



TESIS DOCTORAL

**Distribución de las determinaciones plasmáticas de
vitamina D y su adecuación en el
Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz**

**Francisco Javier Valero Chávez
Departamento de Ciencias Biomédicas**

Directores

Dr. Luis Miguel Luengo Pérez

Dr. Javier Cubero Juárez

2017



Facultad de Medicina
Universidad de Extremadura

Avenida de Elvas s/n
06006 Badajoz (España)

Dr. Luis Miguel Luengo Pérez, Profesor-Doctor asociado al departamento de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura y Dr. Javier Cubero Juárez, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Didáctica de las Ciencias Experimentales y las Matemáticas.

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, presentada por D. Francisco Javier Valero Chávez con el título “Distribución de las determinaciones plasmáticas de vitamina D y su adecuación en el Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz” ha sido realizada bajo nuestra dirección, en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Extremadura, y entendiendo que reúne todos los requisitos establecidos, autorizamos su presentación para ser juzgado por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Badajoz, a de de 2016.

Fdo. Dr. Luis Miguel Luengo Pérez

Fdo. Dr. Javier Cubero Juárez

AGRADECIMIENTOS

Para empezar, quería agradecer a mis directores de Tesis, el Dr. Luis Miguel Luengo Pérez y el Dr. Javier Cubero Juárez por su apoyo tanto académico como anímico durante todo este tiempo. Además, agradecer su esfuerzo y dedicación desde que inicie la tesis doctoral en 2013. En estos años no sólo he aprendido de vosotros en el aspecto profesional sino también en el personal.

En segundo lugar, quería agradecer a Socorro Alejo González su ayuda en el aspecto metodológico de la determinación de vitamina D. Por cada vez que me veía en el laboratorio me informaba sobre nuevas investigaciones en la metodología.

Como no agradecer a Purificación García Yun su compromiso y ayuda para implantar el protocolo de vitamina D en el Área de salud de Badajoz, sin su ayuda no hubiera sido posible.

Debo mencionar sin falta a Rafael Bravo Santos por toda la ayuda prestada estos años, que al igual que yo estaba realizando la tesis doctoral y se sentía muy identificado con los problemas que me surgían.

A mis tutoras del servicio de Análisis Clínicos, Paqui Jiménez Mena-Villar y Blanca Fernández Fatou por preocuparse tanto por mi periodo de residencia en la especialidad de Análisis Clínicos, como por mi tesis doctoral y darme ánimos.

A mi compañero de piso Jorge Gaitán Pitera por aguantarme todos estos años, en los que muchos de mis temas de conversación eran sobre vitamina D y él no entendía nada al respecto.

A Carmen Gamero Villarroel, Inés Rodríguez Sánchez, Antonia Escobar Medina, Cristina Muñoz Cuevas, Alexia Rubio Peral, Marisol Anselmo Díaz, Jean Carlos Méndez, Miguel Ángel Blanco, compañeros y compañeras de residencia del Hospital Infanta Cristina por apoyarme y darme ánimos en este largo recorrido.

Como no, a mi padre, mi madre y mi hermano por cada vez que me escucharon hablar sobre la tesis, aunque ellos no supieran nada del tema, muchas gracias por vuestro apoyo y por estar ahí siempre.

A mis amigos, compañeros de carrera, de trabajo, etc., por su apoyo y sus ánimos, que de verdad ayudan un montón.

A todos, muchas gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALTM (*Average Laboratory Trimmed Mean*): Media de todos los laboratorios

AR: Artritis reumatoide

CDC (*Centre for Diseases Control and Prevention*): Centro para el control de enfermedades

CHC: Cáncer hepatocelular

DEQAS (*Vitamin D External Quality Assurance Survey*): programa de calidad externo de la vitamina D

ECA: Ensayos clínicos aleatorizados

EM: Esclerosis múltiple

HPLC-UV: Cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta

IOM (*Institute of Medicine*): Instituto de Medicina

LC/MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

LES: Lupus eritromatoso sistémico

MAPK: Quinasas activadas por mitógenos

mg: Miligramos

µg: Microgramos

NIST (*National Institute of Standards and Technology*): Instituto Nacional de Estándares y Tecnología

PTH: Paratohormona

RAAS: Sistema renina-angiotensina aldosterona

SRM: Materiales de referencia estándar

UI: Unidades Internacionales

VDBP (*Vitamin D binding protein*): Proteína transportadora de vitamina D

VDR: Receptor vitamina D

VDRmem 1,25: Receptor de membrana del calcitriol

VDRmen 24,25: Receptor de membrana del 24-calcitriol

VDRnuc: Receptor nuclear de vitamina D

VDSCP (*Vitamin D Standardization-Certification Program*): Programa de certificación y estandarización de la vitamina D

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....7

1. Generalidades de las vitaminas.....9

2. Vitamina D.....17

 2.1 Historia y estructura.....17

 2.2 Fuentes de vitamina D..... 19

 2.3 Absorción, distribución, metabolismo y excreción.....22

 2.4 Mecanismos de regulación de la síntesis y degradación de la vitamina D.....25

 2.5 Mecanismo de acción de la vitamina D.....27

 2.6 Funciones clásicas de la vitamina D.....30

 2.7 Funciones no clásicas de la vitamina D.....34

 2.8 Estudios de los niveles de vitamina D.....44

 2.9 Requerimientos nutricionales vitamina D.....46

 2.10 Deficiencia y toxicidad.....48

 2.11 Incremento de las determinaciones de vitamina D en los últimos años a nivel mundial.....52

 2.12 Técnicas de media.....53

OBJETIVOS.....63

MATERIALES Y MÉTODOS.....67

1. Estudio de las distribuciones plasmáticas de vitamina D y su adecuación.....69

2. Estudio comparativo de dos inmunoensayos en la determinación de vitamina D.....73

3. Análisis estadístico.....77

RESULTADOS.....79

1. Distribución de las determinaciones plasmáticas de 25 (OH)-vitamina D.....81

 1.1 Adecuación de las peticiones de vitamina D según el protocolo.....81

 1.2 Distribución de las peticiones justificadas según el diagnóstico.81

 1.3 Distribución de las peticiones no justificadas según el diagnóstico.....82

 1.4 Distribución de las peticiones no justificadas según el servicio peticionario....83

2. Evolución de las peticiones de Vitamina D en los últimos años.....84

3. Estudio de la repercusión económica de la implantación del protocolo en el Área de Salud de Badajoz y extrapolación de los resultados al resto del SES.....85

4. Comparación de dos inmunoensayos para la determinación de vitamina D.....87

 4.1 Comparación de los resultados de los dos inmunoensayos utilizando todo el rango analítico.....87

 4.2 Comparación de los resultados de los dos inmunoensayos por rangos clínicos.....90

 4.3 Distribución en los diferentes rangos según método utilizado.....92

4.4 Reproducibilidad de los resultados en cada inmunoensayo.....93

4.5 Coeficiente de variación entre los dos métodos analizados.....94

DISCUSIÓN.....95

1. Análisis de la distribución de las determinaciones plasmáticas de vitamina D y su adecuación en el Área de Salud de Badajoz.....97

2. Estudio económico de cuál sería la rentabilidad de la implantación de un protocolo de adecuación de la vitamina D siguiendo las recomendaciones actuales para su determinación.....100

3. Estudio comparativo entre el inmunoensayo utilizado de rutina en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Infanta Cristina (IDS iSYS) y otro inmunoensayo (Advia Centaur XP).....101

CONCLUSION.....105

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....109

ANEXOS.....133

PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....157

PROTOSCOLOS.....165

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DE LAS VITAMINAS.

En 1912, el bioquímico inglés Sir Frederick Hopkins publicó un trabajo en la revista *Journal of Physiology* titulado “*Feeding experiments illustrating the importance of accessory food factors in normal dietaries*” que es considerado por muchos como el primer trabajo donde la existencia de las vitaminas quedó sólidamente establecida. Hopkins observó que las ratas alimentadas con una dieta con carbohidratos, proteínas, grasas y sales minerales dejaban de crecer si no se suplementaba dicha dieta con pequeñas cantidades de leche, lo que acertadamente le llevó a concluir que la leche contenía trazas de sustancias que eran necesarias para el crecimiento. Así mismo, estos estudios le llevaron a formular la hipótesis de que ciertas enfermedades, como el raquitismo y el escorbuto, estaban causadas por deficiencias en estas sustancias esenciales y que ahora

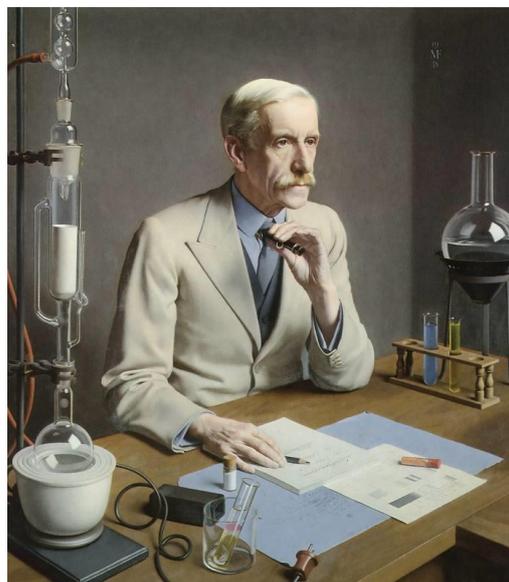


Figura 1. Imagen de Frederick Hopkins (tomada de <http://trome.pe/escolar/quien-fue-frederick-gowland-hopkins>).

conocemos como vitamina D (calciferol) y vitamina C (ácido ascórbico). Propuso para esas sustancias desconocidas que a día de hoy llamamos vitaminas el nombre de “factores accesorios de la alimentación”.

