

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

# RECOMENDACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA D EN EL LABORATORIO CLÍNICO

**AUTORES:**

**BQ./QF. Claudia Cárdenas Soto.**

Sección Química Clínica.

Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

**QF. Noemí Caro Jara.**

Sección Química Clínica.

Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

**BQ. M<sup>a</sup> Paola Pellegrini Pinto.**

Jefa Sección Química Clínica.

Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

**BQ. Richard Pino Cortés.**

Sección Química Clínica.

Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

**BQ. Hugo Moscoso Espinoza.**

Jefe Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

**REVISORES INTERNOS:**

**Dra. Verónica Ramírez Muñoz.**

Jefa Subdepartamento Coordinación Externa.

Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia.

Instituto de Salud Pública de Chile.

**REVISORES EXTERNOS:**

**Dr. Arturo Borzutzky Schachter.**

Director del Laboratorio de Inmunología y Alergia Traslacional.

Departamento de Enfermedades Infecciosas e Inmunología Pediátrica.

Escuela de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

**Quím. Ind. Fidel Allende Sanzana.**

Académico Departamento de Laboratorios Clínicos, Escuela de

Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile - Especialista

Líder de Laboratorio de Toxicología y Química Especial, Red de Salud

UC-Christus.

---

# RECOMENDACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA D EN EL LABORATORIO CLÍNICO

---

## 1.- RESUMEN

La determinación de metabolitos de vitamina D es de suma importancia en el estudio del metabolismo óseo. Una deficiencia de esta vitamina causa enfermedades óseas como el raquitismo y osteomalacia, y se ha relacionado con el incremento del riesgo de enfermedades extra-esqueléticas, tales como enfermedad coronaria, algunos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes, entre otras. En la actualidad existe variabilidad en los métodos utilizados en el laboratorio clínico para la determinación de los metabolitos de la vitamina D, dado principalmente por la inexistencia de procedimientos estandarizados y la alta reactividad cruzada con otros metabolitos de vitamina D, lo que puede afectar la especificidad de la cuantificación de vitamina D, limitando la capacidad de los clínicos para monitorizar el estado, la suplementación y la toxicidad de vitamina D.

## 2.- ALCANCE

Este documento contiene recomendaciones para los laboratorios clínicos que realizan cuantificación de vitamina D, proporcionando información relevante sobre el metabolismo, fisiología, medición, principios de los métodos, así como la importancia del Programa de estandarización de la vitamina D organizado por el CDC (Vitamin D Standardization-Certification Program) y su contribución en la estandarización de la técnica.

## 3.- INTRODUCCIÓN

La vitamina D es una hormona liposoluble que desempeña un papel esencial en la homeostasis del calcio-fósforo y el metabolismo óseo y también ejerce muchas otras funciones reguladoras celulares fuera del sistema esquelético.

La deficiencia de vitamina D constituye una de las situaciones carenciales más prevalentes en el mundo. En casos de deficiencia severa se producen alteraciones serias de consolidación ósea: raquitismo en niños y osteomalacia en adultos. En Chile, estudios muestran que la deficiencia de vitamina D afecta a más de la mitad de la población incluyendo niños, jóvenes, adultos, mujeres postmenopáusicas y ancianos, siendo estos últimos quienes tienen más probabilidad de tener enfermedades osteometabólicas secundarias.

La deficiencia de vitamina D, además de su papel en la etiopatogenia del raquitismo y osteomalacia, ha sido asociada al desarrollo y gravedad de múltiples patologías extra-esqueléticas. De hecho, la deficiencia de vitamina D se ha asociado con aumento del riesgo de padecer diabetes mellitus, hipertensión arterial,

insuficiencia cardíaca, enfermedad arterial periférica, infarto agudo de miocardio, varios tipos de cáncer, así como del riesgo de padecer infecciones respiratorias, alergias, enfermedades autoinmunes e inflamatorias y mortalidad. Es importante tener en cuenta que estas asociaciones no comprueban causalidad, aunque en varios estudios longitudinales se ha visto un aumento del riesgo de enfermedades al tener deficiencia de vitamina D pre-existente.

Hoy en día sabemos que la vitamina D se comporta como una hormona con múltiples funciones en el organismo. De todas sus acciones, la mejor estudiada y la más importante, se relaciona con la salud ósea. Las concentraciones adecuadas de la vitamina mantienen el metabolismo calcio-fósforo dentro de la normalidad. En humanos, las fuentes principales de vitamina D son la síntesis cutánea de la hormona, inducida por la radiación solar y en menor medida, el consumo de alimentos ricos en vitamina D como los pescados grasos. Una proporción muy importante de la población no recibe radiación solar suficiente para la síntesis cutánea adecuada de vitamina D, lo que se ha acentuado en las últimas décadas por el estilo de vida occidental, poca actividad al aire libre, uso de bloqueadores solares, la obesidad y residir en latitudes altas, entre otros. Esto, unido a que el consumo de alimentos ricos en vitamina D suele ser bajo, hace que gran parte de la población esté en riesgo de presentar deficiencia de este micronutriente. Por ello, diferentes autores recomiendan la ingesta de alimentos enriquecidos y/o de suplementos farmacológicos de la vitamina.

Ante la evidencia de niveles bajos de vitamina D en Chile (Encuesta Nacional de Salud (ENS) del año 2016 - 2017, que estudió a las mujeres en edad fértil, entre 15 y 49 años, y adultos mayores de 65 años), se promulgó la modificación del Reglamento Sanitario de Alimentos Chileno (DS 977, 1996, última versión de 26 diciembre de 2023), pasando a ser obligatoria la fortificación con vitamina D3 (colecalfiferol) en leche líquida, leche en polvo y harinas desde mayo de 2024. Los datos disponibles señalan que la mayoría de la población se beneficiaría con la ingesta diaria de al menos 400 UI de vitamina D.

En la actualidad la mayoría de los expertos considera como deficiencia de vitamina D valores que se encuentran por debajo de los 20 ng/ml (<50 nmol/L), insuficiencia entre 21 y 29 ng/ml (50 - 74 nmol/L) y niveles óptimos o suficientes aquellos >30 ng/ml (>75 nmol/L). Sin embargo, no existe consenso universal al respecto y otros expertos como los del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH) consideran que niveles < 12 ng/ml (30 nmol/L) constituyen deficiencia.

Para su cuantificación, los laboratorios clínicos en Chile utilizan métodos automatizados, en su mayoría basados en las técnicas de Inmunoensayo por Electroquimioluminiscencia (ECLIA) o Inmunoensayo por Quimioluminiscencia (CLIA) y en menor medida por el método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) o Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Este último es considerado a nivel internacional el método de referencia (Gold Standard) para la determinación de vitamina D. No existen antecedentes, en Chile, del uso en laboratorios clínicos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con otro tipo de detectores para la cuantificación de vitamina D.

