

# Ensayos de la vitamina D: ¿qué es lo que realmente medimos?

---

Veronica I. Luzzi, PhD, DABCC  
Laboratorio Tricore

4 de Octubre

# Temas a cubrir

- ◇ Información básica
- ◇ Tipo de ensayos
- ◇ Discrepancias analíticas
- ◇ Esquemas de calidad
- ◇ Estandarización
- ◇ Conclusión

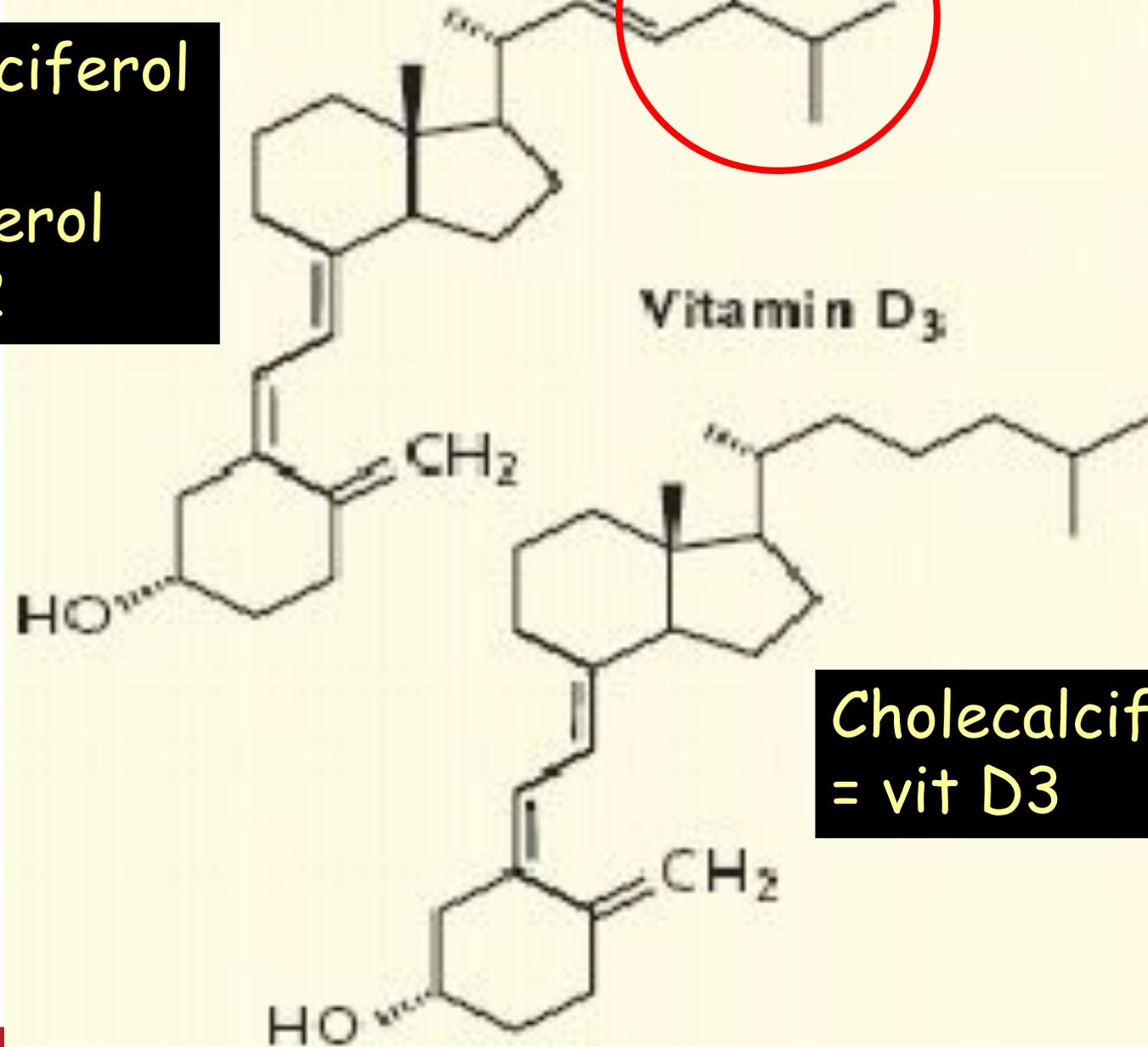
# El laboratorio en las noticias



Dr. Ronald L. Hoffman, un médico nutricionista, encontró valores de la vitamina D en el ensayo de Quest muy altos.

Vitamin D<sub>2</sub>

Ergocalciferol  
= vit D  
= calciferol  
= vit D<sub>2</sub>



# Metabolismo de la Vitamina D



Falta de vitamina D en niños:

## RAQUITISMO



Child with Rickets



www.peditips.com

14 5 2005

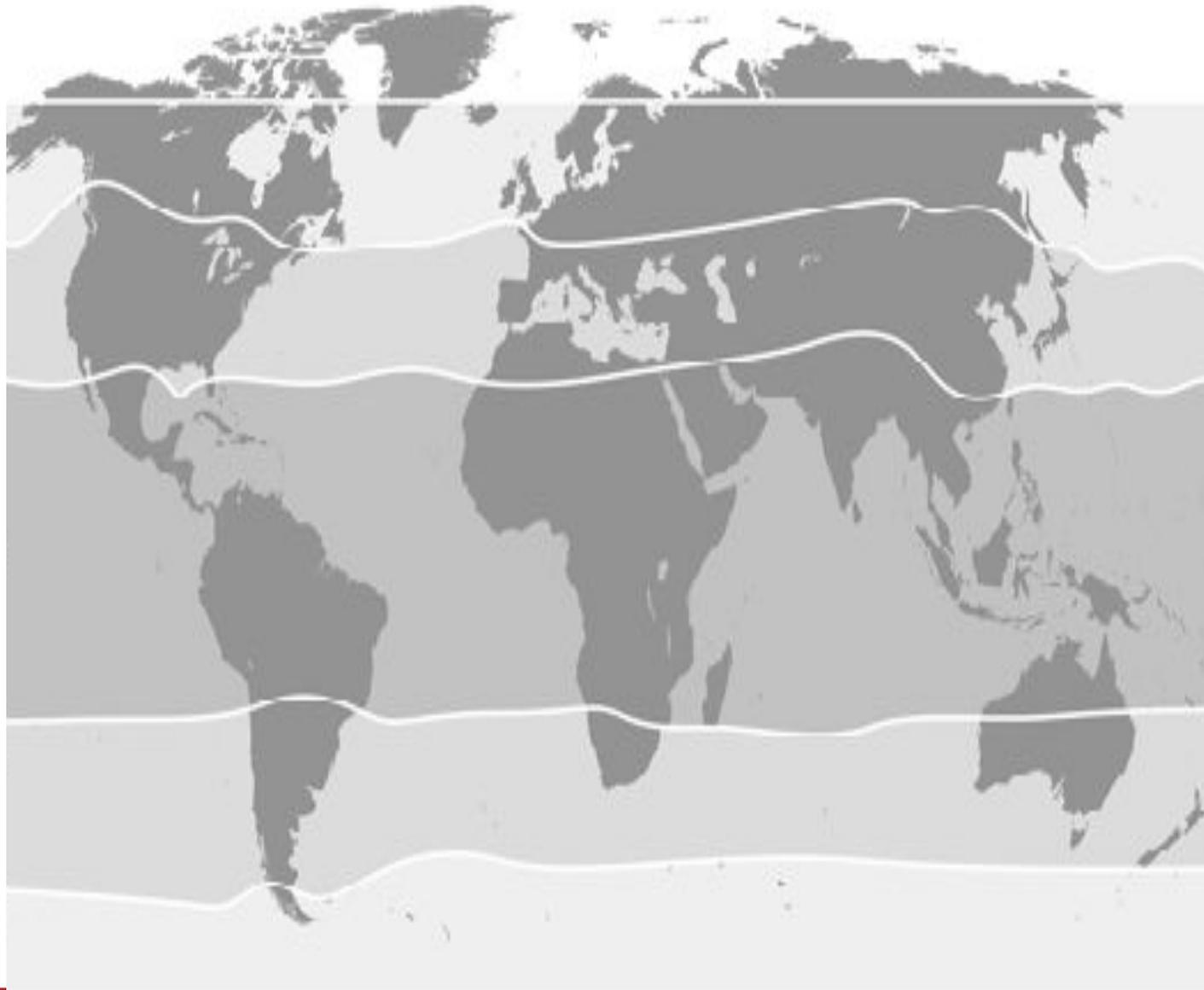
ADLM

Falta de vitamina  
D en adultos:

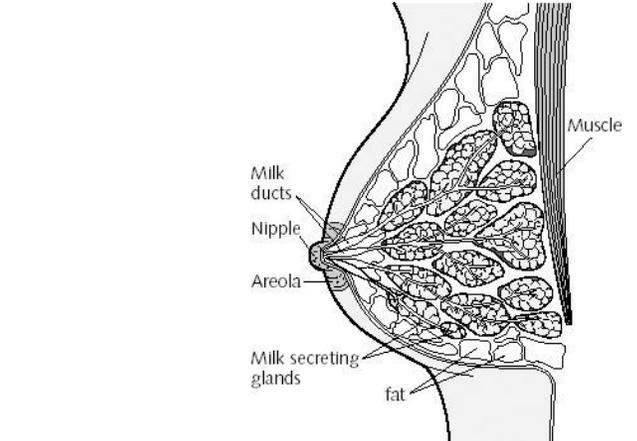
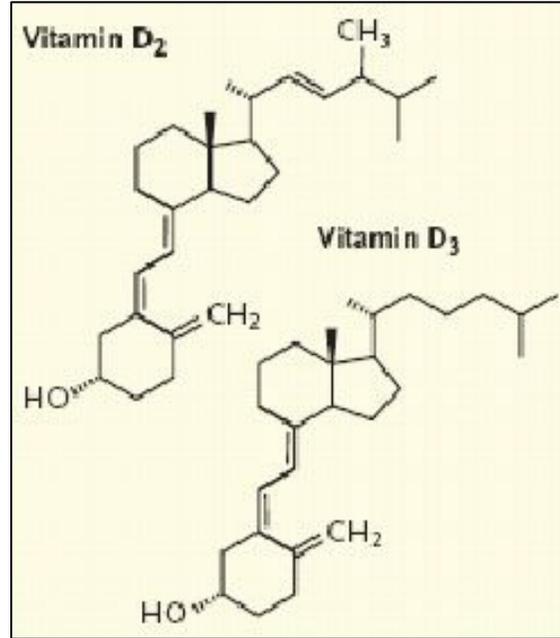
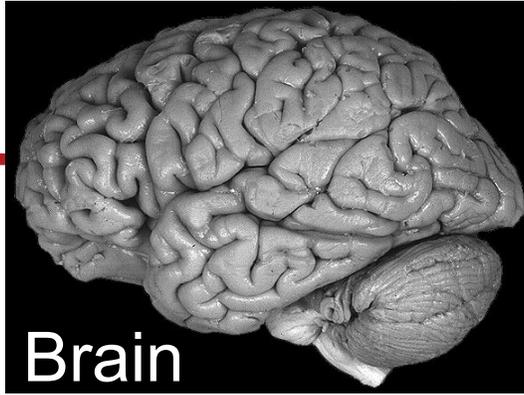
Osteomalacia



# Distribución de la luz ultravioleta



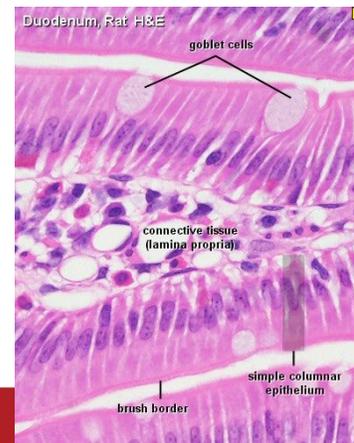
# Ejemplos de órganos que necesitan vit D



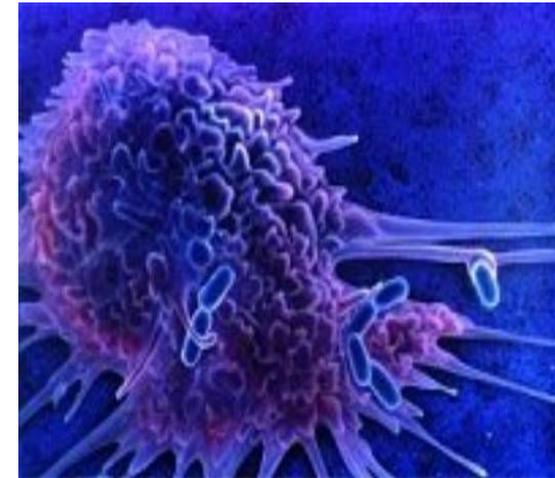
Breast



Prostate



Intestine



Immune Cell

GLOBAL  
LAB QUALITY  
INITIATIVE

ADLM

# Calcio + Vitamina D: Resumen

35,000 mujeres en menopausia (50-79 años)  
Carbonato de Ca = 1000 mg/día  
Vitamina D = 400 IU/día  
Estudio de 7 años + seguimiento de 5 años

29% reducción de fractura de cadera  
13 % reducción de fractura de vertebra  
Aumento de la densidad ósea

13% reducción del cáncer de mama '*in-situ*'  
9% reducción de todo tipo de cáncer

No se observo reducción en:  
Cáncer de mama invasivo  
Cáncer de colon  
Problemas cardiovasculares

VITAL  
TRIAL



## Welcome to the VITAL Study

Welcome to the Web site of the *VIT*amin D and *Om*egA-3 *Tria*L (VITAL) at Brigham and Women's Hospital, an affiliate of Harvard Medical School, in Boston, Massachusetts. VITAL is an ongoing research study in 25,875 men and women across the U.S. investigating whether taking daily dietary supplements of vitamin D3 (2000 IU) or omega-3 fatty acids (Omacor® fish oil, 1 gram) reduces the risk for developing cancer, heart disease, and stroke in people who do not have a prior history of these illnesses. Please click on [Study Q&A](#) to learn more about this important research endeavor.



JoAnn Manson, MD

VIT D3: 2,000 IU/dia

Or

Omega-3 fatty acids

Cáncer  
Enfermedades cardiacas  
Stroke

## Clinical Utility of Vitamin D Testing

An Evidence-Based Analysis

*Presented to the Ontario Health Technology  
Advisory Committee in November 2009*

Medical Advisory Secretariat. Clinical utility of vitamin D testing: an evidence-based analysis. Ont Health Technol Assess Ser [Internet]. 2010 Feb [cited YYYY MM DD]; 10(2) 1-95. Available from: [http://www.health.gov.on.ca/english/providers/program/mas/tech/reviews/pdf/rev\\_vitamin\\_d\\_201002.pdf](http://www.health.gov.on.ca/english/providers/program/mas/tech/reviews/pdf/rev_vitamin_d_201002.pdf)

February 2010

## Resumen del Análisis de Datos en Canadá

- 1) Estudios de la acción de la vitamina D indican que Calcio y vitamina D solos, pueden evitar fracturas.
- 2) No hay evidencia que otras enfermedades se puedan evitar tomando vitamina D solamente.

# Niveles apropiados de vitamina D



$<20$ ng/ml	<b>Reference range</b> 20–100 ng/ml	$>150$ ng/ml
Deficiency	<b>Preferred range</b> 30–50 ng/ml	Intoxication
$<50$ nmol/L		

# Clases de Vitaminas:

Ergocalciferol o D2 =  
50,000 IU/unidad  
(por 8 semanas)

Multivit. = 400  
IU/D2 o D3  
Vit D3 = 400-2000  
IU/unidad

# Ensayos de vitamina D

---



# Que debemos saber de la vitamina D?

---

- El 95% de la vit D en circulación es vit D3
- En EEUU se suplementa la vitamina con D2
- La vit D es muy hidrofobica
- Vit D circula unida a la 'proteína unida a la vit D' (PUVD)

# Ensayos de vitamina D

Dificultades encontradas en los ensayos inmunológicos automatizados:

- La vit D es muy hidrofobica y circula unida a la PUVD.
- Producir anticuerpos en contra de la vit D es muy difícil.
- En EEUU el FDA requiere ensayos que detecten la vit D2 y D3 simultáneamente.
- En los ensayos inmunológicos hay mucha competencia entre el anticuerpo y la PUVD en la muestra.
- Los ensayos homogéneos de 1 solo paso en general tienen muy poca correlación con los métodos químicos (LC/MS/MS) debido a la falta de separación del la PUVD.

# Ensayos de vitamina D

---

## Vitamina Total D o D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> ?

- Ensayos inmunológicos solamente pueden medir la cantidad total de vitamina D.
- La medición de vitamina D total esta aceptada mundialmente y ha sido la medición mas popular en muchos de los estudios iniciales que han marcado la deficiencia clínica.
- Los ensayos químicos de alto orden pueden diferenciar a la vit D2 y D3. Pero en realidad no es muy claro si se necesita hacer esa diferencia.