Anteriormente, Christiaan Eijkman había descubierto que la causa del beri-beri era la deficiencia de una sustancia vital que se encuentra en la cáscara del arroz. En 1897 descubrió que el arroz descascarillado producía en los pollos una enfermedad parecida al beri-beri y que sanaban cuando se les suministraba arroz natural, lo cual indicaba que la sustancia que prevenía el beri-beri se encontraba en la cáscara del arroz. Por todo ello en

1929, el premio Nobel de Medicina fue compartido por el holandés Christiaan Eijkman y el británico Frederick Hopkins. El primero fue galardonado por el descubrimiento del compuesto “antineurítico vitamin” y el segundo por el descubrimiento de las vitaminas que estimulan el crecimiento.

En aquellos años no se conocía la estructura química de las vitaminas, pero sí se sabía que algunas aparecían asociadas a los componentes grasos de los alimentos (vitaminas liposolubles), y otras a la parte acuosa (vitaminas hidrosolubles). El descubrimiento de las vitaminas ha escrito una de las páginas más brillantes de la ciencia moderna y ha sido el resultado de la estrecha colaboración entre las distintas disciplinas científicas, incluso a día de hoy se siguen descubriendo nuevas funciones de las vitaminas.

Las vitaminas son sustancias químicas no sintetizables por el organismo (excepto la vitamina D que se sintetiza en un 90 % de manera endógena, por lo que se considerada como una hormona esteroidea) presentes en pequeñas cantidades en los alimentos y son indispensables para la vida. Se han dividido en 2 grandes grupos:

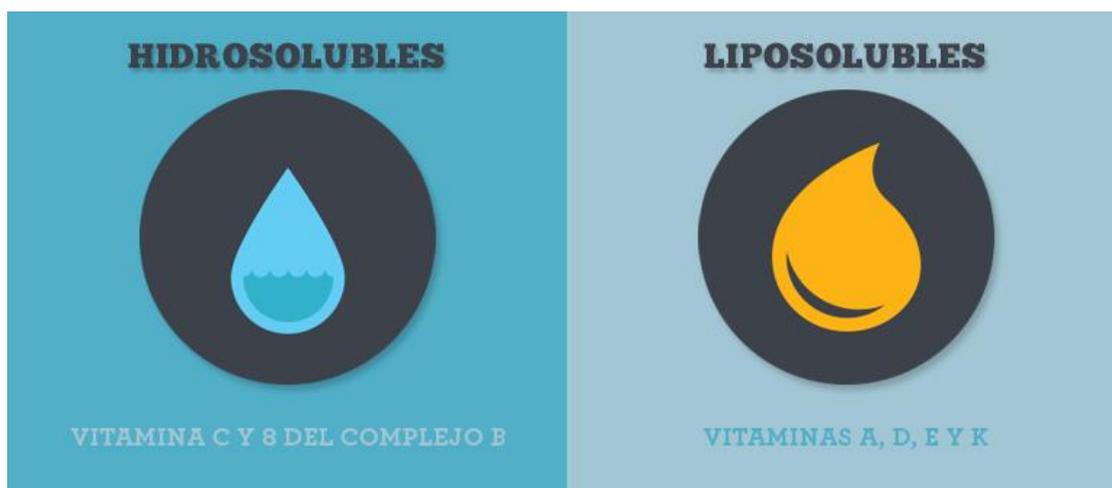


Figura 2. Vitaminas hidrosolubles y vitaminas liposolubles (imagen tomada de <http://alimentaelfuturo.com/conoce-lo-que-comes/vitaminas-hidrosolubles-y-liposolubles/>).

A) Vitaminas Liposolubles: Aquellas solubles en lípidos. Se acumulan en el organismo.

- Vitamina A
- Vitamina D
- Vitamina E
- Vitamina K

B) Vitaminas Hidrosolubles: Aquellas solubles en agua. No se acumulan en el organismo.

- Vitamina C
- Vitamina B1 (tiamina)
- Vitamina B2 (riboflavina)
- Vitamina B3 (niacina)
- Vitamina B5 (ácido pantoténico)
- Vitamina B6 (piridoxina)
- Vitamina B8 (biotina)
- Vitamina B9 (ácido fólico)
- Vitamina B12 (cobalamina)

Las vitaminas desempeñan multitud de funciones en el organismo y su carencia se asocia con diferentes enfermedades. Las principales funciones de cada vitamina se presentan en la siguiente tabla:

Vitamina A	<ul style="list-style-type: none"> -Es fundamental para la visión, el retinol contribuye a mejorar la visión nocturna -Interviene en el crecimiento y desarrollo óseo -Implicada en el desarrollo celular -Interviene en el sistema inmune -Antioxidante
Vitamina D	<ul style="list-style-type: none"> -La principal función de esta vitamina es mantener los niveles de calcio y fósforo

	<ul style="list-style-type: none"> -Participa en el crecimiento y maduración celular -Fortalece al sistema inmune
Vitamina E	<ul style="list-style-type: none"> -Función antioxidante -Mantenimiento del sistema inmune -Protege al organismo contra los efectos del envejecimiento -Mantenimiento de la integridad y estabilidad de la membrana axonal -Previene la trombosis -Es importante en la formación de fibras del tejido conjuntivo (elásticas y colágeno) -Protección contra la destrucción de la vitamina A, selenio, ácidos grasos y vitamina C -Protección contra la anemia
Vitamina K	<ul style="list-style-type: none"> -Coagulación sanguínea -Participa en el metabolismo óseo, ya que la osteocalcina requiere de la vitamina K para su maduración
Vitamina C	<ul style="list-style-type: none"> -Función antioxidante -Mejora la visión -Es antibacteriana, por lo que inhibe el crecimiento de ciertas bacterias dañinas para el organismo -Repara y mantiene cartílagos, huesos y dientes -Disminuye los niveles de tensión arterial y previene la aparición de enfermedades vasculares -Tiene propiedades antihistamínicas -Ayuda a prevenir o mejorar afecciones de la piel como eccemas o psoriasis -Es imprescindible en la formación de colágeno -Aumenta la producción de estrógenos durante la menopausia -Mejora el estreñimiento por sus propiedades laxantes
Vitamina B1	<ul style="list-style-type: none"> -Implicada en la transformación de los alimentos en energía -Absorción de glucosa por parte del sistema nervioso

Vitamina B2	<ul style="list-style-type: none"> -Interviene en la transformación de los alimentos en energía -Ayuda a conservar una buena salud visual -Interviene en el mantenimiento de las células del sistema nervioso -Interviene en la regeneración de los tejidos de nuestro organismo (piel, cabellos, uñas) -Produce glóbulos rojos junto a otras vitaminas del complejo B, y en conjunto con la niacina y piridoxina mantiene al sistema inmune en perfecto estado -Complementa la actividad antioxidante de la vitamina E
Vitamina B3	<ul style="list-style-type: none"> -Obtención de energía a partir de los hidratos de carbono -Mantiene el buen estado del sistema nervioso junto a la piridoxina y la riboflavina -Mejora el sistema circulatorio
Vitamina B5	<ul style="list-style-type: none"> -Forma parte de la Coenzima A -Interviene en la síntesis de la adrenalina en las glándulas suprarrenales, a partir del tirosina -Interviene en el metabolismo de proteínas, hidratos de carbono y grasas -Es necesaria para la formación de anticuerpos -Interviene en el metabolismo del hierro -Interviene en la formación de insulina -Ayuda a aliviar los síntomas de la artritis -Reduce la acidez gástrica junto a la biotina y la tiamina -Ayuda a disminuir los niveles de colesterol en sangre
Vitamina B6	<ul style="list-style-type: none"> -Transformación de hidratos de carbono y grasas en energía -Interviene en el proceso metabólico de las proteínas -Mejora la circulación general -Ayuda en el proceso de producción de ácido clorhídrico en el estómago -Mantiene el sistema nervioso en buen estado -Mantiene el sistema inmune

	<ul style="list-style-type: none"> -Interviene en la formación de hemoglobina en sangre -Es fundamental su presencia para la formación de niacina -Ayuda a absorber la cobalamina
Vitamina B8	<ul style="list-style-type: none"> -Interviene en la formación de hemoglobina -Interviene en procesos celulares a nivel genético -Interviene en el proceso de obtención de energía a partir de la glucosa -Es necesaria su presencia para la correcta metabolización de hidratos de carbono, proteínas y lípidos -Funciona en conjunto con el ácido fólico y el ácido pantoténico -Mantiene las uñas, piel y cabellos sanos -Ayuda a prevenir la neuropatía diabética y estabiliza los niveles de glucemia
Vitamina B9	<ul style="list-style-type: none"> -Participa en el metabolismo del ADN, ARN y proteínas -Necesario para la formación de glóbulos rojos -Reduce el riesgo de aparición de defectos del tubo neural del embrión y feto como es la espina bífida -Disminuye la incidencia de enfermedades cardiovasculares -Previene algunos tipos de cáncer
Vitamina B12	<ul style="list-style-type: none"> -Interviene en la síntesis de ADN, ARN y proteínas -Interviene en la formación de glóbulos rojos -Mantiene la vaina de mielina de las células nerviosas -Participa en la síntesis de neurotransmisores -Es necesaria en la transformación de los ácidos grasos en energía -Ayuda a mantener la reserva energética de los músculos -Interviene en el buen funcionamiento del sistema inmune -Es necesaria para el metabolismo del ácido fólico

Tabla I. Principales funciones de las vitaminas¹.

El requerimiento diario de vitaminas que el organismo necesita ha sido establecido científicamente tras años de investigación. Las cantidades necesarias son diferentes según el sexo y la edad de la persona; y en el caso de las mujeres también cambia durante el embarazo y la lactancia. Sus valores se expresan en diferentes unidades, generalmente microgramos (μg) o miligramos (mg) según sea la vitamina de la que se habla, pero también se puede encontrar indicada en unidades internacionales (UI). El consumo de sustancias como el tabaco, alcohol, café, té y ciertos medicamentos, interfieren en el estado nutricional y vitamínico del organismo, además de los métodos de cocción de los alimentos que pueden afectar a su contenido vitamínico.