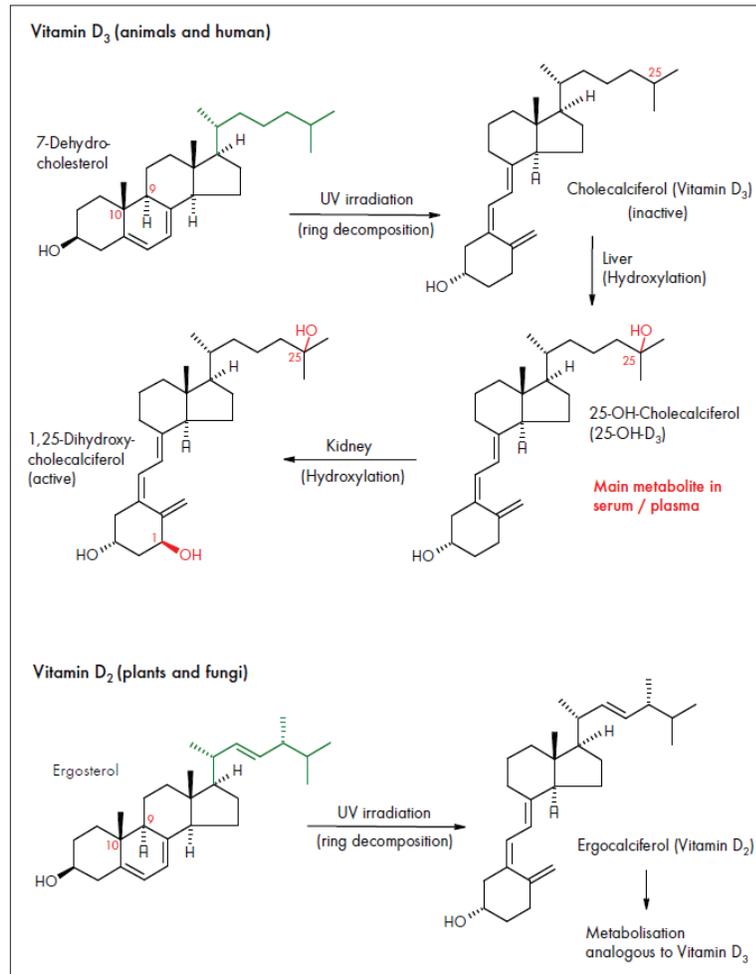
Los métodos utilizados actualmente han generado controversia, debido a que estudios inter-laboratorio han mostrado discordancias en los resultados entre las diferentes plataformas de métodos automatizados. Asimismo, se ha visto una variabilidad importante entre pruebas de inmunoensayo de distintos fabricantes o incluso de un mismo fabricante con diferentes tipos de plataformas. Esta variabilidad en las mediciones de vitamina D ha sido abordada en el ámbito internacional, donde se reconoce la necesidad de estandarizar los métodos para obtener ensayos precisos y reproducibles. En respuesta a esta necesidad, la Oficina de Suplementos Dietéticos del Instituto Nacional de Salud estadounidense (NIH) en colaboración con el NIST (National Institute of Standards and Technology), CDC (Centers for Disease Control and Prevention) de Estados Unidos y la Universidad de Gante (Bélgica) desarrollaron el Programa de Estandarización de vitamina D (VDSP), un programa internacional diseñado para promover la medición estandarizada de 25(OH) vitamina D.

#### 4.1. Metabolismo de la Vitamina D

La vitamina D se encuentra en la naturaleza de dos formas: ergocalciferol o vitamina D<sub>2</sub> y colecalciferol o vitamina D<sub>3</sub>. En los humanos la mayoría de la vitamina proviene de la transformación cutánea del 7-dehidrocolesterol en colecalciferol ante la presencia de la luz solar. Durante la exposición a la luz ultravioleta de longitud de onda entre 290-315 nm, los fotones son absorbidos por el 7-dehidrocolesterol de la membrana de las células de la epidermis y la dermis. La absorción de la radiación ultravioleta abre el anillo B del 7-dehidrocolesterol, formando el precolecalciferol. Esta sustancia es inestable y rápidamente se convierte en colecalciferol. A medida que la vitamina D<sub>3</sub> se sintetiza, se libera al espacio extracelular y penetra en el lecho vascular de la dermis. Luego, unida a la proteína transportadora de vitamina D, el colecalciferol llega al hígado. Además de la síntesis cutánea, la vitamina D puede obtenerse a partir de los alimentos, tanto de origen animal (colecalciferol) como de origen vegetal (ergocalciferol).

La vitamina D<sub>3</sub> ingerida a través de la alimentación o producida en la piel es hidroxilada en el hígado, convirtiéndose en 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> (25-hidroxicolecalciferol, calcidiol). Este metabolito, que constituye la forma almacenada de la vitamina D, circula unido a una proteína enlazadora de vitamina D (DBP) por el torrente sanguíneo. La 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> es el metabolito con mayor concentración en el suero y es una magnitud clínico-química reconocida para el diagnóstico de deficiencia de vitamina D por su estabilidad. La 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> es transportada a continuación al riñón, donde es hidroxilada por una monooxigenasa a 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamina D<sub>3</sub> (1,25-dihidroxicolecalciferol, calcitriol). Este metabolito es la forma biológicamente activa de la vitamina D y que ejerce las funciones de hormona al unirse al receptor de vitamina D. Las últimas investigaciones muestran que el calcitriol también se produce en otras células y tejidos, controlando allí el crecimiento celular, por tanto, también participa en el control de procesos carcinogénicos. Además de la 25(OH) vitamina D<sub>3</sub> y 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>3</sub>, se conocen otros 30 metabolitos más, la mayoría de ellos no tiene ninguna función fisiológica conocida, son tan solo productos de descomposición. (Figura 1).

Durante la suplementación con la vitamina D<sub>2</sub> menos activa, mediante la ingesta de vegetales y suplementos, se obtienen los metabolitos 25(OH) vitamina D<sub>2</sub> (25-hidroxi ergocalciferol) que es el analito relevante para el diagnóstico, y el metabolito activo 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sub>2</sub>. En algunos países, los suplementos con vitamina D<sub>2</sub> son de uso más frecuente para el tratamiento de la deficiencia de la vitamina D. En estos casos, la detección de ambas moléculas (Vitamina D<sub>3</sub> y D<sub>2</sub>) es importante, para descartar una valoración errónea del estado de la vitamina D. (Figura 1).