# Clasificación de los ensayos de vit D

Ensayos de Unión

Unión de Proteínas: Ensayo de unión de proteína acoplado con ensayo enzimático (Diazyme)

Inmunoensayos: Diasorin, IDS, Roche, Siemens, Abbott

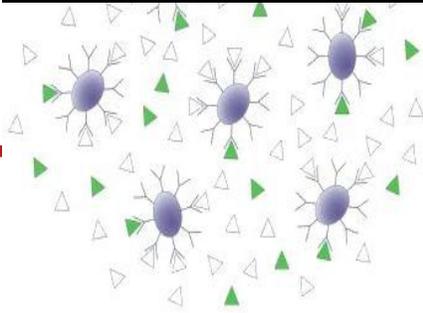
Químico

HPLC-UV

GC-MS

LC-MS/MS

# Radio-inmunoensayo



CLIA-Diasorin



CLIA-IDS



Ez-coupled  
CPBA Diazyme



HPLC



LC-MS/MS

Se puede comparar valores de la vitamina D con los diferentes ensayos?

Es posible usar un rango de referencia clínico sin haber estandarizado el ensayo?

# Primeros reportes en variación de resultados

El grupo del Dr M. Drezner@ Universidad de Wisconsin

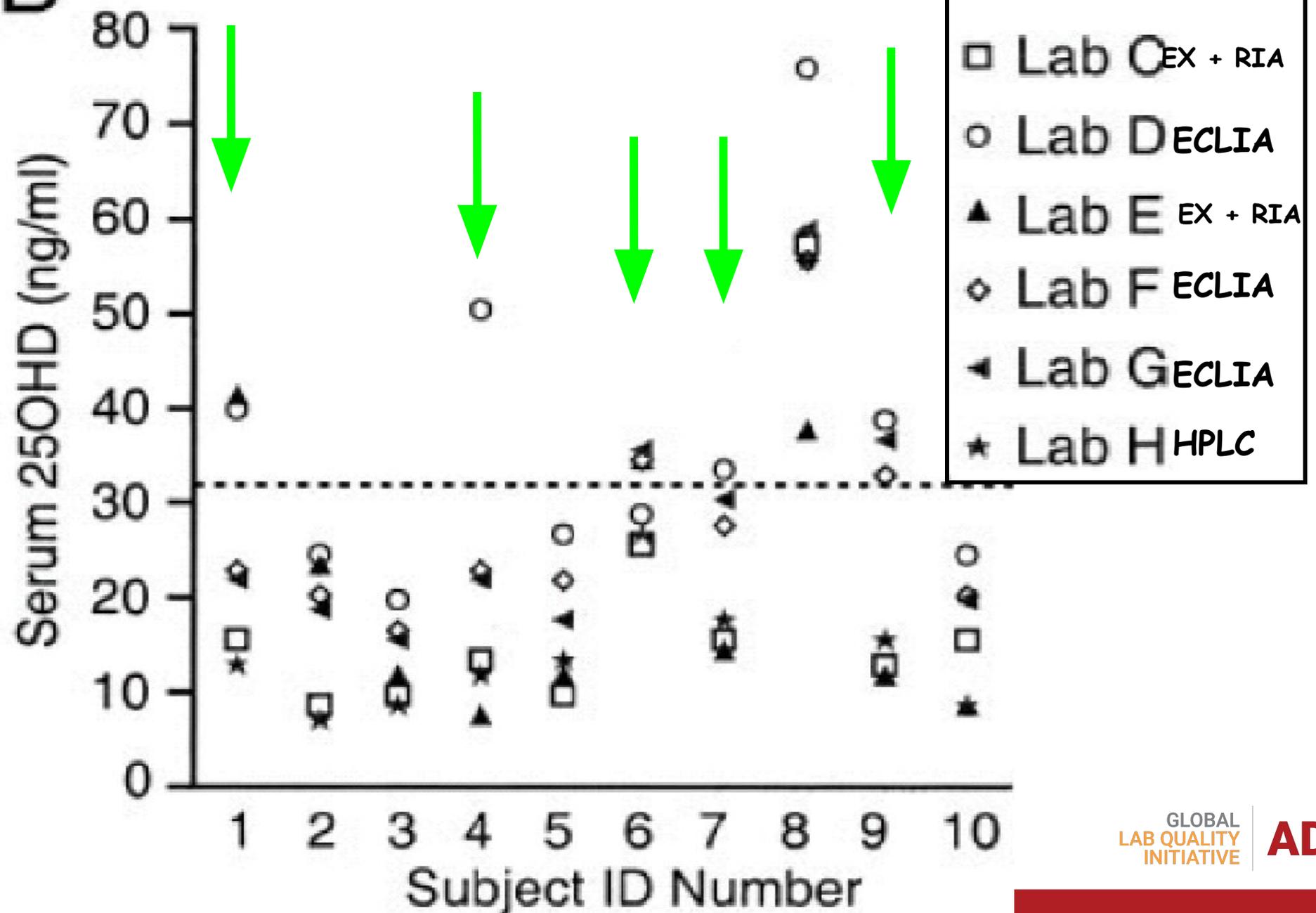
---

Laboratory	Methodology	Normal range
C	Acetonitrile extraction followed by DiaSorin RIA	8–38 ng/ml
D	Chemiluminescent assay	20–57 ng/ml
E	Acetonitrile extraction followed by DiaSorin RIA	NA
F	Chemiluminescent assay	6–54 ng/ml
G	Chemiluminescent assay	10–68 ng/ml
H	Ethyl acetate extraction followed by normal phase HPLC	NA

---

El valor de la vit D varia según el método usado

B



# Método HPLC para la medición de 25-OH vitamina D: comparación con ensayos contemporarios

GARY L. LENSMEYER,<sup>1\*</sup> DONALD A. WIEBE,<sup>1,2</sup> NEIL BINKLEY,<sup>3</sup> and MARC K. DREZNER<sup>3,4</sup>

*Clinical Chemistry* 52, No. 6, 2006

Desarrollaron un ensayo HPLC para medir 25OH vit D2/3

Comparación con:

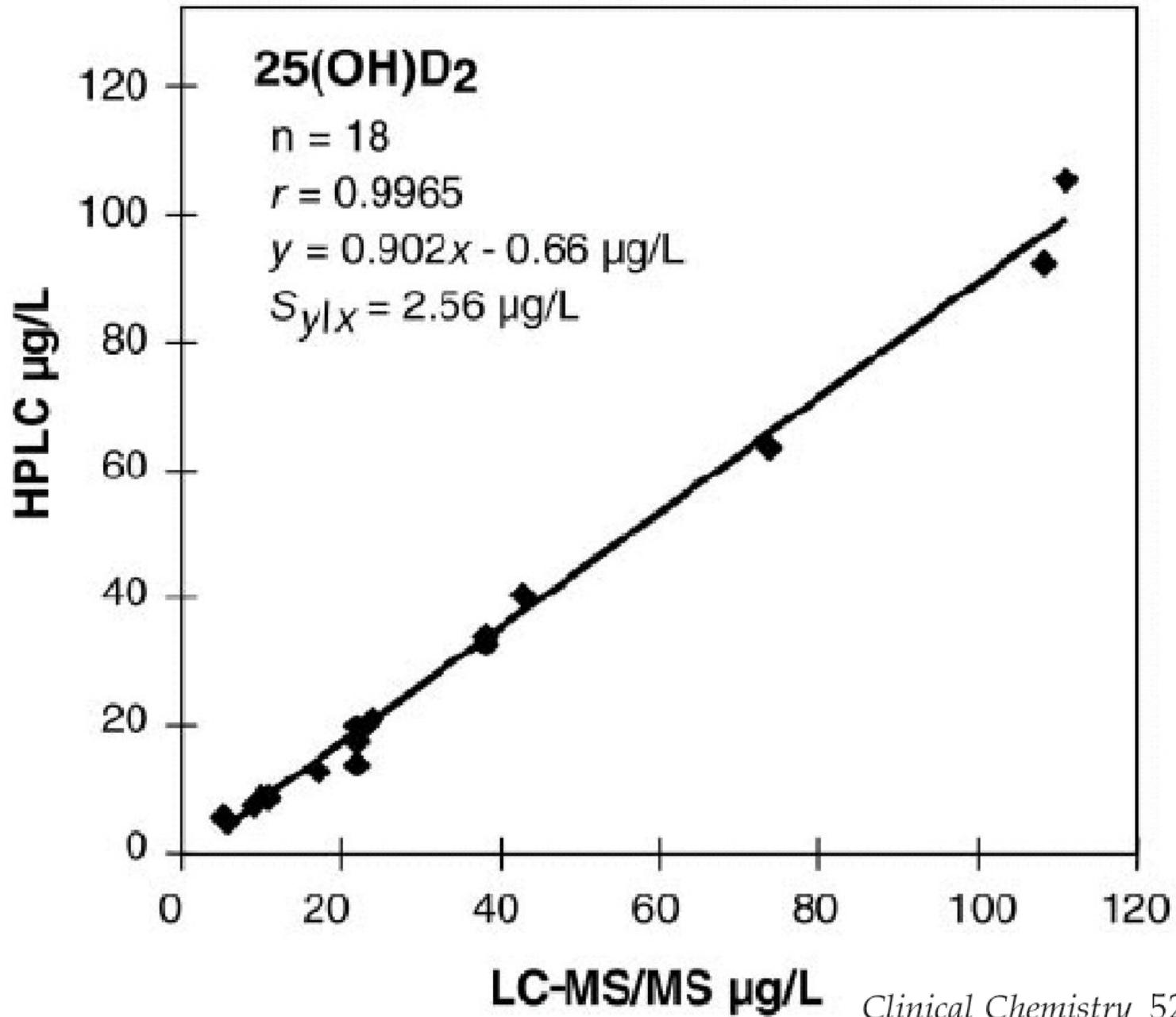
LC-tándem MS

Un ensayo de unión competitivo

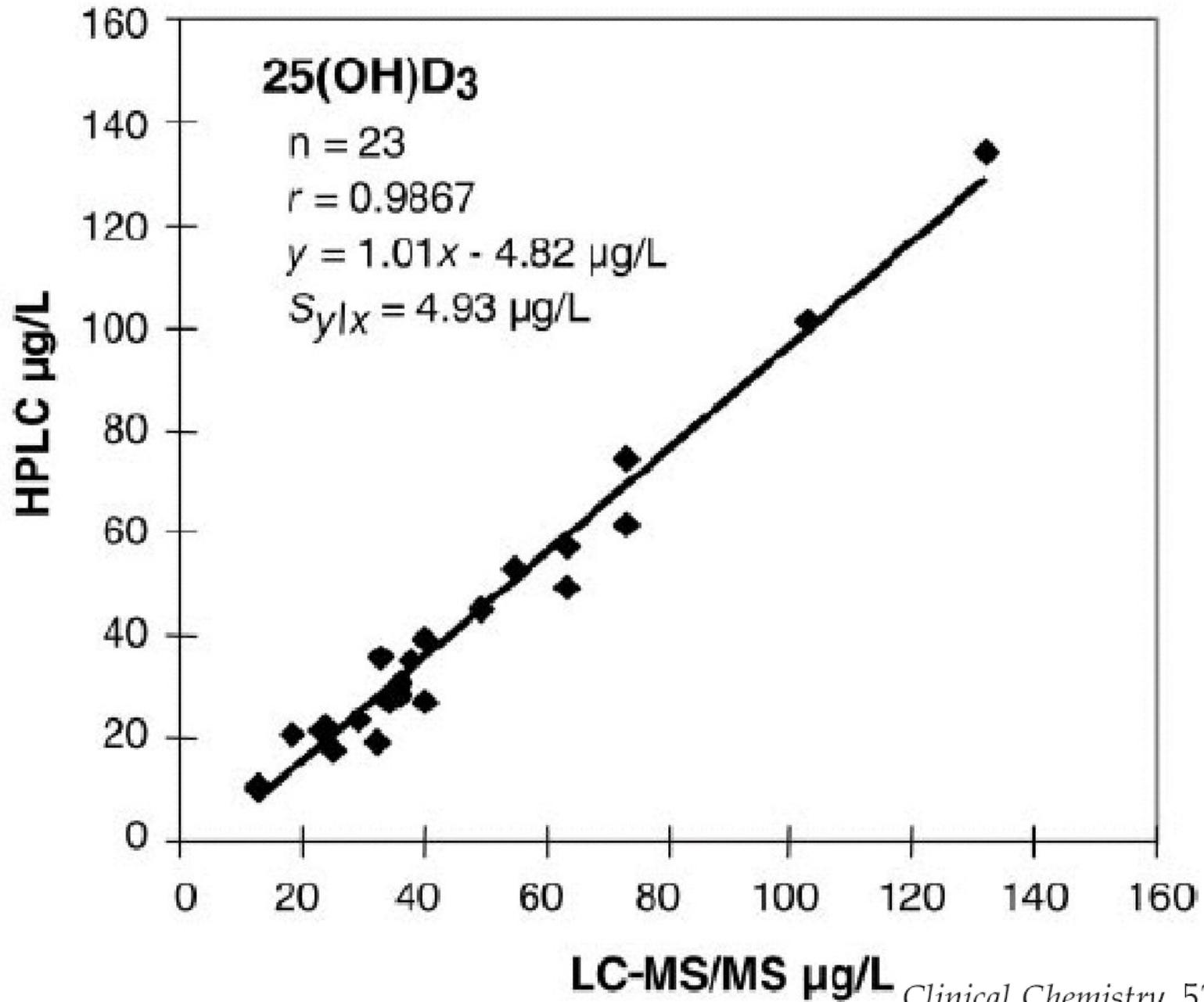
(Nichols Advantage)

Diasorin (radio-inmuno)

# Muestras con vit D2

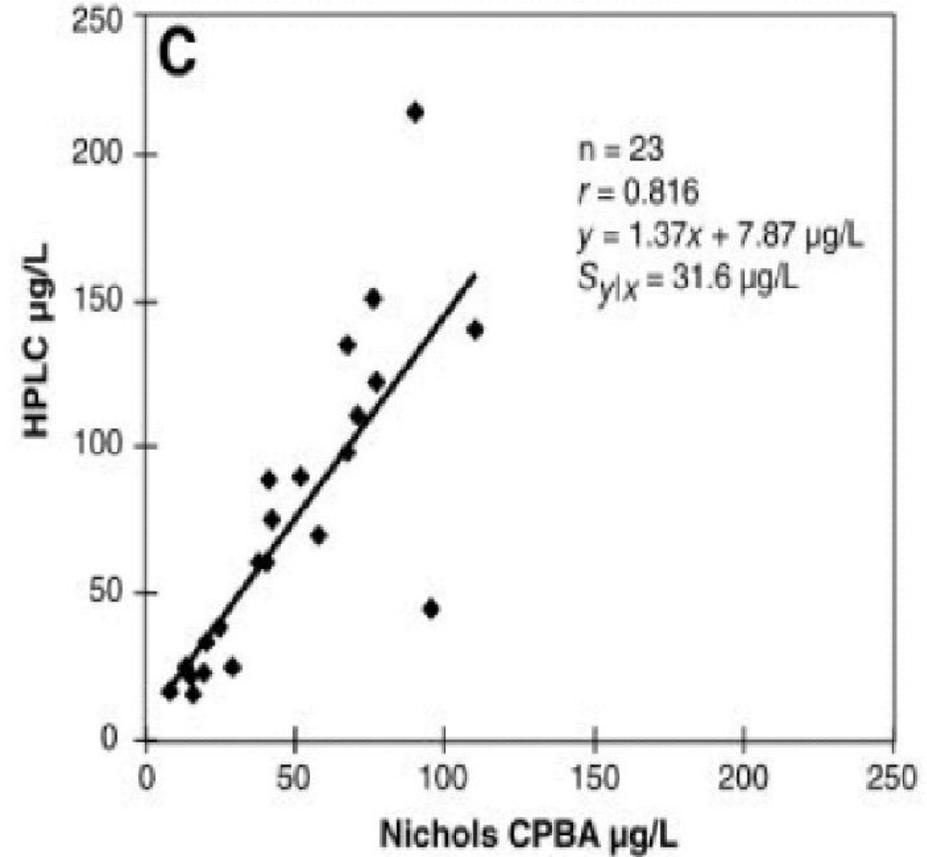
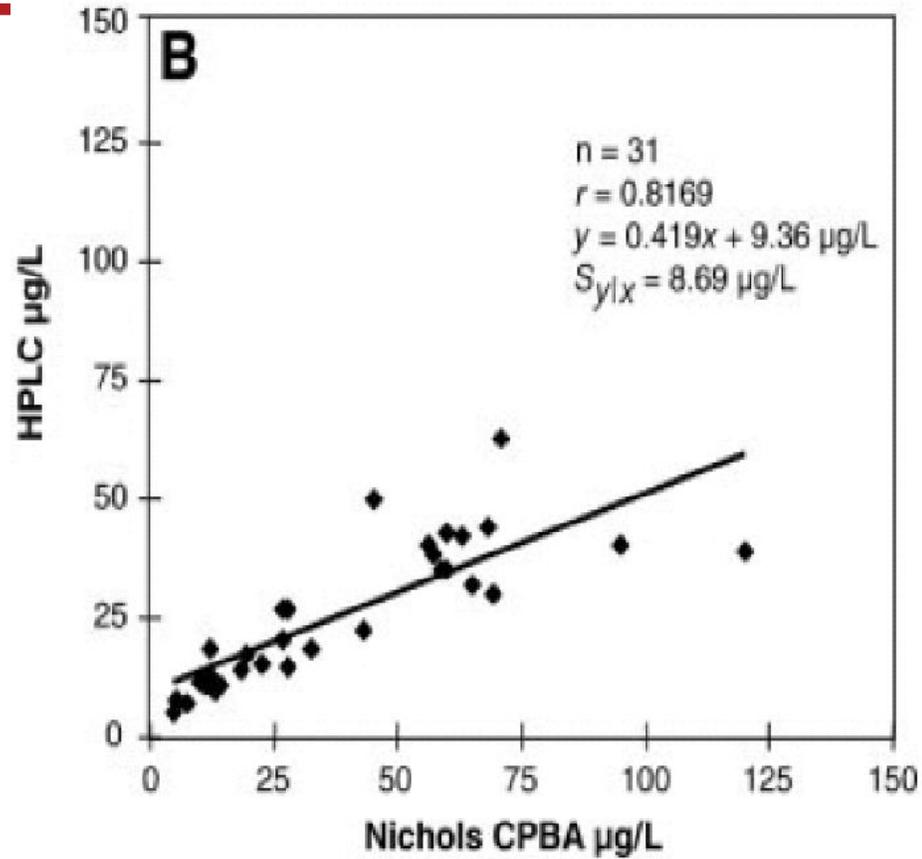