REQUERIMIENTOS DIARIOS	HOMBRES	MUJERES
Vitamina A	900 μg	700 μg
Vitamina D	5 μg	5 μg
Vitamina E	15 mg	15 mg
Vitamina K	120 mg	120 mg
Vitamina B1	1,2 mg	1,1 mg
Vitamina B2	1,3 mg	1,1 mg
Vitamina B3	16 mg	14 mg
Vitamina B5	8 mg	8 mg
Vitamina B6	1,3 mg	1,3 mg
Vitamina B8	100 μg	100 μg
Vitamina B9	300 μg	300 μg
Vitamina B12	2,4 μg	2,4 μg
Vitamina C	90 mg	75 mg

Tabla II. Requerimientos diarios de vitaminas para una persona promedio con edad entre 19 y 50 años según el departamento de nutrición del IOM (Institute of Medicine - Instituto de Medicina)¹.

El déficit de vitaminas puede dar lugar a multitud de enfermedades, dependiendo de la vitamina deficiente. Entre las principales patologías que producen déficit de vitaminas podemos destacar el escorbuto, problemas de coagulación, raquitismo, dermatitis, pelagra, problemas de visión, beri-beri, infertilidad, anemia megaloblástica, anemia perniciosa, osteomalacia, etc. Por lo que es muy importante mantener una dieta equilibrada para evitar déficit de vitaminas.

2. VITAMINA D.

2.1 Introducción y estructura.

El hombre ya en la antigua Roma tenía conciencia de la existencia de una sustancia que a día de hoy denominamos vitamina D. Pero no es hasta el siglo XVII, cuando el raquitismo era endémico de Europa, cuando el doctor Francis Glisson en 1650 hizo la primera descripción científica del raquitismo, posiblemente utilizando las primeras descripciones sobre el raquitismo del estudiante de medicina Daniel Whistlerr en 1645. La asociación directa entre el raquitismo y la deficiencia de vitamina D se estableció a principios del siglo XIX; en 1807 Bardsley escribió sobre el uso del aceite de hígado de bacalao en la prevención de la osteomalacia y, en 1890, Palm sugirió que la luz del sol poseía acción antirraquítica. En 1913, se describió la existencia de un factor en el aceite de hígado de bacalao que era esencial para el crecimiento y que denominaron vitamina A². Poco después en 1921, Edward Mellanby indujo raquitismo a perros y comprobó que la administración de hígado de bacalao era capaz de curar la enfermedad, por lo que asumió que la vitamina A del aceite de bacalao era capaz de prevenir y curar el raquitismo³. Posteriormente, se demostró que la destrucción de la vitamina A del aceite de hígado de bacalao por calor no eliminaba su actividad de prevención del raquitismo, por lo que dedujeron que este efecto debía deberse a un factor resistente al calor y lo denominaron vitamina D⁴. Simultáneamente, Huldschinsky demostró mediante estudios clínicos que la exposición de niños a la luz solar o a la luz ultravioleta era también capaz de prevenir o curar esta enfermedad. En 1923, identificaron que cuando un precursor de la vitamina D en la piel (7-dehidrocolesterol) era irradiado con luz solar o ultravioleta se producía una sustancia equivalente a la vitamina D del hígado de bacalao⁵. En las siguientes décadas, se demostró que la piel podía producir cantidades adecuadas de

vitamina D, por lo que ésta podía no ser un componente dietético esencial, lo cual no se ajusta a la definición de vitamina. Aunque actualmente la vitamina D es considerada como una hormona esteroidea, debido al gran desarrollo de la nutrición a principios de siglo XX y al descubrimiento de las familias de vitaminas hidrosolubles y liposolubles, rápidamente quedó establecida su catalogación como vitamina y continúa clasificándose como tal por sus aspectos nutricionales relacionados con la salud pública.

La vitamina D (calciferol) es un término genérico que engloba una serie de esteroides liposolubles derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, las 2 formas principales que se encuentran en el organismo son el colecalciferol y el ergocalciferol. La diferencia entre ambas formas de vitamina D se encuentra en la cadena lateral⁶.

1) Colecalciferol (vitamina D3): derivado del colesterol y sintetizado a partir de la exposición solar o del consumo de alimentos de origen animal.

2) Ergocalciferol (vitamina D2): derivado del ergosterol y sintetizado a partir de la ingesta de alimentos de origen vegetal (p.ej. setas).

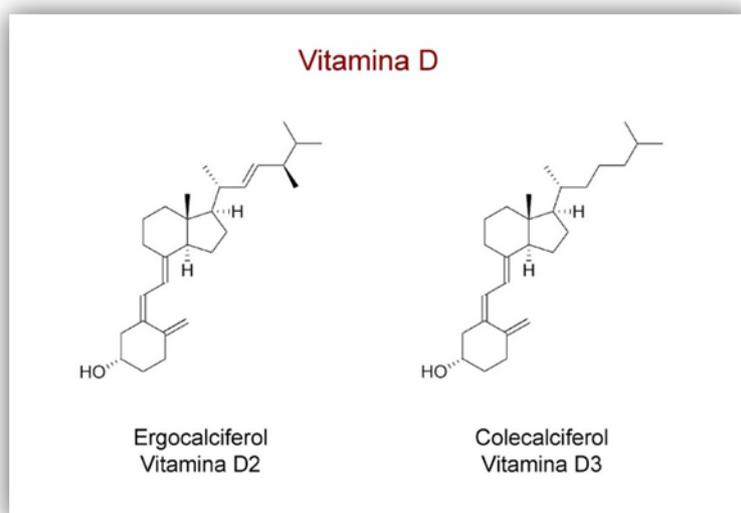


Figura 3. Estructura química del ergocalciferol y del colecalciferol (imagen tomada de <http://las-hormonas.blogspot.com.es/2013/07/la-vitamina-d-de-mis-huesos.html>).

2.2 Fuentes de vitamina D.

La vitamina D, a diferencia del resto de vitaminas, no es necesario su aporte en gran parte de la población para mantener unos niveles óptimos, debido a que la mayor parte de ella se sintetiza de forma endógena. La vitamina D se puede obtener de manera exógena, a través de la dieta, que corresponde con aproximadamente el 10% del total y endógena, por síntesis cutánea favorecida por la luz ultravioleta, de la cual se obtiene el 90 % de vitamina D⁷⁻¹⁰.

a) Fotobiogénesis:

Es el proceso por el cual el 7-dehidrocolesterol, derivado del colesterol, se transforma en vitamina D3 en la piel. La radiación ultravioleta, longitud de onda que varía entre los 290 y 315 nm¹¹, produce la fotoconversión del 7-dehidrocolesterol en previtamina D o precalciferol (se produce la rotura del anillo B del 7-dehidrocolesterol en su enlace 9-10)¹². A continuación, se produce una isomerización química dependiente de la temperatura corporal para transformar la previtamina D3 en vitamina D3^{13,14}. La producción de vitamina D3 es un proceso lento y progresivo (a temperatura corporal la isomerización del 50% de la previtamina D3 se produce en 28 horas y son necesarias 36 horas para que se transforme el 96% de la previtamina D3 en vitamina D3). La previtamina D3 tiene poca afinidad por la proteína transportadora de vitamina D (VDBP), por eso permanece en la piel para su conversión en vitamina D3, cuando se produce dicha transformación a vitamina D3 aumenta su afinidad a la VDBP y es transportada al hígado para iniciar su transformación metabólica.

La síntesis de vitamina D endógena depende de varios factores, de los cuales hay que destacar la edad, los diferentes polimorfismos de la 7-dehidrocolesterol reductasa, la calidad e intensidad de la radiación ultravioleta, la pigmentación de la piel, etc. El proceso de fotobiogénesis de la vitamina D nunca producirá toxicidad, ya que cualquier exceso de luz solar convierte a la previtamina D en dos esteroides biológicamente inertes: el lumisterol y el taquicolesterol.

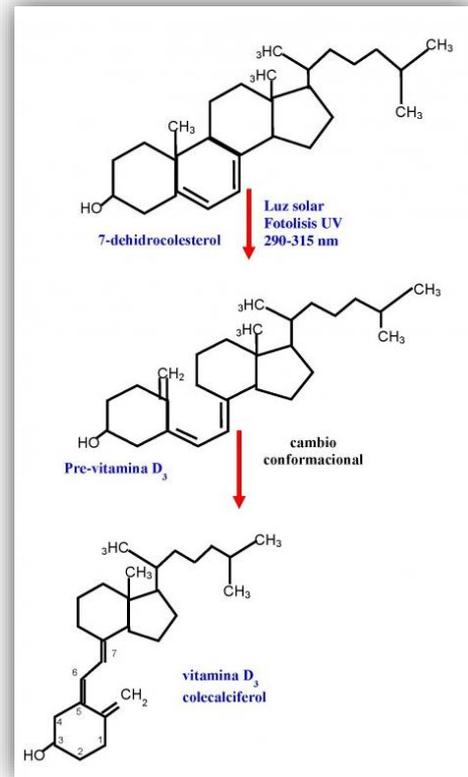


Figura 4. Esquema del proceso de fotobiogénesis (imagen tomada de <http://cienciaybiologia.com/vitamina-d/>).

b) Fuente alimentaria:

La vitamina D también puede ser obtenida de la dieta (10% del total) a través de

fuentes naturales ricas en vitamina D₃, como es el caso de los pescados azules, huevos o hígados animales y siendo ésta la forma más frecuente; o bien a través de determinadas plantas y hongos irradiados con luz solar (ej: champiñones) que metabolizan el ergosterol a vitamina D₂¹⁵.