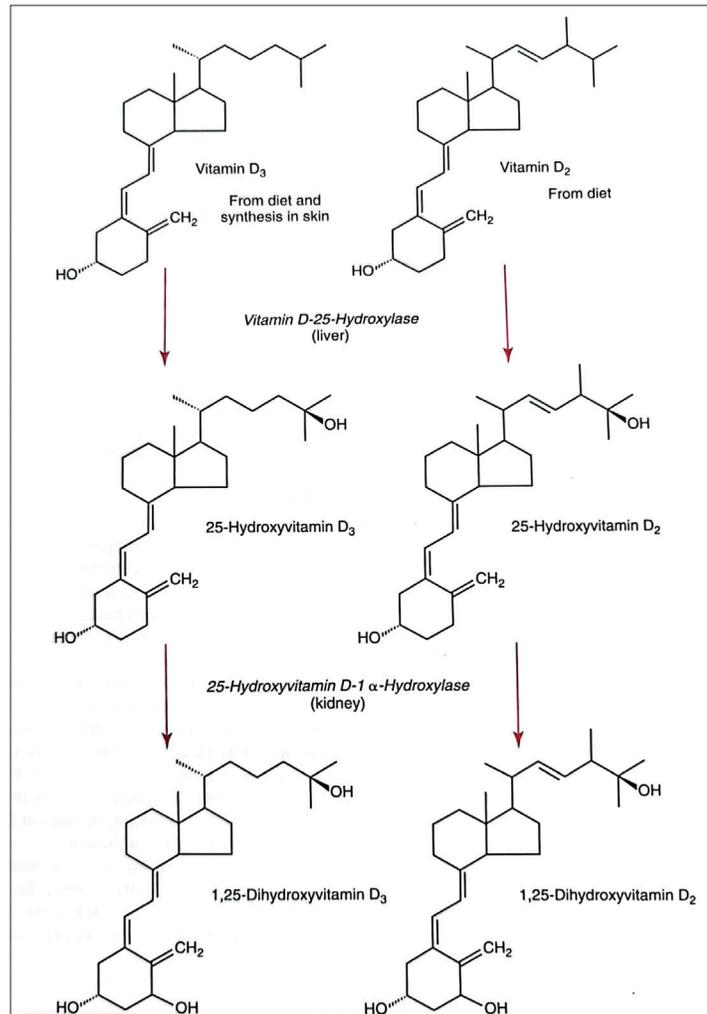


**Figura 1.**

Biosíntesis y metabolismo de la vitamina D. Fuente: *Instruction Manual for LC-MS/MS Analysis, MassChrom, 25-OH-Vitamin D3/D2 in serum/plasma, Germany, 2014.*

Al ser sustancias liposolubles, las moléculas de vitamina D requieren la presencia de sales biliares para su absorción. Se absorben el 80% de la dosis administrada fundamentalmente en el yeyuno, aunque también parcialmente en el duodeno. Una vez ejercida su acción, la vitamina D se inactiva en el hígado mediante una gluco y sulfoconjugación. Se elimina prácticamente en su totalidad por vía biliar, sufriendo un ciclo enterohepático.

En el riñón también se produce la 24,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D por la acción de la 24-hidroxilasa. Esta vitamina es mucho menos activa. Su papel biológico no es del todo conocido. Las directrices de la Fundación Nacional del Riñón estadounidense (NKF) han hecho énfasis en que el estado nutricional de la vitamina D se debe evaluar por 25(OH) vitamina D y no por 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D. Tampoco está indicado en la determinación de rutina de vitamina D, la determinación de 24,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D u otros metabolitos. (Figura 2).

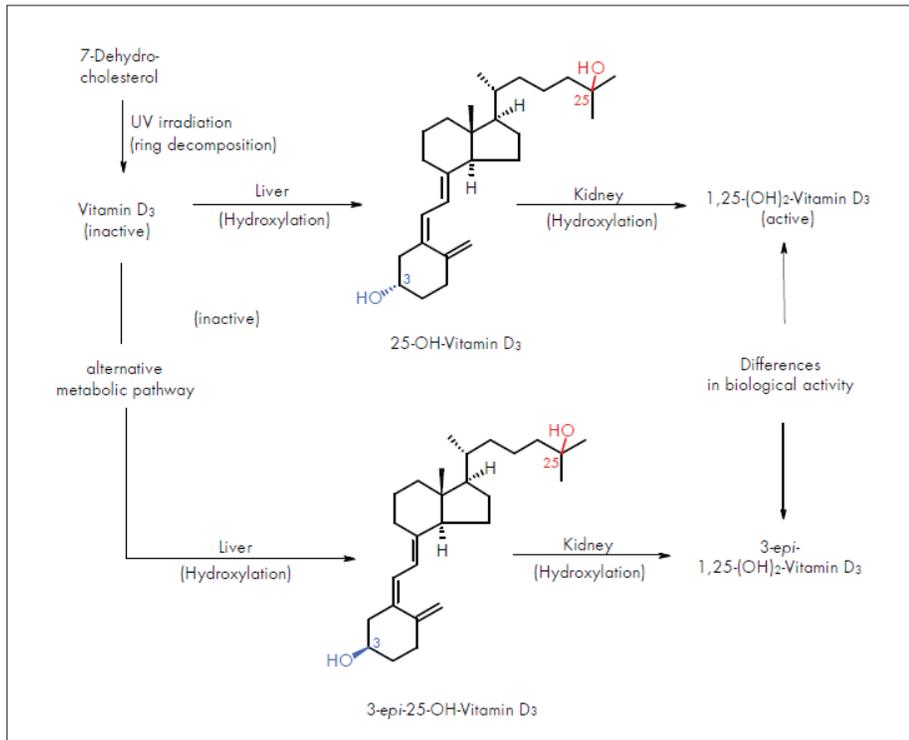


**Figura 2.**

Metabolismo de vitamina D. La vitamina D<sub>2</sub> y vitamina D<sub>3</sub> son hidroxiladas enzimáticamente a 25-hidroxi vitamina D en el hígado y luego a 1,25 dihidroxivitamina D<sub>3</sub> y 1,25 dihidroxivitamina D<sub>2</sub> en el riñón, las formas biológicamente activas de vitamina D. Fuente: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.

Además de las formas anteriormente mencionadas, existen las formas epímeras de vitamina D. En química, los epímeros son estereoisómeros o moléculas que tienen la misma fórmula molecular y la misma secuencia de átomos enlazados, con los mismos enlaces entre sus átomos, pero difieren en la orientación tridimensional de sus átomos en el espacio. Tienen una configuración diferente en uno solo de sus centros estereogénicos, específicamente en sus carbonos 2, 3 o 4. El epímero C3 de vitamina D o también llamado 3-epi-25(OH) vitamina D es un estereoisómero de la 25(OH) vitamina D. Dado que las formas epímeras de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub>/D<sub>2</sub>, así como sus metabolitos pueden aparecer en cantidades significativas, sobre todo en niños pequeños, se supone que el motivo de su presencia es que el metabolismo de la vitamina D aún no ha madurado (Figura 3).