# Muestras con vit D3



+ D<sub>3</sub>  
Sobrestima

+ D<sub>2</sub>  
Subestima



# Método HPLC para la medición de 25-OH vitamina D: comparación con ensayos contemporarios

GARY L. LENSMEYER,<sup>1\*</sup> DONALD A. WIEBE,<sup>1,2</sup> NEIL BINKLEY,<sup>3</sup> and MARC K. DREZNER<sup>3,4</sup>

## CONCLUSIÓN

HPLC y LC-MS/MS proveen resultados similares

Nichols Advantage sobrestima D3 y subestima D2

---

Varios reportes han demostrado que algunos ensayos no pueden medir D2 en forma veraz.

# Esquema de Calidad Internacional DEQAS (2004)

---

5 muestras normales cada 3 meses

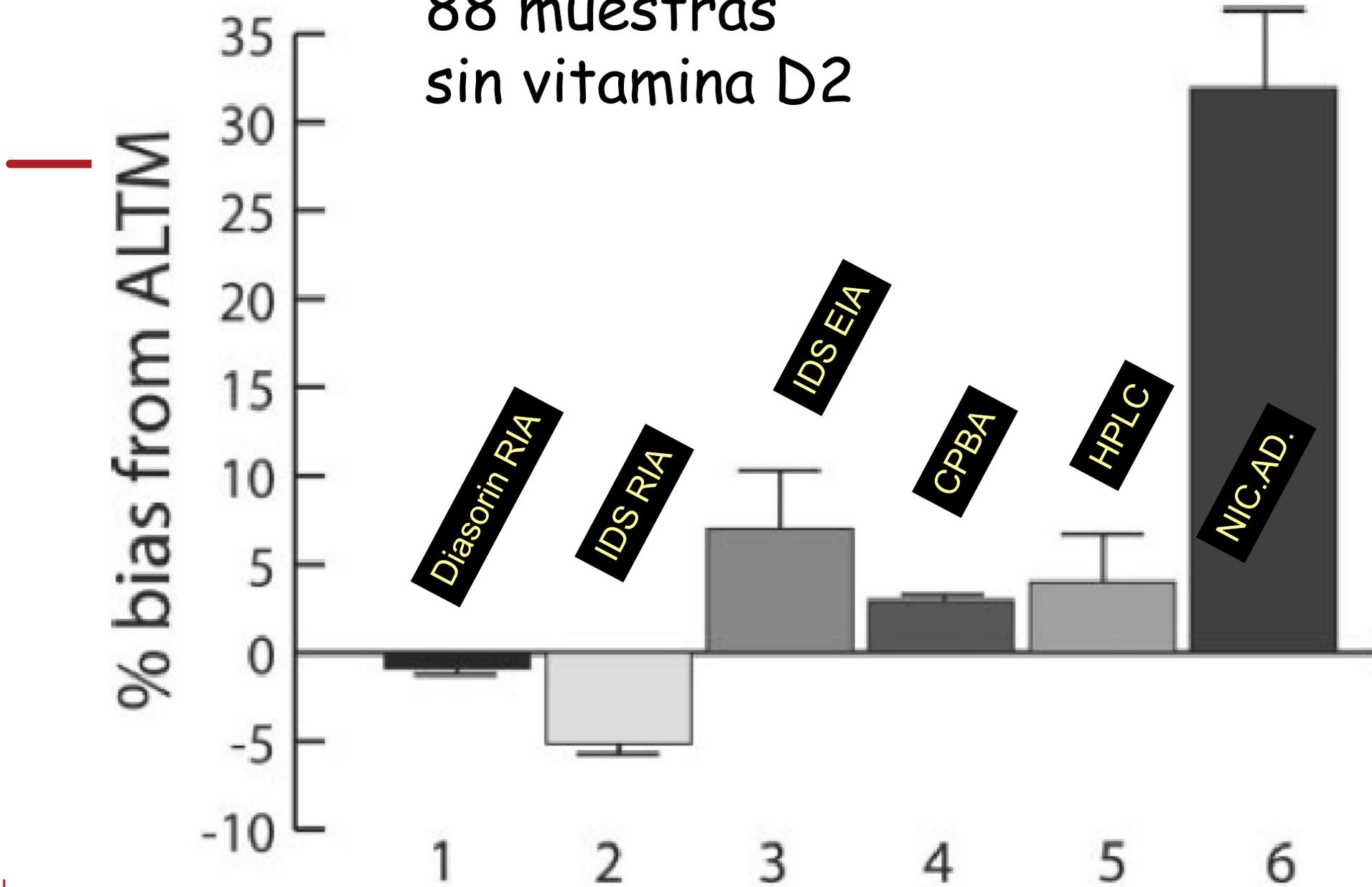
Media de todos los laboratorios =  
All-laboratory Trimmed Mean (ALTM) and  
SD

(ALTM compares very well with LC/MS)

Veracidad del metodo se calcula:

$$[(MM-ALTM)/ALTM] \times 100$$

88 muestras  
sin vitamina D2



# Muestras con vitamina D2

	4	5
CPBA <sup>b</sup> (n = 2)		
Method mean, nmol/L (CV, %)	101.2 (12)	72.5 (12)
Median (range), nmol/L	101.2 (91.3; 111.0)	72.5 (65.0; 80.0)
DIAS (n = 36)		
Method mean, nmol/L (CV, %)	106.5 (19)	68.8 (18)
Median (range), nmol/L	105.5 (80.0–209.0)	67.5 (47.0–106.0)
HPLC (n = 5)		
Method mean, nmol/L (CV, %)	80.8 (28)	55.0 (40)
Median (range), nmol/L	90.8 (38.0–101.8)	56.8 (12.0–82.0)
IDS EIA (n = 9)		
Method mean, nmol/L (CV, %)	110.1 (24)	67.7 (14)
Median (range), nmol/L	117.7 (68.0–139.7)	70.0 (47.0–81.0)
IDS RIA (n = 23)		
Method mean, nmol/L (CV, %)	65.6 (14)	48.4 (13)
Median (range), nmol/L	67.0 (52.8–82.4)	47.8 (38.8–61.3)
NICH ADV (n = 14)		
Method mean, nmol/L (CV, %)	36.6 (22)	38.0 (19)
Median (range), nmol/L	34.3 (22.8–49.0)	37.6 (29.0–60.3)