ALIMENTOS CON MAYOR CONTENIDO EN VITAMINA D (µg/100 g)	
Leche	0,01-0,04
Queso	0,03-0,5
Huevos	1,75
Mantequilla	1,00-3,00

Aceite de Hígado de Bacalao	330,00
Hígado	0,2-1,1
Salmón	16,00
Aranque	27,00
Anguila	20,00

Tabla III. Contenido en vitamina D en μg /100g de alimento¹.

La mayoría de los estudios informan que la vitamina D3 es superior a la vitamina D2 en términos de biodisponibilidad y en el mantenimiento de unos niveles óptimos¹⁶⁻²¹, por lo que en la actualidad se recomienda la suplementación en los casos que sea necesario con vitamina D3.

2.3 Absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Como se mencionó anteriormente, el 90% de la vitamina D se sintetiza en la piel por medio de la radiación de la luz solar sobre el 7-dehidrocolesterol, y el 10 % restante procede de la dieta. La vitamina D ingerida se absorbe entre un 50-60% junto con las grasas en el yeyuno e íleon, por lo que también es necesario la presencia de sales biliares para la producción de las micelas. Debido a ello, una patología que altere la absorción de las grasas provocaría a su vez una disminución en la absorción de vitamina D; éste es el caso de pacientes con pancreatitis crónicas, enfermedad celiaca u obstrucción biliar que presentaran una malabsorción de la vitamina D²². Una vez dentro de los enterocitos, la vitamina D se incorpora a los quilomicrones donde es transportada por vía linfática al hígado. La captación de la vitamina D por el hígado se realiza por medio de la VDBP, proteína sintetizada por el propio hígado. Esta proteína es una alfa-globulina que actúa como transportadora en la sangre de la vitamina D y de todos sus metabolitos, pero además se considera el principal lugar de almacenamiento de ésta (principalmente en la forma 25(OH)-vitamina D). Es decir, el tejido con mayor concentración de vitamina D es la sangre, siendo otros lugares de almacenamiento de esta vitamina el tejido adiposo y el músculo. Un exceso de vitamina D se acumula en el tejido adiposo principalmente.

Tanto la vitamina D endógena, transportada por la VDBP, como la vitamina D de la dieta, transportada por los quilomicrones, llegan al hígado donde comienza su metabolismo. La vitamina D que llega al hígado sufre rápidamente una hidroxilación en el carbono 25 por la enzima vitamina D 25-hidroxilasa para obtener la 25(OH)-vitamina D tanto en el retículo endoplasmático como en la mitocondria²³. Esta reacción de hidroxilación se produce tanto en el colecalciferol (vitamina D3), como en el ergocalciferol (vitamina D2).

La 25(OH)-vitamina D es el metabolito circulante más abundante de la vitamina D, el 88% se encuentra unido a la VDBP, el 0.03% se encuentra libre y el resto unido a la albúmina. La vida media de la 25(OH)-vitamina D es de 2 a 3 semanas²⁴, pero su vida media se acorta cuando las concentraciones de VDBP se reducen, como ocurre en el síndrome nefrótico.

El complejo 25(OH)-vitamina D-VDBP es filtrado en el glomérulo renal y por endocitosis mediada por receptor entra en la célula tubular. Es allí donde tiene lugar la segunda hidroxilación. Esta hidroxilación en el riñón es llevada a cabo por 2 enzimas, la 25(OH)-vitamina D alfa-1-hidroxilasa (alfa-1-hidroxilasa) y la 25(OH)-vitamina D 24-hidroxilasa (24-hidroxilasa), que se encuentran principalmente en el túbulo contorneado proximal. Mediante una hidroxilación mitocondrial por la enzima alfa-1-hidroxilasa se forma 1,25(OH)₂-vitamina D (calcitriol), que es el metabolito más activo. Si por el contrario se activa la enzima 24-hidroxilasa se forma 24,25(OH)₂-vitamina D (24-R-calcitriol) metabolito menos activo.

La enzima alfa-1-hidroxilasa está regulada principalmente por las concentraciones séricas de paratohormona (PTH), fosfato y calcitriol; un aumento de PTH, como consecuencia de una disminución de la concentración de calcio, y la hipofosfatemia, estimulando la enzima, aumentan la producción de calcitriol. Aunque la mayor parte del calcitriol es producido en el riñón, en los últimos años se ha descrito actividad alfa-1-hidroxilasa en varios tejidos, principalmente piel, colon, próstata, glándula mamaria, médula adrenal, páncreas, cerebro y placenta²⁵. Por lo que aparte de la producción sistémica de calcitriol por parte del riñón, también existe una síntesis local en varios tejidos.

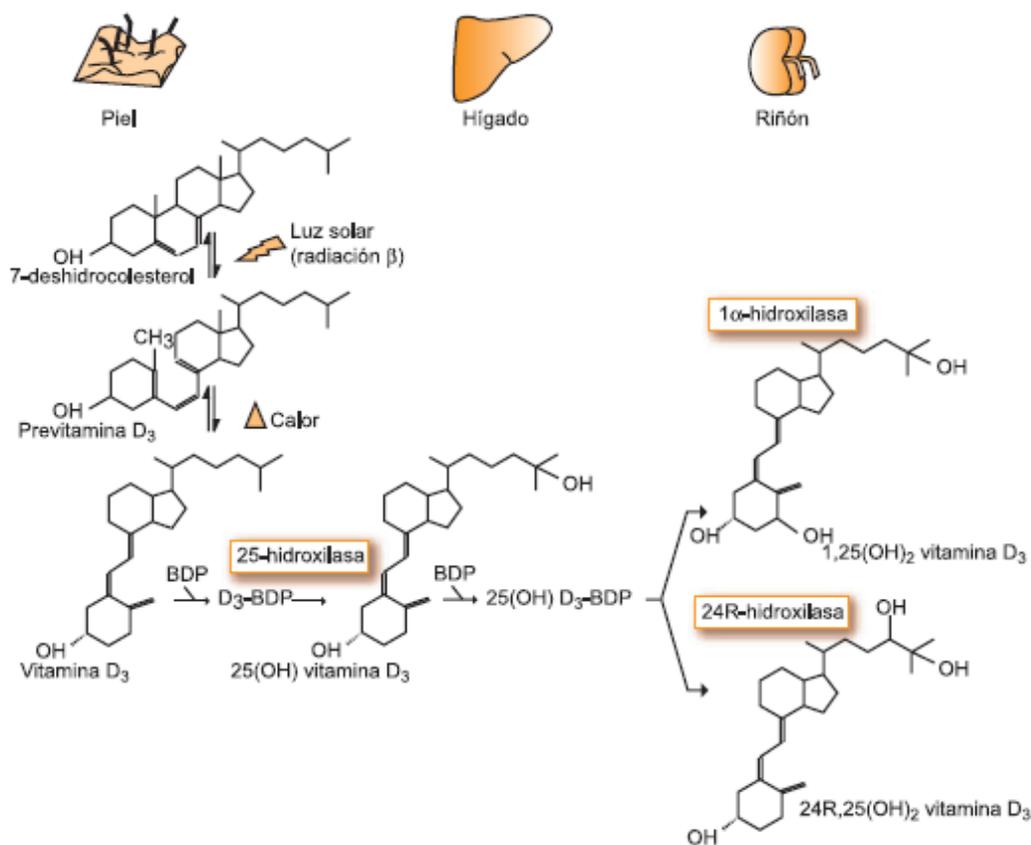


Figura 5. Metabolismo de la vitamina D (imagen tomada de Gil A. Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 4 vols. 2ª ed. Médica Panamericana; 2010).

La principal vía de excreción de los metabolitos de la vitamina D es la bilis, aunque una pequeña parte, menos del 5%, se excreta por la orina. La vitamina D en la bilis ésta principalmente como metabolitos hidroxilados y polares y sus correspondientes conjugados con glucurónico, y sólo una pequeña proporción está en forma de calcitriol o 25(OH)-vitamina D. La inactivación de la vitamina D ocurre principalmente en el riñón por acción de la 24-hidroxilasa, que transforma el 1,25(OH)₂-vitamina D en 1,24,25(OH)₃-vitamina D y el 25(OH)-vitamina D en 24,25(OH)₂-vitamina D para acabar formando ácido calcitroico que es un compuesto hidrosoluble e inactivo biológicamente que es excretado por la bilis²⁶, después de diversas oxidaciones y, en algunos casos, conjugación con glucurónico.

2.4 Mecanismos de regulación de la síntesis y degradación de la vitamina

D.

Como se mencionó anteriormente, en el riñón se producen las 2 formas activas de la vitamina D, el calcitriol y el 24-R-calcitriol, siendo el metabolismo más activo el calcitriol. Los factores que regulan la síntesis de calcitriol son principalmente los depósitos de vitamina D, la PTH y los niveles de calcio y fosfato²⁷. La enzima clave implicada en la regulación de la síntesis de calcitriol es la alfa-1-hidroxilasa, que está influenciada por los niveles de PTH y de calcio plasmáticos.

---Niveles bajos de calcio producen un incremento de PTH que a su vez activa la transcripción de la alfa-1-hidroxilasa (aumentando por tanto su actividad y como consecuencia la producción de calcitriol)^{28,29} e inhibe la 24-hidroxilasa (disminuyendo la producción de 24-R-Calcitriol).

---Cuando los niveles de calcio son adecuados o altos, éste inhibe la secreción de PTH y el calcitriol inhibe la alfa-1-hidroxilasa y activa la 24-hidroxilasa, por lo que induce su propia inactivación formándose 1,24,25(OH)₃-vitamina D.