Si bien las vías metabólicas no han sido aclaradas todavía de forma definitiva, estas formas menores de vitamina D podrían interferir en la cuantificación de la 25(OH) vitamina D y por consiguiente en la vitamina D total en diferente medida en las diferentes plataformas de inmunoensayo automatizado.



**Figura 3.**

Biosíntesis y metabolismo del epímero C3 con el ejemplo de la 3-epi-25-OH-D3. Fuente: *Instruction Manual for LC-MS/MS Analysis, MassChrom, 25 – OH-Vitamin D3/D2 in serum/plasma, Germany, 2014.*

## 4.2 Fisiología de la Vitamina D

Las acciones de la vitamina D son múltiples. Actúa a través del receptor específico perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares hormonales (VDR). Regula la transcripción génica por homodimerización y heterodimerización con el receptor X (RXR), receptor específico del ácido 9-cis-retinoico. El elemento de respuesta al que se une el dímero VDR-RXR se denomina elemento de respuesta a vitamina D (VDRE). El complejo se une al ADN y regula la transcripción de diversos genes.

La acción principal de la vitamina D consiste en aumentar la absorción intestinal de calcio y fósforo. En el intestino, estimula el reclutamiento de los canales de calcio presintetizados hasta el borde en cepillo del enterocito. Además, induce la expresión de proteínas transportadoras de calcio o calbindinas, cuya función consiste en el paso del calcio a través del enterocito. Por último, facilita la entrada de calcio a la circulación desde la zona basolateral de la célula del intestino, mediante una bomba ATP dependiente de vitamina D. En el hueso, la vitamina D estimula directamente, mediante su unión al receptor VDR, la diferenciación de osteoblastos y la producción de proteínas de unión al calcio óseo, como la osteocalcina y la osteopontina. También, actuando sobre los osteoblastos, induce la producción de citoquinas y factores de crecimiento, que estimulan la actividad y la formación de los osteoclastos. Además, promueve la diferenciación de condrocitos. En definitiva, por todas estas acciones, la vitamina D aumenta la actividad y el número de osteoclastos, movilizándolo calcio óseo. Por último, en el riñón aumenta la reabsorción de calcio por un mecanismo similar al descrito a nivel intestinal. El calcitriol incrementa los niveles del transportador de membrana, aumenta los niveles de calbindinas para el transporte transcelular y activa el paso de calcio a través de la membrana basolateral. La producción hepática de 25 (OH) vitamina D es sustrato dependiente y no está regulada hormonalmente. Por el contrario, la síntesis de 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D se estimula por la hormona paratiroidea (PTH), hipocalcemia e hipofosfatemia. Además, las hormonas sexuales, prolac-

tina, hormona de crecimiento (GH) y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) aumentan la producción renal del metabolito activo. La hipocalcemia aumenta la producción de 1,25 (OH)<sub>2</sub> vitamina D inducida por PTH, para mantener los niveles de calcio plasmático dentro de la normalidad. Por el contrario, la hipercalcemia reduce la síntesis de la vitamina D. Además, la disminución de la fosfatemia aumenta y su incremento reduce la producción de la vitamina D activa.

### 4.3 Medición de vitamina D en el organismo

Inicialmente es necesario aclarar qué se entiende por la medida de vitamina D total (25(OH) vitamina D total); esta medida consiste en la suma de 25(OH) vitamina D3 más 25(OH) vitamina D2.

La concentración total de 25(OH) vitamina D se informa comúnmente en los EE.UU en unidades de nanogramos por mililitro (ng/mL) y en otros lugares, en unidades de nanomoles por litro (nmol/L). La concentración plasmática/sérica en ng/ml puede convertirse en nmol/L usando la fórmula:

$$\text{Concentración de vitamina D (ng/ml)} \times 2,5 \approx \text{Concentración de vitamina D (nmol/L)}.$$

En Chile los laboratorios clínicos informan su concentración como 25 (OH) vitamina D total en unidades de ng/mL incluyéndose en algunos casos su equivalencia en Unidades del SI (nmol/L).

En los insertos de las técnicas utilizadas en los laboratorios clínicos y las concentraciones declaradas de los calibradores y controles comerciales se pueden encontrar, dependiendo del fabricante y país de origen, alguna de estas Unidades de concentración.

Para evaluar el estado nutricional de vitamina D se realiza la medición de 25(OH) vitamina D ya que es la forma principal y más duradera circulante en plasma, tal como se muestra en la Tabla 1.

Compuesto	Concentración	% libre	Vida media
Vitamina D	< 0,2 – 20 ng/mL	-	1 – 2 días
25 (OH) vitamina D	10 – 65 ng/mL	0,03	2 semanas
1,25 dihidroxivitamina D	15 – 60 pg/mL	0,4	4 – 6 horas

**Tabla 1.**

*Vitamina D y sus metabolitos en plasma. Fuente: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 5ta Edición.*

El valor obtenido de concentración plasmática de 25(OH) vitamina D indica si los depósitos son suficientes, insuficientes o existe un nivel tóxico. La vida media de la 25(OH) vitamina D es de aproximadamente dos semanas. Aunque es la hormona activa, la medida de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D no se debe utilizar para cuantificar los niveles de vitamina, ya que su vida media es menor de 4 horas, circula en sangre con una concentración 1.000 veces menor que 25(OH) vitamina D y lo que es más importante, está estrechamente regulada.

La determinación de 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D puede ser necesaria en casos particulares de insuficiencia renal, hipoparatiroidismo, pseudohipoparatiroidismo, tamizaje de hipercalcemia, entre otros. Esta determinación es más complicada que la de 25(OH) vitamina D, debido a que la concentración es mucho más pequeña y su estabilidad menor.

#### 4.4. Deficiencia e insuficiencia de vitamina D.

Actualmente no existe un consenso definitivo que establezca el nivel óptimo de vitamina D. No obstante, la mayoría de los expertos consideran como deficiencia aquellos valores que se encuentran por debajo de los 20 ng/ml (<50 nmol/L) y definen valores de insuficiencia aquellos entre 21 y 29 ng/ml (50-74 nmol/L). La mayoría de los estudios publicados cifra el valor de >30 ng/ml (>75 nmol/L) como el óptimo o suficiente para vitamina D. Sin embargo, se discute en la actualidad subir este valor inferior (se ha propuesto 40 ng/ml como medida que asegure funciones óseas óptimas y funciones metabólicas y endocrinas). Por otra parte otras autoridades como el NIH fijan el nivel de deficiencia en <12 ng/ml dado que bajo esta cifra disminuye la consolidación ósea y aumenta el riesgo de enfermedades osteometabólicas. Por lo tanto, se mantiene la incerteza de cuál es el nivel normal y óptimo en seres humanos. También existe relativo consenso para el límite de toxicidad por vitamina D, fijándose en >150 nmol/L (>60 ng/mL).