# CONCLUSIONES

---

Muestras con D3: la mayoría de los métodos pueden medir D3 excepto el Nichols Advantage (sobrestima)

Muestras con D2: Nichols Advantage y el IDS subestima D2

El boletín informativo del reactivo del N.A. proclamaba detectar D2 y D3 con 100% de crosreactividad

# Nuevos Inmuno Ensayos en Instrumentos Automatizados



Siemens Centaur



Abbott Architect



IDS YSIS



Roche Modular



Diasorin Liaison

# Ensayos de vitamina D: Una comparación de ensayos automatizados y de cromatografía de líquido con espectroscopia de masa al tándem

Clinical Chemistry 58:3  
531–542 (2012)

Christopher-John L. Farrell,<sup>1,2</sup> Steven Martin,<sup>1</sup> Brett McWhinney,<sup>3</sup> Isabella Straub,<sup>4</sup> Paul Williams,<sup>5</sup> and Markus Herrmann<sup>1,4\*</sup>

## Metodos:

Un grupo en Australia uso 170 muestras de pacientes para comparar 8 metodos: 2 LC/MS/MS, un radio-inmuno (Diasorin) y 5 inmuno ensayos automatizados (Abbott, Diasorin, IDS, Roche y Siemens)

## Conclusiones:

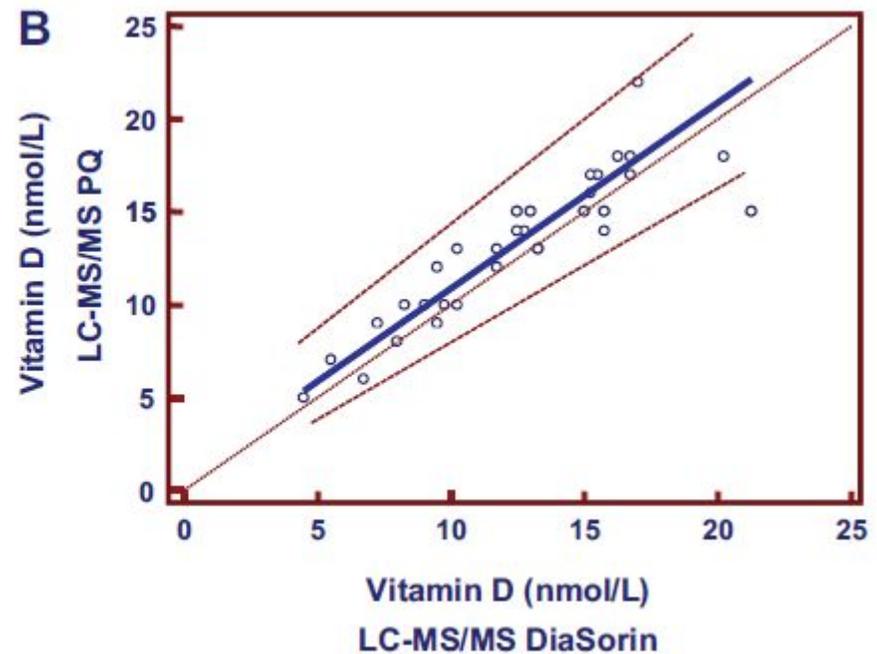
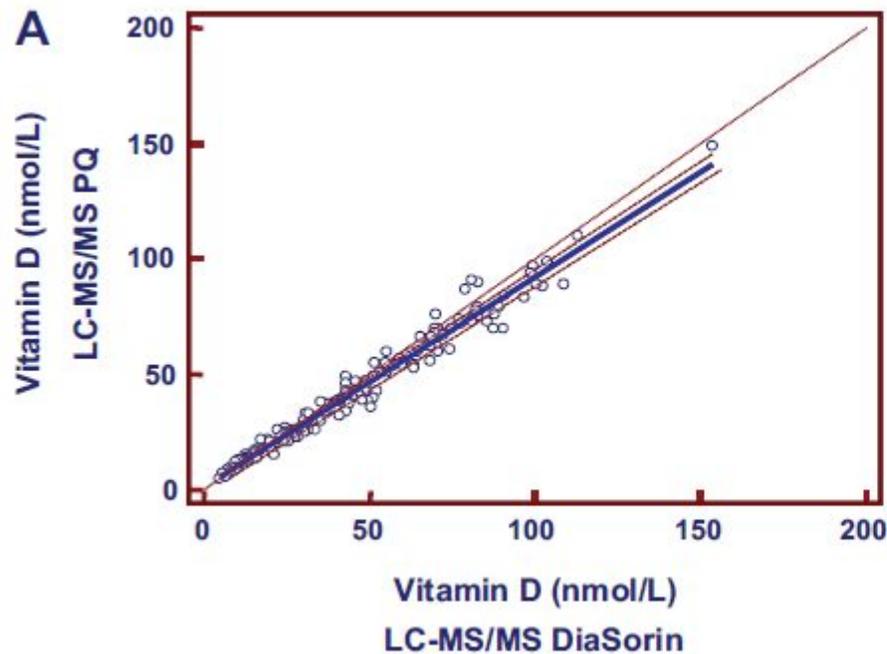
Los ensayos de LC/MS/MS son muy veraces. Solamente el RIA tiene una veracidad comparada al del LC/MS/MS. Los inmunoensayos tienen un rendimiento muy variable.

GLOBAL  
LAB QUALITY  
INITIATIVE

**ADLM**

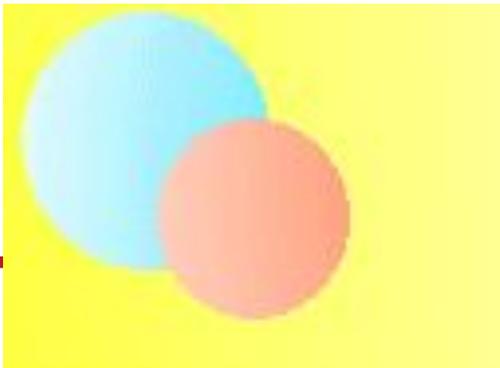
# Los métodos LC-MS/MS se usaron como estándar para comparar a los otros métodos

Se uso la media de los valores obtenidos con los LC/MS/MS



---

# Programas de *Gestión* de Calidad



---

## DEQAS Vitamin D External Quality Assessment Scheme

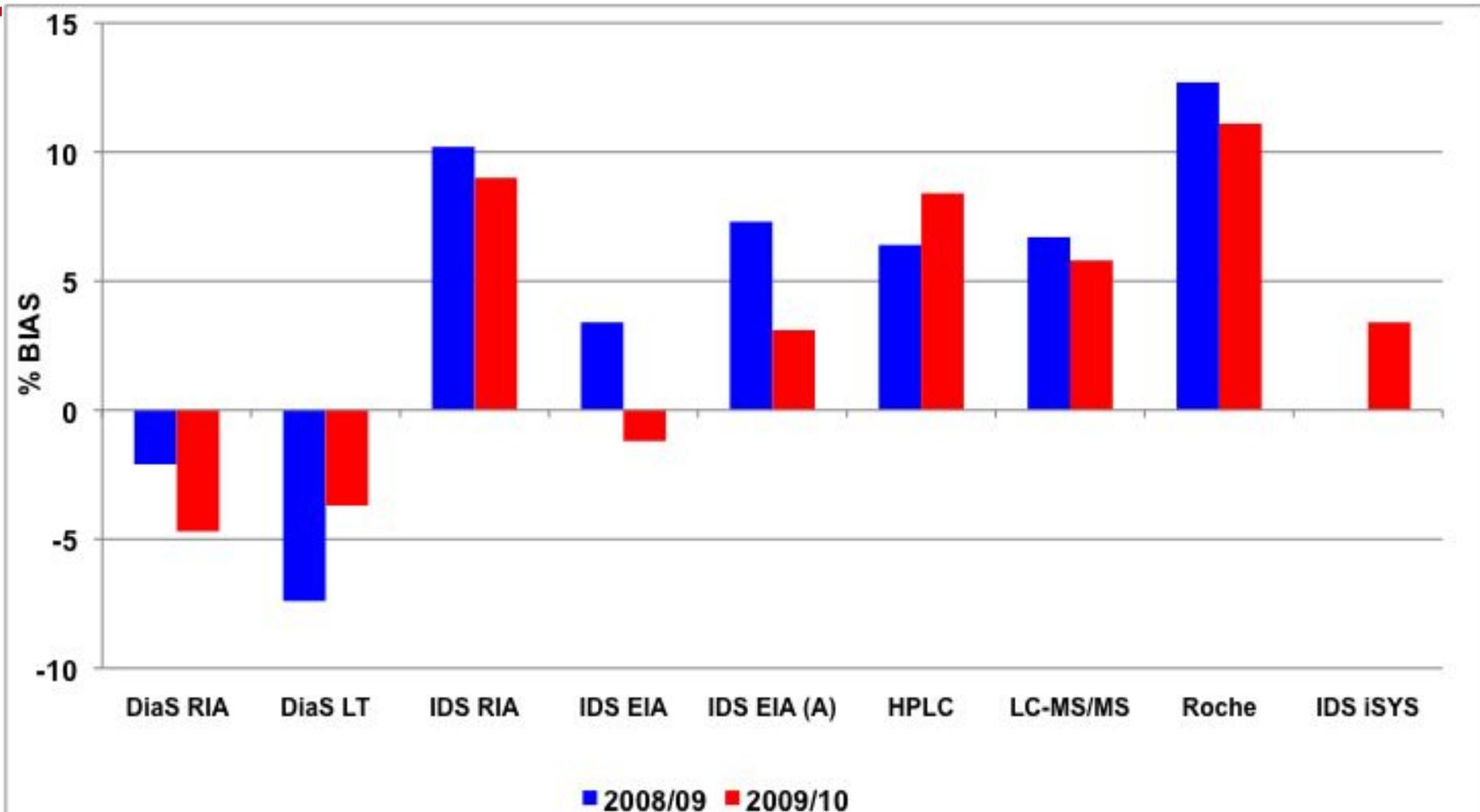
Scheme Organiser: Graham Carter  
Administration: Julia Jones  
Software: Richard Carter