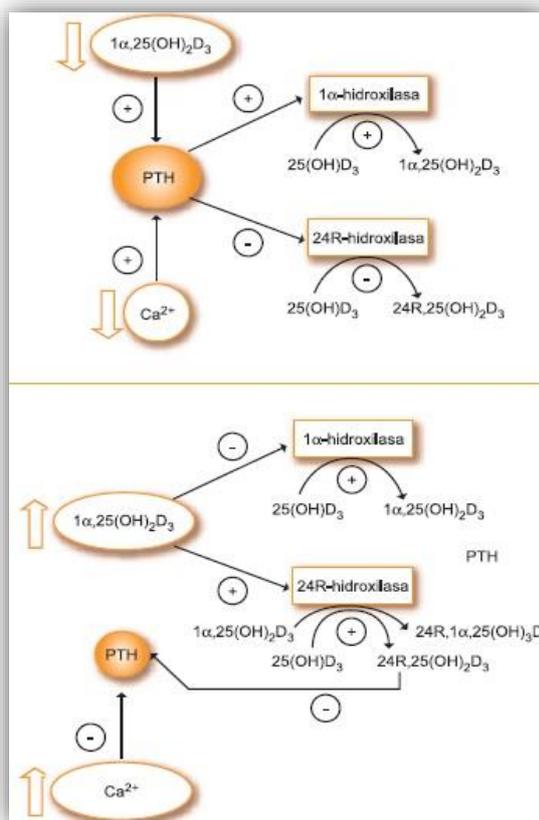


Figura 6. Control de la síntesis y degradación de la vitamina D. Imagen tomada de Gil A. Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 4 vols. 2ª ed. Médica Panamericana; 2010).

---Los niveles de fósforo séricos actúan de forma directa; una hipofosfatemia incrementa la producción de calcitriol y la hiperfosfatemia la síntesis de 24,25 (OH)₂-vitamina D²⁷.

2.5 Mecanismo de acción de la vitamina D.

El intestino, hueso y riñón son los principales órganos diana de los metabolitos activos de la vitamina D, donde se une a receptores específicos. El calcitriol y el 24-R-calcitriol se unen a sus receptores para ejercer sus funciones, el calcitriol puede unirse al receptor nuclear de vitamina D (VDRnuc) y al receptor de membrana de vitamina D (VDRmem 1,25), mientras que el 24-R-calcitriol tiene capacidad de unirse a otro tipo de receptor de membrana (VDRmem 24,25). La función del receptor nuclear está relacionada con la respuesta transcripcional, mientras que los receptores de membrana median respuestas biológicas rápidas no transcripcionales que implican la estimulación de cascadas de transducción de señales.

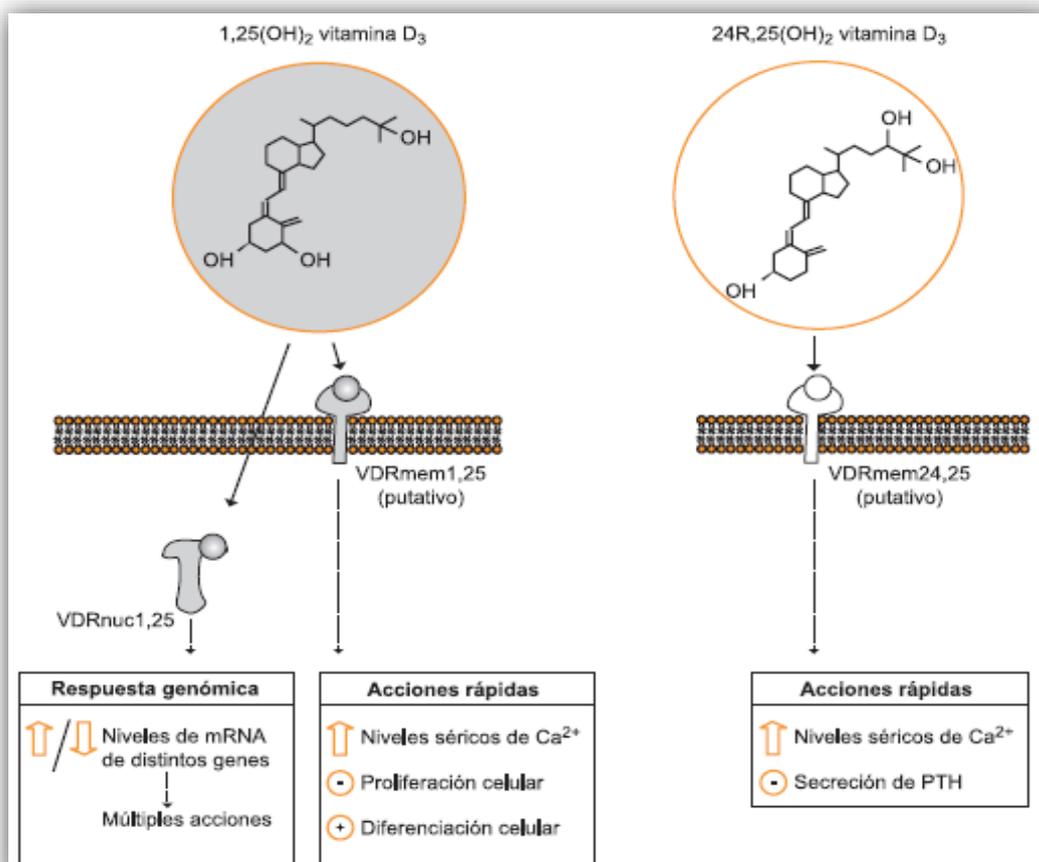


Figura 7. Receptores de la vitamina D (Imagen tomada de Gil A. Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 4 vols. 2ª ed. Médica Panamericana; 2010).

El receptor VDRmem 1,25 se encuentra ampliamente distribuido en casi todos los tejidos del organismo, encargado de llevar a cabo las respuestas biológicas rápidas mediadas por cascadas de señalización. La activación del receptor produce la entrada de calcio dentro de la célula y la liberación del calcio de los depósitos intracelulares, mediado por adenilato ciclasa y proteína quinasa A. Este incremento de calcio intracelular produce la activación de las cascadas de señalización intracelular dando lugar a respuestas biológicas rápidas. Los principales efectos mediados por este receptor son la estimulación de la absorción de calcio tanto a nivel intestinal como en los osteoblastos, inhibición de la proliferación celular y la inducción de la diferenciación en distintos tipos de células, como osteoblastos, queratinocitos y colonocitos.

El receptor VDRmen 24,25 se encuentra limitado exclusivamente a las células del hueso y del cartílago, así como a las células secretoras de PTH. La activación de este receptor activa las vías de señalización dependientes de proteínas quinasas D y C y las quinasas activadas por mitógenos (MAPK), produciendo efectos tanto a nivel transcripcional como no transcripcional. Los principales

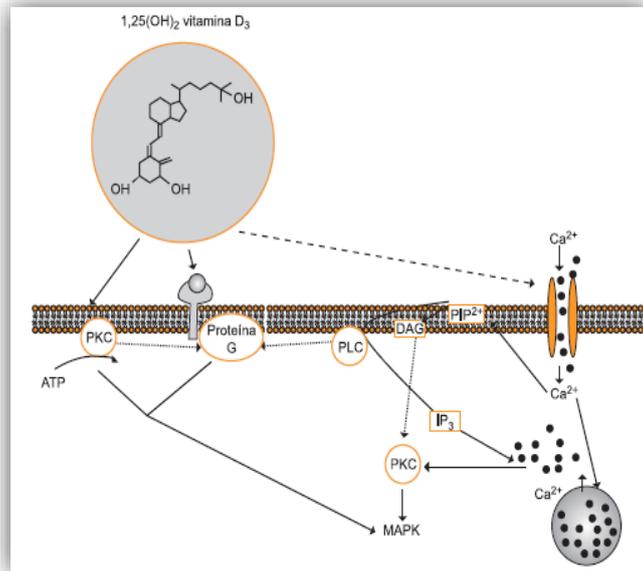


Figura 8. Mecanismo de acción del receptor de membrana del calcitriol (Imagen tomada de Gil A. Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 4 vols. 2ª ed. Médica Panamericana; 2010).

efectos mediados por este receptor son el aumento de las concentraciones de calcio séricas y la inhibición de la secreción de PTH.

El receptor VDRnuc se activa al unirse el calcitriol, se heterodimeriza con el receptor de ácido retinoico, lo que le confiere la capacidad de acoplarse a diferentes regiones del ADN para regular la transcripción génica (efecto genómico, que tarda de horas a días)³⁰. Este receptor presenta una afinidad 1.000 veces mayor por el calcitriol que por la 25(OH)-vitamina D. Mutaciones en el gen del receptor VDRnuc causan raquitismo resistente a la vitamina D, una enfermedad autosómica recesiva poco frecuente, también conocida como raquitismo de tipo II dependiente de vitamina D.

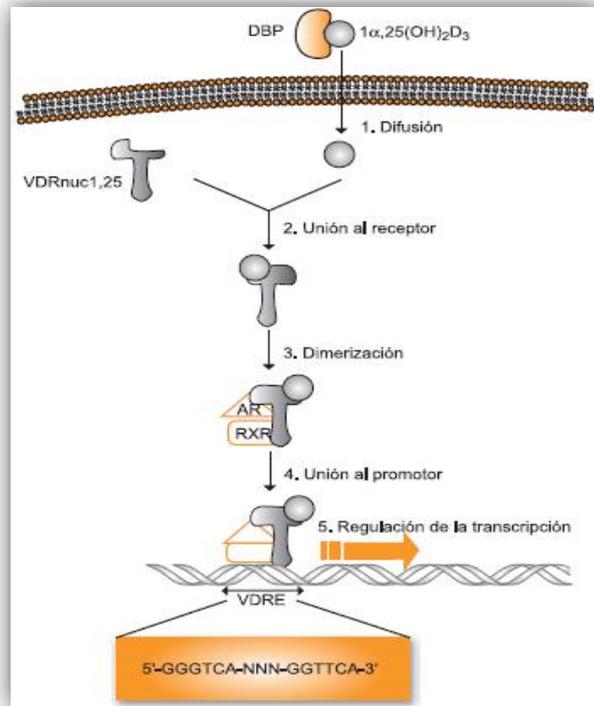


Figura 9. Mecanismo de acción del receptor nuclear del calcitriol (Imagen tomada de Gil A. Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 4 vols. 2ª ed. Médica Panamericana; 2010).