#### 4.5. Métodos para la cuantificación.

Los primeros métodos de rutina para medir las concentraciones de 25(OH) vitamina D en plasma/suero humano se basaban en la unión competitiva de proteínas y utilizaban proteína de unión a vitamina D y un marcador trazado con tritio. Estos métodos fueron reemplazados por un RIA (radioinmunoensayo) más simple y rápido y en 1993 se incorporó al RIA un marcador radioyodado, siendo este principio de ensayo la base de varios métodos disponibles comercialmente. En la actualidad existen varias metodologías disponibles para uso en el laboratorio clínico, entre ellas las que se mencionan sus fundamentos técnicos en la Tabla 2.

METODOS	FUNDAMENTOS TECNICOS
Inmunoensayo por Quimioluminiscencia (CLIA)	1.- Ensayo de un solo paso retrasado, que usa como agente de captura un anticuerpo policlonal anti-vitamina D y una anti-biotina de vitamina D biotinilada complejo marcado con acridinio.
	2.- Ensayo competitivo que utiliza un anticuerpo anti-25(OH)-vitamina D, donde la vitamina D y un derivado marcado con isoluminol compite por la unión al anticuerpo en una fase sólida.
	3.- Ensayo competitivo que utiliza un anticuerpo monoclonal anti-25(OH) vitamina D marcado con acridinio y un análogo de vitamina D marcado con fluoresceína.
	4.- Ensayo competitivo usando un anticuerpo anti-25(OH) vitamina D conjugado con acridinio, con 25-(OH) vitamina D conjugado a partículas magnéticas.
	5.- Ensayo competitivo que incluye la liberación de la 25(OH) vitamina D en la muestra de la proteína fijadora usando un desnaturizante de pH bajo y la posterior competición de la 25(OH) vitamina D libre con reactivo de 25(OH) vitamina D marcado con peroxidasa de rábano (HRP) para la vitamina D monoclonal unida a los pocillos. El conjugado de HRP unido se mide mediante una reacción luminiscente. Las señales luminosas son leídas por el sistema. La cantidad de conjugado marcado con HRP unido es indirectamente proporcional a la concentración de 25-OH vitamina D.
Inmunoensayo por Electroquimioluminiscencia (ECLIA)	Ensayo que utiliza como proteína de captura una proteína fijadora de vitamina D marcada con quelato de rutenio que se liga a la 25-hidroxitamina D3 y a la 25-hidroxitamina D2. La reactividad cruzada frente a la 24,25-dihidroxitamina D está bloqueada por un anticuerpo monoclonal específico.

<p>ELFA (ensayo fluorescente ligado a enzimas)</p>	<p>El principio del ensayo combina un método de competición de inmunoensayo enzimático con una detección fluorescente final. Utiliza un anticuerpo antivitamin D (conjugado) marcado con fosfatasa alcalina (ALP). El antígeno de vitamina D presente en la muestra y el antígeno de vitamina D compiten por los sitios de unión en el conjugado anticuerpo antivitamin D-ALP. La enzima conjugada cataliza la hidrólisis del sustrato fosfato de 4-metilumbeliferil en un producto fluorescente (4-metilumbeliferona), cuya fluorescencia se mide a 450 nm. La intensidad de la fluorescencia es inversamente proporcional a la concentración de antígeno de vitamina D presente en la muestra.</p>
<p>Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).</p>	<p>El método de referencia implementado por el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) para la 25-hidroxivitamina D total. Utiliza cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. Cuantifica por separado 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3 (Vitamina D total) y otros isómeros por separado como el 3-epi-25-hidroxivitamina D3. El método tiene un alto nivel de especificidad y selectividad y no se ve afectado por otros isómeros de la vitamina D. Existen métodos comerciales (kits) que utilizan esta técnica con distintos niveles de especificidad y selectividad.</p>

**Tabla 2.**

*Métodos y fundamentos técnicos de cuantificación de Vitamina D.*

Si bien la aplicación clínica de LC-MS/MS ha mejorado la sensibilidad y selectividad en la determinación de 25(OH) vitamina D, los coeficientes de variación siguen siendo altos (~20%) entre los distintos laboratorios que la emplean debido a la falta de métodos de análisis estandarizados para el análisis de vitamina D, ya que son métodos complejos y, generalmente, muy dependientes del operador.

En este contexto, la problemática respecto de la variabilidad en las mediciones de vitamina D ha sido abordada en el ámbito internacional, donde se reconoce la necesidad de estandarizar los métodos, no siendo una tarea sencilla ni económica. Sin embargo, dado lo que parece ser una epidemia de hipovitaminosis D y sus posibles consecuencias esqueléticas y no esqueléticas, es altamente beneficioso para las personas que la comunidad médica defina un umbral para el estado óptimo de vitamina D utilizando ensayos precisos y reproducibles. Es así que en respuesta a esta necesidad y con la finalidad de mejorar la clínica y la salud pública a nivel mundial, se establece en el 2010 por la Oficina de Suplementos Dietéticos de los NIH en colaboración con el NIST, CDC y la Universidad de Gante (Bélgica) el Programa de estandarización de vitamina D (VDSP), un programa internacional diseñado para promover la medición estandarizada de 25(OH) vitamina D.

Si bien actualmente existen kits comerciales que están validados para la determinación de 25(OH) vitamina D3/D2, por la técnica LC-MS/MS, estudios internacionales muestran una variabilidad considerable entre los resultados producidos por los laboratorios que miden la 25-hidroxivitamina D. En este contexto los parámetros de exactitud y precisión han mejorado en los últimos años, sobre todo gracias a los esfuerzos del VDSP para motivar a los fabricantes de kits de métodos por inmunoensayo, fabricantes de kits por LC-MS/MS a calibrar sus métodos con respecto al RMP (procedimiento de medición de referencia del CDC por LC-MS/MS) y los SRM (materiales de referencia estándar del NIST). Más adelante se explicará con mayor detalle los objetivos y diseño de este programa.

En abril de 2016, el sesgo (como diferencia porcentual respecto al valor asignado considerado como el valor verdadero de la muestra medido con el método de referencia LC-MS/MS del CDC) y el %CV (dispersión de los datos medida como precisión) de la mayoría de los métodos evaluados en el VDSP estaban dentro o cerca de  $\pm 5\%$  de sesgo y 10% de CV, que corresponden a los límites adoptados por el VDSP. Sin

embargo, la variabilidad del sesgo entre muestras sigue siendo obstinadamente alta, particularmente en los ensayos de unión de ligandos. Esto puede deberse a una recuperación insuficiente de 25(OH) vitamina D2 mediante algunos métodos, a interferencias no específicas de otros componentes del suero como los lípidos (efectos de matriz) o a la reactividad cruzada de otros metabolitos de la vitamina D, particularmente 24,25(OH)2 vitamina D. La estrecha correlación entre 24,25(OH)2 vitamina D y 25(OH) vitamina D probablemente contribuye al sesgo dependiente de la concentración de la mayoría de los inmunoensayos de 25(OH) vitamina D. Se cree que una correlación similar entre 3-epi-25(OH) vitamina D y 25(OH) vitamina D explica el sesgo positivo pequeño pero constante de los ensayos LC-MS/MS. De acuerdo a lo anterior, al revisar la información disponible en la página [www.westgard.com](http://www.westgard.com); se hace referencia al artículo D.Stöckl, et al. Del 2009 titulado Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis, donde se muestran los resultados de cuatro modelos diferentes para establecer especificaciones de calidad para una prueba 25(OH) vitamina D. En la Tabla 3 se muestra la revisión del estado del arte respecto del desempeño de los procedimientos de medida publicado en la literatura y que son utilizados actualmente para análisis de 25(OH) vitamina D (por ejemplo, inmunoensayo, HPLC y LC-MS/MS). En ella se observan los %CV como una medida de la imprecisión analítica de los métodos a una concentración determinada expresada en ng/mL.