Endocrine Laboratory - Charing Cross Hospital - Fulham Palace Road - London W6 8RF - UK  
Telephone: +44 (0)20 8383 3645 - Facsimile: +44 (0)20 8846 7007 - Email: [administrator@deqas.org](mailto:administrator@deqas.org)

# DEQAS

- 5 muestras de suero humano sin aditivos distribuido c/3 meses a temperatura ambiente
- Los resultados se presentan por el internet, fax o email.
- Acceso a valores estadísticos actualizados está disponible on-line
- Un reporte final se manda por email al personal designado del laboratorio

# Porcentaje promedio de los resultados de dos ciclos anuales de distribución



# Programa de aseguranza de calidad del Instituto Nacional de la Salud (NIH - USA) o VitDQAP

NIST

NIST Time | NIST Home | About NIST | Contact Us |

Material Measurement Laboratory

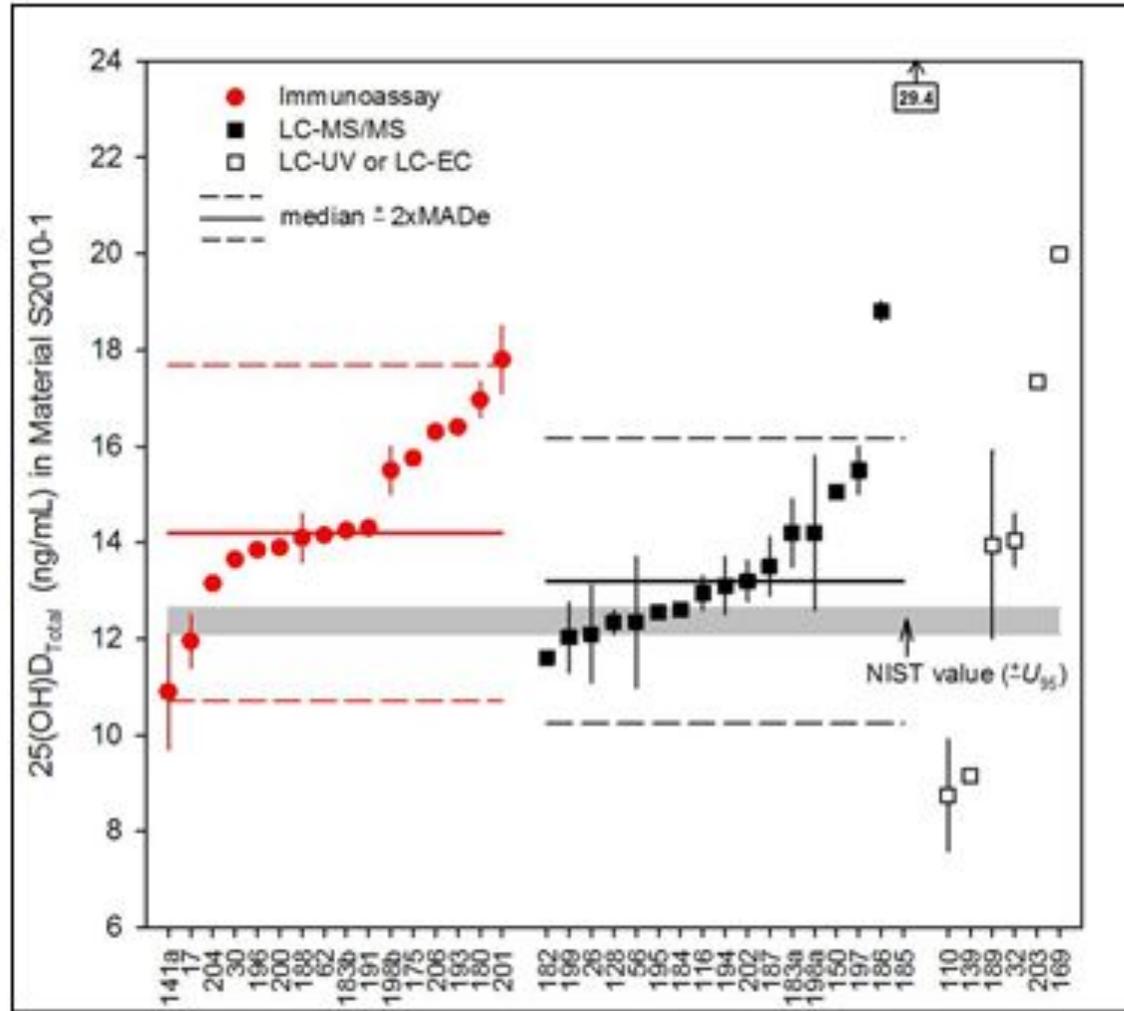
About MML ▼ Publications Topic/Subject Areas ▼ Products/Services ▼ News/Multimedia Pro

NIST Home > MML > Analytical Chemistry Division > Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program

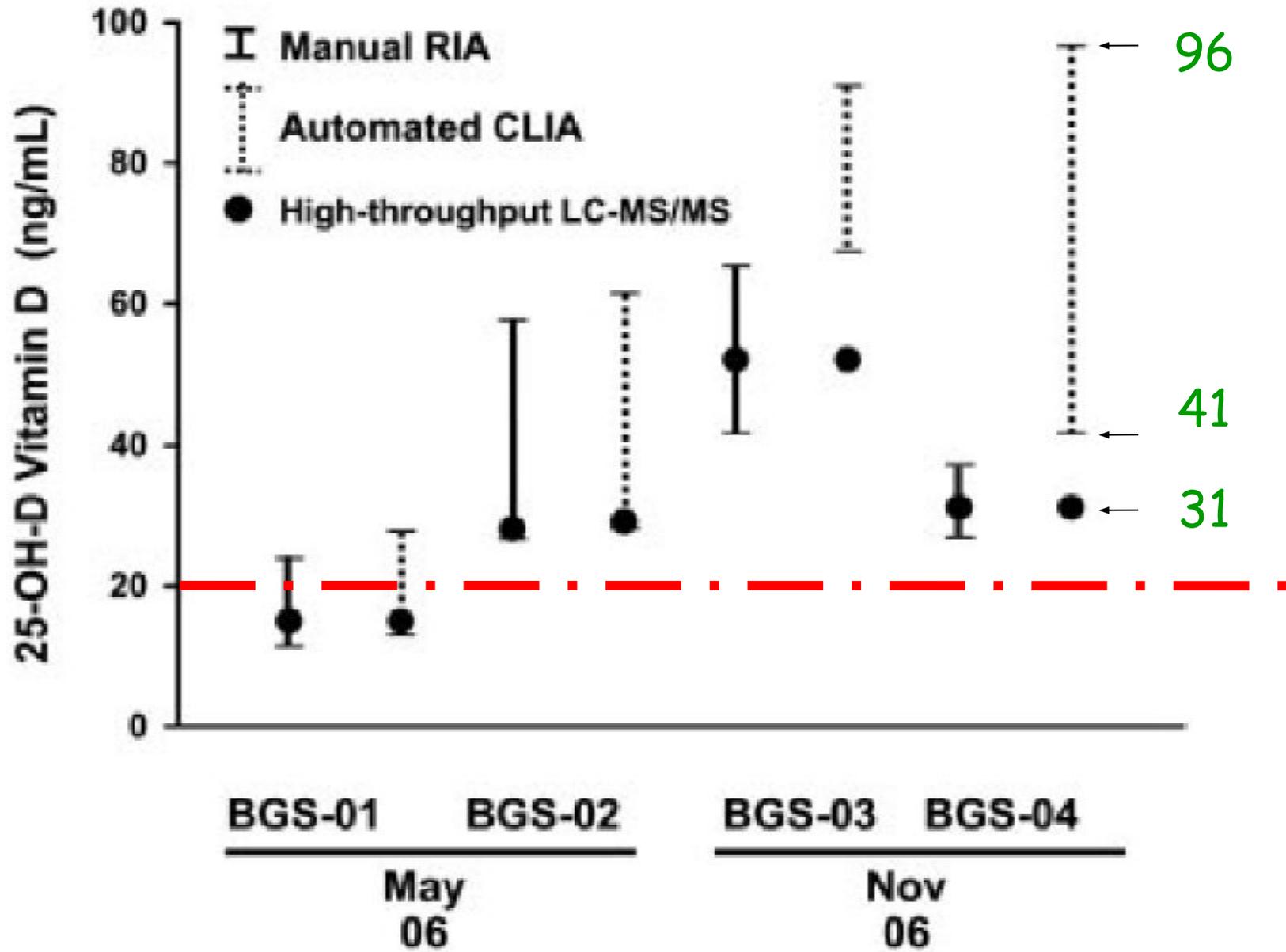
## Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program