2.6 Funciones clásicas de la vitamina D.

Las acciones clásicas de la vitamina D están relacionadas con el metabolismo fosfocálcico. La vitamina D se encarga junto con la PTH del mantenimiento de los niveles de calcemia constante en el organismo. Los tres principales órganos sobre los que actúa son el intestino delgado, hueso y riñón^{26,31,32}. Cuando los niveles de calcio están por debajo de los niveles homeostáticos se estimula la síntesis de PTH en las glándulas paratiroides, el aumento de la PTH produce el incremento de la concentración de calcio en sangre mediante su reabsorción renal, la liberación de calcio por el hueso y la activación renal de la formación de calcitriol. El calcitriol a su vez aumenta la absorción intestinal de calcio, la liberación de calcio del hueso y la reabsorción en el riñón. Por el contrario, el incremento de los niveles séricos de calcio produce la inhibición de la secreción de la PTH, lo que implica la disminución de la biosíntesis de calcitriol y de la movilización de calcio. Además, un aumento de los niveles séricos de calcio produce la liberación de calcitonina por las células C del tiroides, que bloquea la movilización de calcio del hueso y estimula la excreción de calcio y fósforo en el riñón.

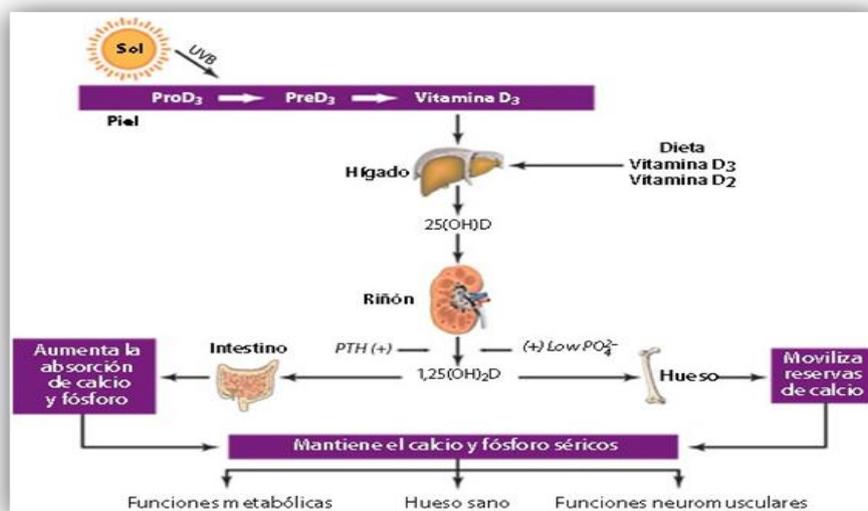


Figura 10. Esquema del metabolismo de la vitamina D (imagen tomada de <http://pacienterenal.general-valencia-san-gva-es/Paginas/EnfermedadRenal.aspx>)

La acción de la PTH es en cuestión de minutos, sin embargo la del calcitriol requiere muchas horas, por lo que la regulación a corto plazo del control del calcio depende de la acción de la PTH en el riñón y hueso, y sólo en casos de hipocalcemia prolongada provocará un incremento del calcitriol y por lo tanto sus efectos fisiológicos.

El calcitriol presenta una actividad biológica 500-1000 veces mayor que sus precursores. Anteriormente, se consideraba que las formas 25(OH)-vitamina D₂ y 25(OH)-vitamina D₃ presentaban igual efectividad biológica, sin embargo estudios de bioequivalencia en las últimas décadas, utilizando los métodos analíticos actualmente más fiables, han mostrado que la vitamina D₃ es substancialmente más eficaz que la vitamina D₂^{20,21}. Aunque tras una dosis única ambas formas producen similares aumentos de 25(OH)-vitamina D en suero (los tres primeros días), la administración de vitamina D₃ da lugar a un aumento continuado con un máximo hacia el día 14, que no se logra con la administración con vitamina D₂.

a) **Intestino:** la acción biológica que produce el calcitriol en el intestino delgado es aumentar la absorción de calcio y fósforo. Este proceso se lleva a cabo por la unión del calcitriol a su receptor, lo cual induce el reclutamiento de canales epiteliales de calcio, denominados EcaC1 y EcaC2 que predominan en el riñón e intestino respetivamente, además de un canal transportador de calcio denominado CaT1 sensible a calcitriol. El calcitriol también tiene un efecto más a largo plazo, mediante la inducción de la síntesis de más canales de calcio, de calbindina

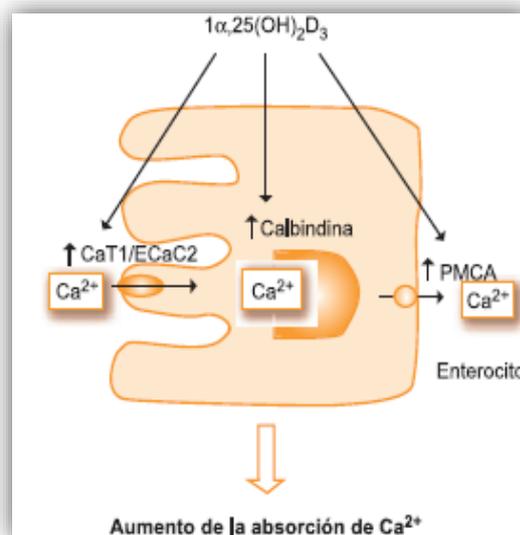


Figura 11. Mecanismo de acción de la vitamina Den en el intestino (Imagen tomada de Gil A. Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 4 vols. 2ª ed. Médica Panamericana; 2010).

(encargada del transporte del calcio en el enterocito) y de transportadores de calcio (que se encargan de la expulsión del calcio desde la membrana basolateral del enterocito). El calcio que entra dentro del enterocito por los canales EcaC que responden a calcitriol, se une a la calbindina que se encarga del transporte de calcio desde la membrana apical a la membrana basolateral, donde el calcio saldrá por transporte activo, manteniendo así los niveles de calcio intracelular bajos. Además, el calcitriol estimula también la absorción intestinal de fósforo, principalmente en yeyuno e íleon.

b) Hueso: El calcitriol es esencial en el desarrollo, crecimiento y mineralización del tejido óseo. Por una parte promueve la calcificación ósea y por otra facilita la liberación de calcio y fósforo depositado en la matriz ósea mineralizada al activar indirectamente los osteoclastos cuando se incrementan los niveles de PTH, contribuyendo de esta manera al mantenimiento de los niveles séricos de calcio y fósforo en el líquido extracelular.

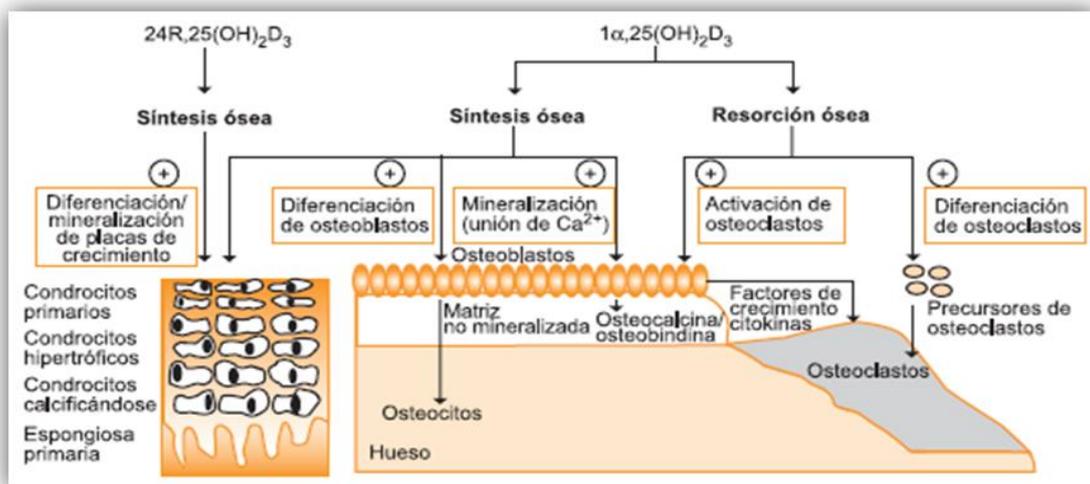


Figura 12. Mecanismo de acción de la vitamina D en el hueso (Imagen tomada de Gil A. Tratado de Nutrición: Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 4 vols. 2ª ed. Médica Panamericana; 2010).

Parece que tanto el calcitriol como el 24-R-calcitriol intervienen en la formación del hueso promoviendo la proliferación y la diferenciación de los condrocitos de la placa de crecimiento epifisario, por medio de receptores específicos. Se ha descrito que el VDR

regula la expresión de varios genes en los osteoblastos, los cuales codifican para proteínas de la matriz ósea, osteocalcina y osteopontina. Sin embargo, cuando el calcio de la dieta es inadecuado para satisfacer los requerimientos de calcio del organismo, el calcitriol, conjuntamente con la PTH, moviliza los precursores de los osteoblastos en la médula ósea hacia osteoclastos maduros, los cuales aumentarán la movilización de calcio desde el hueso. Tanto la PTH como el calcitriol promueven la diferenciación de los osteoclastos y aumenta la actividad osteoclástica. De esta forma la vitamina D mantiene el calcio y fósforo sanguíneo en concentraciones idóneas y en condiciones de sobresaturación se depositan en el hueso como hidroxapatita cálcica.

c) Riñón: La principal función que ejerce el calcitriol a nivel renal es aumentar la reabsorción tubular de calcio y fósforo^{31,32}, principalmente en el túbulo distal. El mecanismo es similar al descrito para la absorción de calcio en el intestino; el calcitriol afecta al transporte de calcio a través de la membrana celular ejerciendo su efecto sobre la entrada a través de la membrana apical (incrementa la expresión de ECaC1), sobre la difusión a través del citosol mediante la calbindina (incrementa los niveles de esta proteína) y sobre la salida activa de calcio a través de la membrana basolateral (expresión de transportadores activos).