Metodología	CV % (a ng/mL)
Inmunoensayo 1	3,2% (14,4) 9,6% (59,6)
Inmunoensayo 2	< 15% (17,2 – 55,2)
Radioinmunoensayo	< 12,5% (8,6 – 49,2)
Inmunoensayo 3	9,9% (25,2) 6,9% (65,6)
Inmunoensayo 4	8,2% (8,0) 7,3% (54,4)
HPLC 1	5,7% (8,0 – 51,2)
HPLC 2	7,3% (6,56) 6,3% (19,0)
ID-LC/MS/MS 1	12% (6,0) 7,8% (26,4)
ID-LC/MS/MS 2	6,3% (13,2)
ID-LC/MS/MS 3	10,2% (20,8)
LC/MS/MS	8-10% (-)
ID-LC/MS/MS 4	2,5% (18,4)
ID-LC/MS/MS 5	5,1% (22,0)
ID-LC/MS/MS 6	11% (13,6)

**Tabla 3.**

*Datos de imprecisión analítica (%CV) y concentración (ng/mL), según las distintas metodologías, donde una misma metodología que es indicada más de una vez cuenta con un número, esto en referencia a los diferentes autores que han proporcionado la información para un mismo método. (Clin Chim Acta, v.408, p. 8-13)*

En este contexto, se hace relevante que los laboratorios clínicos revisen la información contenida en los insertos de los fabricantes de los distintos métodos relacionada a la existencia de datos sobre la trazabilidad de la técnica. Es decir, la trazabilidad de los valores declarados de los calibradores comerciales a un SRM del NIST y con el método de referencia y su reactividad cruzada con otros metabolitos de vitamina D.

La medición de 25(OH) vitamina D determinada por distintos métodos de inmunoensayo presenta reactividad cruzada del 100% con 25(OH) vitamina D<sub>3</sub>, y reactividad cruzada variable con 25(OH) vitamina D<sub>2</sub>, los epímeros C<sub>3</sub> y otros compuestos que pueden interferir, dependiendo de las características de la reacción antígeno-anticuerpo.

A continuación, se muestra a modo de ejemplo un resumen de reactividad cruzada media de algunos métodos de ensayo:

Precusores y metabolitos de Vitamina D	Métodos			
	CLIA 1	CLIA 2	CLIA 3	ECLIA
25-OH Vitamina D <sub>3</sub>	105%	100%	105%	100%
25-OH Vitamina D <sub>2</sub>	52%	100%	101%	93,7%
Vitamina D <sub>3</sub> (Colecalciferol)	0,3%	1,9%	0,3%	0,7%
Vitamina D <sub>2</sub> (Ergocalciferol)	0,1%	1,9%	0,5%	0,3%
1,25 OH Vitamina D <sub>3</sub>	12,6%	9,3%	1%	n.d.
1,25 OH Vitamina D <sub>2</sub>	-	6,7%	4%	n.d.
24,25 OH Vitamina D <sub>3</sub>	112%	-	-	13,7%
3-epi-25-OH Vitamina D <sub>3</sub>	2,7%	1,3%	1,1%	112,8%
3-epi-25-OH Vitamina D <sub>2</sub>	-	-	-	91,4%
Paricalcitol (Zemplar®)	0,4%	-	0,1%	-

**Tabla N°4.**

Porcentaje de reactividad cruzada de métodos de ensayo.

**4.5 Programa de Certificación - Estandarización de la medición de vitamina D del CDC**

En el contexto de la vitamina D, una medición de laboratorio estandarizada de 25(OH) vitamina D total es aquella que es precisa y comparable en el tiempo, la ubicación y el procedimiento de laboratorio con los valores obtenidos utilizando procedimientos de medición de referencia (RMP) desarrollados en el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) y Universidad de Gante. Los procedimientos de medición de referencia son métodos de laboratorio que se han considerado conformes con las pautas desarrolladas por la Organización Internacional de Normalización (ISO) y están enumerados en la base de datos del Comité Conjunto para la Trazabilidad en Medicina de Laboratorio. Son los procedimientos de laboratorio “Gold Standard” para medir 25(OH) vitamina D; es decir, los valores de concentración obtenidos utilizando el los procedimientos de medición de referencia del NIST, la Universidad de Gante y el CDC se consideran las concentraciones verdaderas. Por lo tanto, la estandarización de los métodos desarrollados por los fabricantes conducirá a que todos los laboratorios que los utilizan informen la concentración real de 25(OH) vitamina D total medida.

El VDSP es una empresa de colaboración organizada en 2010 por la Oficina de Suplementos Dietéticos (ODS) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH). Esta colaboración implica los esfuerzos coordinados de ODS, el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC), el Programa de Evaluación Externa de la Calidad de la Vitamina D (DEQAS), el Colegio de Patólogos Estadounidenses (CAP), la Asociación Estadounidense de Química Clínica (AACC), la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC), además de encuestas nacionales y colaboradores de todo el mundo.

Cuando los fabricantes de procedimientos de laboratorio han participado y demostrado el cumplimiento de la exactitud y precisión del programa, obtienen un Certificado motivo por el cual este programa se denomina en la actualidad Programa de certificación y estandarización de la vitamina D del CDC (VDSCP, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, una prueba de laboratorio estandarizada es una prueba que demostró, a través de una evaluación independiente e imparcial, un desempeño analítico, tal como exactitud y precisión, que cumple con metas específicas de desempeño analítico.

