el ya citado trabajo de Chapuy y col.²⁰ el trabajo de Heaney y col. en donde se muestra que la absorción de calcio (medida por métodos indirectos) varía dentro del rango de referencia de 25D y que

es mayor a 30 ng/ml,²⁵ el trabajo de Trivedi y col., en donde el efecto anti fractura es obtenido a valores cercanos a 30 ng/ml;²⁶ el trabajo de Bischoff-Ferrari y col., en el cual los cambios máximos de densidad mineral ósea se dan en estos valores de 25D.²⁷

Conclusiones

Son pre-requisitos indispensables para la estandarización de un ensayo la existencia de un estándar de referencia internacional y un método de referencia. En el caso de la 25D ambos requisitos no están disponibles, por lo que es muy difícil la comparación entre ensayos. Son muy útiles en estos casos los controles de calidad internacionales y los trabajos de comparación de distintos métodos. Dejando de lado estas dificultades, existen evidencias de que el valor óptimo de 25D debe ser mayor o igual a 30 ng/ml.

(Recibido: agosto 2005. Aceptado: septiembre 2005)

Referencias

- 1 Chapuy MC, Arlot ME, Duboef F, et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures. *N Engl J Med* 1992; 327: 1637-42.
- 2 Dawson Hughes B, Harris S, Dallal G. Plasma calcidiol, season and serum parathyroid hormone concentrations in healthy elderly men and women. *Am J Clin Nutr* 1997; 65: 67-71.
- 3 Krall E, Sahyoun N, Tannenbaum S, Dallal G, Dawson Hughes B. Effect of vitamin D intake on seasonal variations in parathyroid hormone secretion in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1989; 321: 1777-83.
- 4 Barger-Lux M, Heaney RP. Effects of above average summer sun exposure on serum 25-hydroxyvitamin D and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 4952-6.
- 5 Harris S, Soteriades E, Dawson-Hughes B. Secondary hyperparathyroidism and bone turnover in elderly blacks and whites. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3801-4.
- 6 Heaney RP, Barger-Lux M, Dowell M, Chen T, Holick MF. Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4111-6.
- 7 Hollis BW, Kamerud JQ, Selvaag SR, Larenz JD, Napoli JL. Determination of vitamin D status by radioimmunoanalysis with an ¹²⁵I-labeled tracer. *Clin Chem* 1993; 39: 529-33.
- 8 Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3152-57.
- 9 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* 2004; 50: 2195-7.
- 10 Holick MF, Siris E, Binkley N, et al. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3215-24.
- 11 Fradinger E. 25-OH-vitamin D assays. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 (En prensa).

- 12 Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D by LC-Tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004; 50: 1415-7.
- 13 Lips P, Chapuy M, Dawson-Hughes B, Pols H, Holick M. An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements. *Osteoporos Int* 1999; 9: 394-7.
- 14 Dawson-Hughes B, Harris S, Krall E, Dallal G. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 year of age or older. *N Engl J Med* 1997; 337: 670-6.
- 15 Tangpricha V, Pearce E, Chen T, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med* 2002; 112: 659-62.
- 16 Vieth R, Ladak Y, Walfish P. Age-related changes in the 25-hydroxyvitamin D versus parathyroid hormone relationship suggest a different reason why older adults require more vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 185-91.
- 17 Hollis B. Comparison of commercially available 125 I-based RIA methods for the determination of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem* 2000; 46: 1657-61.
- 18 Glendenning P, Noble J, Taranto M, et al. Issues of methodology, standardization and metabolite recognition for 25-hydroxyvitamin D when comparing the Diasorin radioimmunoassay and the Nichols Advantage automated chemiluminescence protein-binding assay in hip fracture cases. *Ann Clin Biochem* 2003; 40: 546-51.
- 19 Leventis P, Garrison L, Sibley M, et al. Underestimation of serum 25 hydroxyvitamin D by the Nichols Advantage assay in patients receiving vitamin D replacement therapy. *Clin Chem* 2005; 51: 1072-4.
- 20 Chapuy M.C, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997; 7: 439-43.
- 21 Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 1998; 351: 805-6.
- 22 McKenna MJ, Freaney R. Secondary hyperparathyroidism in the elderly: means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 1998; 8(Suppl 2): S3-6.
- 23 Zitterman A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr* 2003; 89: 552-72.
- 24 Hollis B. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 2005; 135: 317-22.
- 25 Heaney R, Dowell M, Hale C, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 142-6.
- 26 Trivedi D, Doll R, Khan K. Effect of four monthly oral vitamin D₃ supplementation on fracture and mortality in men and women living in the community: randomized double blind controlled trial. *Br Med J* 2003; 326: 469-74.
- 27 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* 2004; 116: 634-9.