2.7 Funciones no clásicas de la vitamina D.

Las nuevas funciones atribuidas a la vitamina D son en gran parte apoyadas en la existencia de receptores específicos para el calcitriol en diferentes tejidos del organismo; entre ellos la piel, el músculo, la placenta, el cerebro, el tejido mamario, las gónadas, el tiroides, la hipófisis, el páncreas, el timo, y los linfocitos T y B³⁰, y se ha especulado con relación a su posible significado biológico. También se ha comprobado que además del riñón, otros tejidos, como la piel (queratinocitos), el folículo piloso, los ganglios linfáticos (macrófagos), el colon, la glándula mamaria, la médula adrenal, el páncreas, el cerebro y la placenta, expresan la enzima mitocondrial alfa-1 hidroxilasa y producen calcitriol, ejerciendo su efecto de forma autocrina o paracrina en estos tejidos²⁵.

Los últimos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la vitamina D en la regulación del sistema inmune, funciones reproductoras, proliferación de células hematopoyéticas y función neuromuscular, entre otras.

a) Efectos de la vitamina D sobre la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. Vitamina D y Cáncer.

Ahora es bien reconocido que los efectos no calcémicos del calcitriol son tan importantes como los clásicos. De hecho, el calcitriol no sólo modula la calcemia y fosfatemia, sino que también afecta a las funciones de los órganos y sistemas de forma paracrina y/o autocrina. Se ha demostrado tanto in vitro como en modelos animales que el calcitriol tiene acciones anti-proliferativas, pro-diferenciadoras y pro-apoptóticas en las células cancerosas^{33,34}; tal es así, que se ha propuesto que la vitamina D podría disminuir la progresión del cáncer o prevenirlo. Una gran cantidad de evidencia epidemiológica y clínica ha puesto al descubierto la estrecha relación que existe entre la

deficiencia de vitamina D y el riesgo de desarrollo de cáncer. Los estudios observacionales han relacionado los niveles bajos de vitamina D (relacionados con la ubicación geográfica, la dieta y la actividad) con un mayor riesgo de cáncer. En este sentido, según algunos estudios, entre 17-21 tipos de cáncer se correlacionan negativamente con el índice de UVB, es decir, la incidencia de cáncer es menor en latitudes con una alta exposición solar³⁵⁻³⁸.

Su mecanismo de acción está muy probablemente relacionado con los efectos de la vitamina D en la regulación del crecimiento, la muerte celular, la angiogénesis y la diferenciación celular. Sin embargo, los datos sobre el papel de la vitamina D en el riesgo de cáncer, la incidencia y la mortalidad siguen siendo controvertidos. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación inversa entre los niveles séricos de 25 (OH)-vitamina D y el riesgo de desarrollar cáncer de colorrectal, de mama, carcinoma hepatocelular, de próstata, etc. Sin embargo también existen estudios en los que han encontrado una correlación positiva en las concentraciones circulantes de 25 (OH)-vitamina D en pacientes con cáncer. En la actualidad, aún no ha sido claramente dilucidado si los niveles séricos bajos de 25 (OH)-vitamina D son la causa de parámetros asociativos con el cáncer.

- El cáncer colorrectal es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo³⁹. La presencia del VDR y 1- α -hidroxilasa en células colorrectales es lo que sugiere la asociación entre la vitamina D y este tipo de cáncer. Los estudios clínicos sugieren una relación inversa entre los niveles de calcio y vitamina D con respecto al riesgo de padecer cáncer colorrectal⁴⁰⁻⁴². Otro estudio demostró la asociación entre los niveles altos pre-diagnóstico de 25 (OH)-vitamina D y un menor riesgo de cáncer de colon⁴³. Estas observaciones sugieren que la vitamina D podría tener un efecto protector frente al cáncer colorrectal.

- El cáncer de mama es la forma más frecuente de cáncer en las mujeres y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres⁴⁴. Se ha descrito la presencia del VDR y de 1-alfa- hidroxilasa en las células epiteliales de la mama. Sin embargo, la asociación entre las concentraciones séricas de 25 (OH)-vitamina D y el riesgo de cáncer de mama es objeto de controversia. Algunos estudios no han encontrado una asociación entre las concentraciones circulantes de 25 (OH)-vitamina D y el riesgo de cáncer de mama⁴⁵, mientras que otros han informado de una asociación inversa entre las concentraciones circulantes de 25 (OH)-vitamina D y el riesgo de cáncer de mama⁴⁶. También se ha relacionado niveles altos de 25 (OH)-vitamina D con un menor riesgo de cáncer de mama^{47,48}. Un estudio que examinó el calcio más vitamina D en el cáncer de mama sugiere una disminución en el riesgo de cáncer de mama⁴⁹. Sin embargo, el hecho de que los niveles séricos de 25 (OH)-vitamina D de >52 ng / ml se han asociado con una reducción del 50% del riesgo de desarrollar cáncer de mama en comparación con las mujeres con 25OHD <13 ng / ml, sugiere que evitar la deficiencia/insuficiencia de vitamina D es la mejor manera de intentar prevenir esta patología^{50,51}. En la actualidad, no está claro si la hipovitaminosis D es una causalidad o el efecto de desarrollo del cáncer de mama, así como cuáles son los niveles óptimos de 25 (OH)-vitamina D séricos para reducir el riesgo de cáncer de mama.

- El carcinoma hepatocelular (CHC) es la sexta neoplasia más frecuente y la tercera causa más común de muerte por cáncer en todo el mundo⁵². El principal factor de riesgo para CHC es la infección crónica por hepatitis B o C que pueden conducir a la cirrosis que está presente en 80% a 90% de los casos de CHC⁵³. La deficiencia de vitamina D se ha asociado con CHC⁵⁴, y también se ha propuesto una relación causal de los bajos niveles de vitamina D con el desarrollo de CHC⁵⁵. Existen estudios en los cuales la suplementación con vitamina D para mantener los niveles dentro del rango de normalidad

consiguió reducir la incidencia de cáncer en este grupo con respecto a la población⁵⁶. Sin embargo, como en los otros tipos de cáncer tratados, en el CHC no está claro si la deficiencia de la vitamina D es una causa o una consecuencia de la patología.

Hasta la fecha, los efectos de la vitamina D en la carcinogénesis o la progresión del cáncer se desconocen y no está claro si la deficiencia de vitamina D es una causa o la consecuencia de padecer cáncer. Lo que sí parece estar totalmente claro es la multitud de beneficios para la salud que se consiguen al mantener los niveles séricos de vitamina D en el rango de normalidad, por lo que se aconseja no sólo conseguir estos mínimos en personas con ciertas patologías, sino también en toda la población.

b) Efectos de la vitamina D sobre el sistema inmunitario.

Otra de las funciones de la vitamina D es que tiene efectos moduladores sobre el sistema inmunitario, por lo tanto podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes más prevalentes como la diabetes, la artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, etc.^{57,58}. Revisiones de la bibliografía en las cuales se evalúa el papel de la vitamina D en las enfermedades autoinmunes han puesto de manifiesto las acciones moduladoras de la vitamina D, pero los mecanismos de asociación no están claros y se necesitan más estudios⁵⁹.

• **Esclerosis múltiple:** La esclerosis múltiple (EM) es enfermedad crónica e inflamatoria del sistema nervioso central (SNC). Se caracteriza por la destrucción de la mielina y los posteriores depósitos de tejido cicatrizado, se produce un debilitamiento tanto físico como cognitivo. El mecanismo exacto de la vitamina D en la EM sigue sin estar claro, pero las hipótesis sugieren que puede estar ligada a los supuestos beneficios inmunológicos y a una disminución del daño en el sistema nervioso⁶⁰.

Los datos epidemiológicos apoyan la relación entre el déficit de vitamina D y un mayor riesgo de padecer una EM. Mientras que la EM es una enfermedad prácticamente inexistente en el Ecuador, su prevalencia se incrementa de forma proporcional a medida que nos alejamos de él. También se ha descrito que los brotes de EM ocurren de forma característica durante el invierno y la primavera, períodos que se corresponden con los meses de menor irradiación UV y, por consiguiente, menores niveles séricos de vitamina D. Se ha demostrado que los pacientes con EM presentan unos niveles de 25 (OH)-vitamina D inferiores que los controles sanos, por lo que se ha asociado unos niveles adecuados de vitamina D con menor riesgo de desarrollar EM y un menor riesgo de recaídas⁶¹⁻⁶³. También existen evidencias que los suplementos con vitamina D producen una elevación en los niveles de 25 (OH)-vitamina D en estos pacientes⁶⁴⁻⁶⁶, pero no está claro si esto conduce a beneficios clínicos directos. Diversos estudios sugieren que suplementar con vitamina D a los pacientes con EM en remisión puede protegerles frente a nuevos brotes⁶⁷. Sin embargo, estas observaciones requieren cierta prudencia, en el sentido de que la propia enfermedad se asocia a una reducción tanto de la ingesta en general (pudiendo condicionar déficits de éste y otros elementos), como de las actividades al aire libre y, por lo tanto, de exposición a la radiación ultravioleta, que serán más acusados en aquellas zonas de escasa irradiación solar. Por lo que se hace necesaria la realización de ensayos clínicos de larga duración para establecer la verdadera asociación entre la esclerosis múltiple y la vitamina D.