Los objetivos del VDSCP, son:

- Estandarizar la medición por un sistema de medición de referencia basado en los materiales de referencia estándar y los procedimientos de medición de referencia (RMP) del NIST, la Universidad de Gante y el CDC;
- Promover la medición estandarizada de 25(OH) vitamina D en:
  - Procedimientos de laboratorio desarrollados comercialmente.
  - Procedimientos de laboratorio clínico y de investigación.
- Estudiar las diferencias en los datos de 25(OH) vitamina D encontradas entre las encuestas nacionales de salud estandarizadas en todo el mundo.
- Llevar a cabo un programa de investigación internacional dedicado a mejorar la medición de laboratorio de 25(OH) vitamina D.
- Realizar un estudio de conmutabilidad de muestras de pruebas de aptitud, como por ejemplo DEQAS (vitamin D External Quality Assessment Scheme), donde los participantes pueden evaluar la exactitud de sus resultados comparándolos con un método de referencia reconocido internacionalmente.

Los pasos principales que ha llevado a cabo el VDSCP para la estandarización han sido los siguientes (Figura 4):

- Desarrollar un sistema de referencia;
- Establecer trazabilidad metrológica;
- Verificar el desempeño de la prueba del “usuario final” (por ejemplo un método comercial).



**Figura 4.**

*Pasos del VDSCP hacia la estandarización. Los pasos principales para la estandarización son los siguientes: (1) Desarrollar un sistema de referencia; (2) establecer trazabilidad metrológica; y (3) Verificar el desempeño de la prueba del "usuario final". (1) Sistema de referencia: los componentes clave de un sistema de referencia son el desarrollo de procedimientos de medición de referencia y la preparación de materiales adecuados que puedan usarse para establecer la trazabilidad. Estos pueden incluir la asignación de valores objetivo a muestras de suero de un solo donante preparadas utilizando pautas para asegurar la conmutabilidad; desarrollo de materiales de referencia estándar (marca registrada de NIST y materiales de referencia certificados; y desarrollo de programas EQA/PT basados en la exactitud. (2) Los materiales luego se pueden utilizar para establecer la trazabilidad entre laboratorios que no utilizan un RMP y aquellos que sí lo hacen. (3) Verificar el rendimiento de la prueba del "usuario final" es esencial para desarrollar la coherencia entre los ensayos. Este paso puede incluir un proceso de certificación como en el Programa de certificación de estandarización del CDC o, de una manera algo menos costosa y menos rigurosa, EAQ/PT. (es decir, las encuestas DEQAS y CAP EQA/PT) se pueden utilizar para evaluar el desempeño del "usuario final" y la coherencia entre las encuestas. Dado el costo de participar en un programa como el del CDC, que requiere una participación de certificación anual en DEQAS y/o CAP es un paso esencial en el esfuerzo de estandarización. VDSCP = Programa de estandarización de vitamina D; NIST = Instituto Nacional de Estándares y Tecnología; EQA/PT = evaluación externa de calidad-pruebas de desempeño; RMP = procedimiento de medición de referencia; CDC = Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades; DEQAS = Esquema de Evaluación Externa de la Calidad de la Vitamina D; CAP = Colegio de Patólogos Americanos. Fuente: Binkley, 2014.*

El laboratorio de referencia de vitamina D del CDC utiliza un método de referencia con alta exactitud y precisión para medir la 25-hidroxivitamina D2 y la 25-hidroxivitamina D3 (total de 25-hidroxivitamina D). Utiliza este método de referencia para asignar valores de referencia a las muestras de suero. Este se calibra utilizando material de referencia certificado (SRM 2972a NIST). Por lo tanto, los resultados de medición obtenidos con este método de referencia son trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI), de acuerdo con el estándar de la Organización Internacional de Normalización (ISO) para la trazabilidad en medicina de laboratorio.

Lo que logra este sistema es establecer una cadena ininterrumpida de trazabilidad entre el RMP y los ensayos utilizados en los laboratorios clínicos y de investigación para determinar las concentraciones totales de 25 (OH) vitamina D. La trazabilidad garantiza que los resultados de 25(OH) vitamina D del laboratorio clínico y de investigación sean equivalentes al resultado que se obtendría utilizando el RMP. De este modo,

los ensayos de rutina se calibran o estandarizan según el RMP, y miden e informan la concentración real de 25 (OH) vitamina D total.

Un paso esencial es verificar el desempeño del “usuario final” (laboratorios clínicos) para garantizar la coherencia entre los diferentes tipos de ensayos. El desempeño del usuario final se puede establecer obteniendo la Certificación a través del VDSCP. Sin embargo, debido al costo, el programa se recomienda principalmente para los fabricantes de ensayos comerciales y grandes laboratorios comerciales/clínicos. Otros laboratorios clínicos y de investigación pueden establecer el desempeño de usuario final participando en pruebas de desempeño basadas en la precisión/exactitud, como las proporcionadas por CAP y DEQAS.

La evaluación del desempeño del “usuario final” requiere el establecimiento de criterios de desempeño cuantitativos. El VDSCP aboga por límites de rendimiento tanto para los laboratorios de referencia como para los de rutina estimados por Stöckl et al, 2009 (Tabla 4). Para los laboratorios de rutina, estos límites de rendimiento actuales son CV  $\leq 10\%$  y sesgo  $\leq 5\%$ .

Mediciones	CV (%)	Sesgo (%)
Laboratorios de Referencia	$\leq 5\%$	$\leq 1,7\%$
Laboratorios de rutina	$\leq 10\%$	$\leq 5\%$

\* Stöckl D et al. *Clínica Química Acta* 2009;408:8–13.

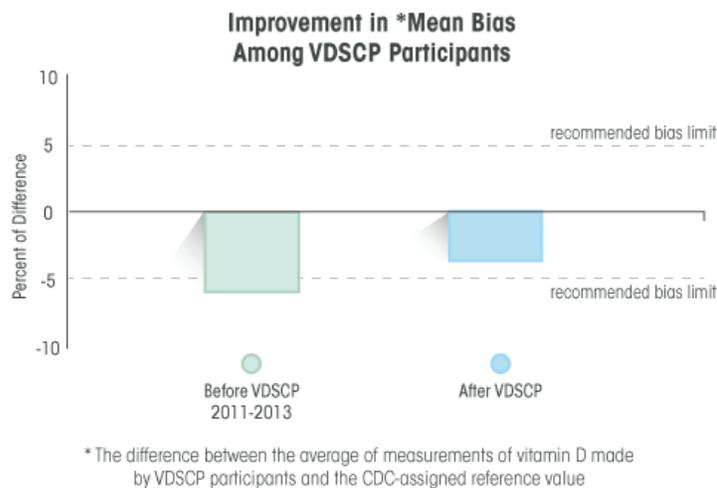
**Tabla 4.**

*Límites de desempeño del VDSCP basados en la variación biológica (Stock et al, 2009).*

De esta forma el VDSCP cumple con los siguientes objetivos:

- Mejora la detección y el diagnóstico de enfermedades óseas al garantizar que las pruebas de laboratorio de vitamina D sean precisas y confiables.
- Proporciona mediciones de referencia para la 25-hidroxivitamina D total (suma de 25-hidroxivitamina D2 y 25-hidroxivitamina D3).
- Evalúa la exactitud y precisión de las pruebas de vitamina D y monitorea su desempeño a lo largo del tiempo.
- Brinda soporte técnico a programas externos de garantía de calidad, programas de pruebas de competencia y estudios de investigación que garanticen que las pruebas de vitamina D sean precisas y confiables.