The National Institute of Standards and Technology (NIST) and the National Institutes of Health (NIH) Office of Dietary Supplements (ODS) have established a Vitamin D Metabolites Quality Assurance Program (VitDQAP). Interlaboratory comparison studies are currently directed toward the measurement of 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> in selected serum and plasma matrices as well as method-appropriate control materials. Frozen or freeze-dried serum or plasma samples together with control materials are sent to laboratories biannually (winter and summer) for analysis. Results are then returned to NIST for data evaluation and tabulation. Value-assignment of the samples is based on the median of all the laboratory results, with confirmation based on measurement at NIST using two or more different methods. Consultation and troubleshooting regarding methods of analysis are also provided. A report of exercise results is sent to participants, and workshops will be scheduled to discuss results as well as methodological issues and advancements in clinically-relevant vitamin D metabolite measurements.

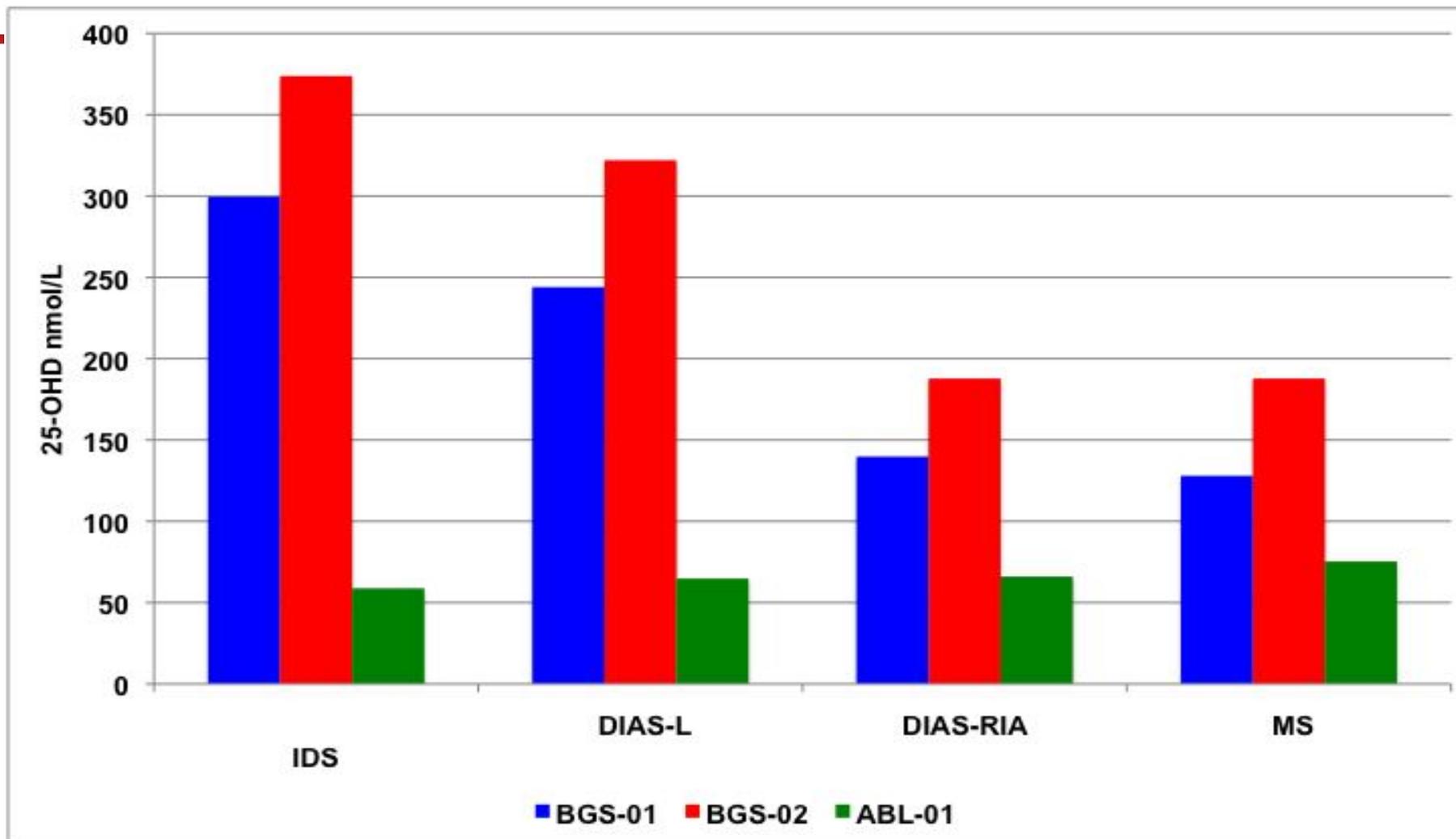
# VitDQAP



## Rendimiento de métodos usando una muestra de rendimiento de CAP



# Muestras adulteradas no tienen el mismo rendimiento



# El material de encuesta 'Y-A' y plasma humano congelado dan diferentes resultados

Material de encuesta

Material humano congelado

Instrument	BGS-01			BGS-02			ABL-01		
	# of Labs	Mean	CV	# of Labs	Mean	CV	# of Labs	Mean	CV
IDS	25	119.75	58.2%	18	149.53	75.5%	8	23.54	12.3%
Diasorin Liaison	108	97.60	11.6%	94	128.75	10.0%	53	25.92	10.5%
Mass Spec	19	51.16	15.3%	19	70.16	15.1%	12	30.08	12.9%
Diasorin RIA	24	55.88	19.8%	24	75.08	15.5%	15	26.36	23.6%

51 to 120

75% CV

24 to 30

# Estandarización

---

Hasta hace muy poco no había calibradores estándar.

En el verano del 2010 el Instituto de Estándares y Medidas (NIST) diseño calibradores estandarizados.

# ¿Hay un método perfecto?

---

Dos métodos se han propuesto como métodos de referencia.

---

El método químico de alto orden también puede tener problemas si no se realiza la vigilancia necesaria.

En 2009, problemas con el ensayo de la vit. D alcanzaron la cabecera del periódico N.Y. Times!!



Dr. Ronald L. Hoffman, un medico nutricionista, encontró valores de la vitamina D en el ensayo de Quest muy altos.

# CONCLUSIONES GENERALES

---

1. Inmunoensayos todavía presentan con mucha variación
2. El límite de referencia clínico es polémico
3. Estandarización de los inmunoensayos no está adaptada mundialmente
4. Inscribirse a un programa de aseguranza de calidad es muy importante para detectar problemas
5. Darse cuenta que materiales adulterados pueden dar una sensación de falsa seguridad.



**¡Mil Gracias!**

[veronica.luzzi@gmail.com](mailto:veronica.luzzi@gmail.com)

GLOBAL  
LAB QUALITY  
INITIATIVE

**ADLM** 