En la Figura 5 se observa una mejora en el sesgo (menor % de diferencias) de los valores informados por los participantes (principalmente fabricantes), respecto al valor asignado por el método de referencia de la Vitamina D.



**Figura 5.**

Mejora en el sesgo medio entre los participantes del VDSCP.

Fuente: <https://www.cdc.gov/labstandards/csp/vdscp.html>

Los fabricantes certificados son aquellos que cumplen con los criterios de rendimiento analítico del CDC, el que emite un Certificado para cada sistema analítico evaluado. La fecha utilizada en el certificado como “Fecha de certificación” indica cuándo se recopilaron y analizaron estadísticamente los datos de laboratorio en CDC. Los certificados para fabricantes caducan 1 año después de su fecha de certificación.

Es altamente recomendable que los Directores Técnicos de los Laboratorios Clínicos de Chile revisen el listado de participantes/fabricantes con ensayos de Vitamina D Certificados por VDSCP, el cual se puede consultar en la página web [https://www.cdc.gov/labstandards/csp/vdscp\\_participants.html](https://www.cdc.gov/labstandards/csp/vdscp_participants.html)

El Instituto de Salud Pública a través del Laboratorio Nacional y de Referencia de Química Clínica realiza el Subprograma de Evaluación Externa de la Calidad de Hormonas, en el cual está incluida la Vitamina D como un analito a evaluar desde el año 2020, ese año participaron 69 laboratorios y actualmente participan alrededor de 150 laboratorios sólo para este analito. Para evaluar el desempeño de los participantes, los datos se agrupan previamente en equipamiento o método y en caso de no formar grupos, por el total de respuestas del analito, a continuación se realiza el análisis estadístico para establecer mediante el consenso de los participantes y aplicando estadística robusta (Algoritmo A) un valor asignado con el cual se analizan los resultados individuales de cada laboratorio, para finalmente obtener un puntaje Z-score que permita asignar un desempeño.

## 5.- CONCLUSIÓN

En la actualidad, existen diferencias sustanciales en las mediciones de concentraciones séricas de 25(OH) vitamina D de laboratorios que utilizan técnicas de fabricantes no certificados en comparación con técnicas de fabricantes certificados, incluso entre laboratorios que utilizan la técnica LC-MS/MS.

Todos los laboratorios deben monitorear su desempeño con un sistema de aseguramiento de la calidad basado en la precisión, con controles de calidad internos de tercera opinión, participar en un programa externo de la calidad para evaluar su desempeño y deberían, idealmente, continuar con los esfuerzos de utilizar métodos de medición de Vitamina D de fabricantes certificados y solicitar esta información a los proveedores de las distintas plataformas.

Los profesionales del laboratorio clínico deben ser conscientes de las implicancias cuando se basan en mediciones de concentraciones séricas de 25(OH) vitamina D de un fabricante no certificado por VDSCP, de tal manera de considerar alternativas que permitan asegurar la trazabilidad de sus resultados.

Los laboratorios deberían contar con la información sobre la reactividad cruzada del método utilizado, esto con el fin de garantizar la precisión y exactitud en la medición de las concentraciones séricas de 25(OH) vitamina D total.

## 6.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lopez-Soboler, Ana M, et al. (2022). Impacto de la vitamina D en la salud. Dificultades y estrategias para alcanzar las ingestas recomendadas. *Nutr. Hosp.*, v. 39, n. spe3, p. 30-34.
2. Perez Bravo, Francisco. (2022). Alimentos y Vitamina D, Importancia de la fortificación en situación de deficit, INTA, Universidad de Chile. p. 53-55.  
Disponible en el enlace: <https://n9.cl/plmk1>.
3. Zanuy, MÁ Valero; Carranza, F. Hawkins. (2007). Metabolismo, fuentes endógenas y exógenas de vitamina D. *Revista Española de Enfermedades Metabólicas Óseas*, v.16(4), p. 63-70.
4. Souberbielle J, et al. (2003). The use in clinical practice of parathyroid hormone normative values established in vitamin D – sufficient subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* v.88, p. 3501-4.
5. Inserto, Instrucciones de uso, VITROS Immunodiagnostic Products 25-OH Vitamin D Total Reagent Pack, version 9.0.
6. Spears R, et al. (2015). The Value of a Standardized and Certified Vitamin D Total Assay for Clinical Confidence, ADVIA Centaur Vitamin D Total Posters.
7. Clinical Standardization Programs, Vitamin D Standardization-Certification Program, VDSCP (CDC). Disponible en el enlace: <https://n9.cl/65j5k>
8. DEQAS Review, 2016/2017. Disponible en el enlace: <https://n9.cl/1lqd5>.
9. CDC Vitamin D Standardization-Certification Program (CDC VDSCP), Certified Total 25-hydroxyvitamin D Assays from 2019 Q4 and forward. (2023). Disponible en el enlace <https://n9.cl/syi5q>.
10. Inserto, Elecsys Vitamin D total II, versión 6, 2022.
11. Folleto, LIAISON® 25 OH Vitamin D Total Assay. FOR OUTSIDE THE US AND CANADA ONLY.
12. Gammone MA, et al. (2022). Prevalence of 25(OH)D insufficiency and overweight/obesity in an adult population from the Central Italy. *Clin Ter.* v173(4): p. 334-341.
13. Tietz. *Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. Bruns. Fifth edition. Ed. Elsevier, 2012.
14. Instruction Manual for LC-MS/MS Analysis, MassChrom, 25 – OH-Vitamin D3/D2 in serum/plasma, Germany, 2014.
15. Stöckl, D, et al. (2009). Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clin Chim Acta*, v.408, p. 8-13.
16. Binkley, N, et al. (2004). Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab*, v.89, p. 3152-3157.
17. Carter, G.D, et al. (2018). Hydroxyvitamin D Assays: An Historical Perspective from DEQAS, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular* v.177, p. 30-35.
18. Roth, H.J, et al (2008), Accuracy and clinical implications of seven 25 hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography–tandem mass spectrometry as a reference, *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 153–159.
19. Inserto VIDAS 25OH Vitamin D Total (ELFA)
20. CT Sempos and N Binkley, 25-Hydroxyvitamin D assay standardisation and vitamin D guidelines paralysis, *Public Health Nutrition*: 23(7), 1153–1164.
21. Neil Binkley, M.D. and Christopher T. Sempos, Ph.D. for the Vitamin D Standardization Program (VDSP) Standardizing Vitamin D Assays: The Way Forward. *J Bone Miner Res.* 2014 August ; 29(8): 1709–1714.