• **Otras enfermedades autoinmunes:** Se ha asociado la vitamina D con enfermedades autoinmunes tales como la artritis reumatoide (AR) o el lupus eritematoso sistémico (LES).

Con respecto al LES se han encontrado unos niveles de 25 (OH)-vitamina D más bajos que en la población sana, pero hay que decir que a este déficit pueden contribuir los propios mecanismos fisiopatológicos de la propia enfermedad, algunos pacientes desarrollan anticuerpos anti-vitamina D y cómo no, la fotoprotección a la que están obligados⁶⁸.

En relación con la AR, se ha demostrado cambios en la concentración sérica de la vitamina D y la intensificación de los síntomas articulares en pacientes con esta patología. En concreto, encontraron que la concentración más baja de vitamina D y la mayor actividad de la AR se dan en la temporada invernal. Por otro lado, en poblaciones susceptibles, la ingesta de altas cantidades de vitamina D disminuye el riesgo de desarrollar AR y, en las personas que ya padecen la enfermedad, disminuye la actividad de la misma⁶⁹. Otro estudio en pacientes con AR describe que la ingesta de dosis altas de vitamina D muestra una relación inversa con la actividad de la enfermedad e inclusive se ha observado estímulo en proliferación de linfocitos T reguladores así como apoptosis de los linfocitos T autorreactivos⁷⁰.

Otras enfermedades autoinmunes que tienen relación con la deficiencia de vitamina D son: espondilitis anquilosante, síndrome de Sjögren, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, cirrosis biliar primaria, miastenia gravis o la artritis psoriásica⁷¹.

En la actualidad, no está claro si la suplementación con vitamina D a los pacientes deficientes, y en particular con enfermedades inflamatorias crónicas, mejora su salud y reduce la actividad inflamatoria⁷².

c) Vitamina D e infecciones: La vitamina D se ha asociado en los últimos años con el riesgo de padecer ciertas infecciones. Los mecanismos por los cuales la vitamina D

podría estar implicada en la prevención de enfermedades son: produce la activación de la inmunidad inmediata (principalmente macrófagos) y además promueve la síntesis de catelicidina (péptido antimicrobiano que parece ser importante en la lucha frente a las micobacterias, principalmente la tuberculosis).

Existen datos epidemiológicos que señalan una correlación entre la deficiencia de vitamina D y un mayor riesgo de infección. Los suplementos con vitamina D en pacientes con déficit permitió reducir el riesgo de sepsis⁷³. Con respecto a las infecciones respiratorias, se ha encontrado una asociación entre los niveles bajos de vitamina D en jóvenes y un mayor riesgo de infección de las vías altas respiratorias, principalmente en pacientes con antecedentes de asma bronquial o enfermedad pulmonar crónica⁷⁴.

La conclusión es que la vitamina D podría ser de utilidad en el tratamiento de la tuberculosis, la gripe y las infecciones respiratorias de vías altas, aunque no existe evidencia suficiente que permita hacer recomendaciones definitivas⁷⁵.

d) Vitamina D y diabetes mellitus: La plausibilidad biológica de la asociación diabetes y vitamina D, se debe a su acción en la función de las células beta, aumento de la resistencia a la insulina y sistemas de inflamación. La vitamina D puede tener un efecto directo sobre la función de las células beta, mediante la unión al receptor de vitamina D que se expresa en estas células⁷⁶. Además también tiene un efecto paracrino ya que se ha encontrado la presencia de la enzima alfa-1-hidroxilasa en las células beta pancreáticas⁷⁷.

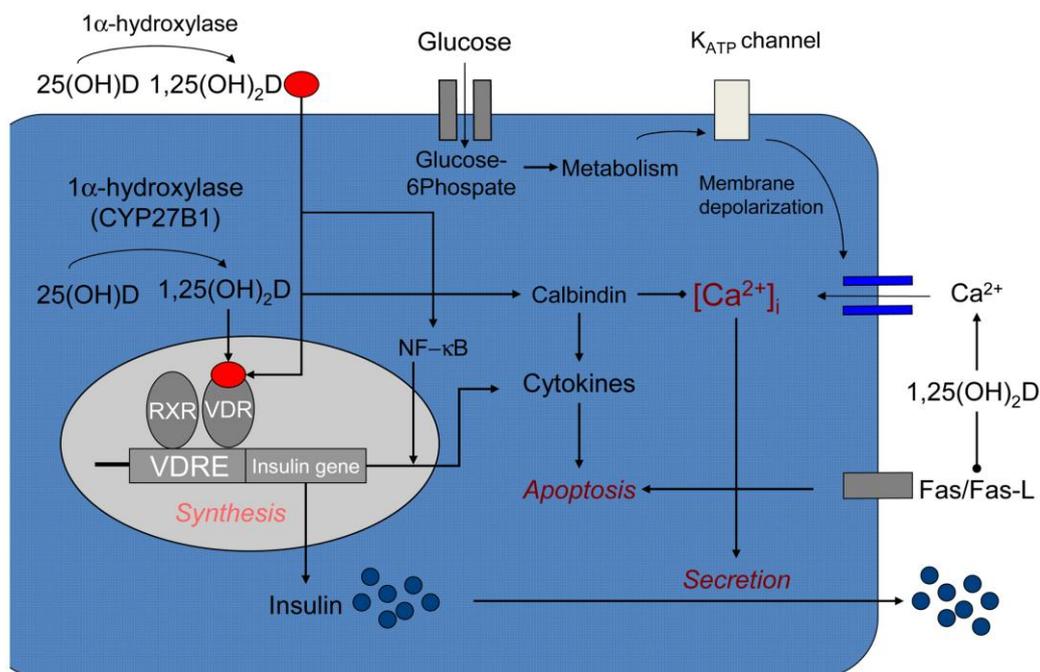


Figura 13. Producción de calcitriol por las células beta y activación del receptor nuclear, para promover la síntesis de insulina (imagen tomada de Mitri J, Pittas AG (2014) *Endocrinol Metab Clin Noth Am. Mar*;43(1):205-32)

Con respecto a la sensibilidad a la insulina, la vitamina D activa a los receptores de insulina que a su vez afectará a la sensibilidad de la insulina en tejidos como el muscular y adiposo⁷⁸. La vitamina D podría directamente y/o indirectamente disminuir los efectos de la inflamación sistémica en pacientes con diabetes tipo 2^{79,80}. Se han observado variaciones estacionales en los picos de incidencia de diabetes mellitus que, entre otras circunstancias, se han asociado a las oscilaciones periódicas en los niveles de vitamina D⁸¹. En un amplio estudio multicéntrico realizado de forma prospectiva durante 4 años en 51 regiones mundiales se comprobó una relación inversa entre la radiación UVB en cada una de aquéllas y la incidencia de diabetes mellitus tipo 1⁸².

En un meta-análisis reciente, se llegó a la conclusión que los niveles séricos de vitamina D eran significativamente menores en niños con diabetes mellitus tipo 1 que en controles sanos⁸³. En otro meta-análisis, los datos indicaron que tanto los pacientes con

diabetes mellitus tipo 1 como los que tenían diabetes mellitus tipo 2 tienen niveles más bajos de 25 (OH)-vitamina D que los controles sanos⁸⁴. En los ensayos clínicos en los cuales se realizaron estudios aleatorizados de doble ciego controlados con placebo en pacientes con diabetes tipo 2 e hipovitaminosis, los suplementos de vitamina D no tuvieron efecto sobre la HbA1c y otros indicadores de control de la glucemia⁸⁵⁻⁸⁷.

Por lo tanto, no se pueden extraer conclusiones firmes con respecto al papel de la vitamina D en la prevención o tratamiento de la diabetes. En numerosas ocasiones, los resultados de los estudios observacionales no fueron confirmados por ensayos clínicos bien diseñados, o los resultados de los ensayos clínicos fueron contradictorios. Por lo tanto, se necesitan más pruebas de ensayos controlados aleatorizados para abordar la cuestión de la causalidad y evaluar el efecto tanto en la prevención como en el tratamiento de la diabetes.

e) Vitamina D en las enfermedades cardiovasculares.

En los últimos años, se ha considerado que la deficiencia de vitamina D un factor de riesgo de eventos cardiovasculares (infarto de miocardio, ictus, insuficiencia cardiaca, enfermedad vascular periférica y estenosis aórtica con calcificación) y mortalidad⁸⁸⁻⁹³. Sin embargo, en la actualidad no está claro si la baja concentración de 25-(OH)-vitamina D es un factor de riesgo causal o simplemente están relacionados con los resultados adversos de una forma inversa y factores de confusión, tales como la obesidad, la movilidad reducida con baja exposición a la luz solar, malnutrición, etc.⁸⁸⁻⁹³. También se ha propuesto el efecto beneficioso de la vitamina D en la reducción de la presión arterial; los estudios observacionales y meta-análisis han demostrado que las bajas concentraciones de 25-(OH)-vitamina D son un marcador de riesgo significativo para la hipertensión arterial^{94,95}. Sus acciones parecen estar relacionadas con la supresión del

sistema renina-angiotensina aldosterona (RAAS); efectos relacionados con la PTH, las acciones nefroprotectoras, o mejoras en la función endotelial / vascular, sugieren propiedades antihipertensivas de vitamina D^{93,96-99}.

En varios ensayos clínicos aleatorizados (ECA) en los cuales se administraba suplementos de vitamina D a pacientes hipertensos, los resultados fueron contradictorios, ya que la mayoría de los estudios los resultados fueron no significativos y sólo algunos muestran que la vitamina D disminuye la presión arterial alta^{85,100-106}. En un ECA de pacientes hipertensos con bajos niveles de 25 (OH)-vitamina D, no hubo un efecto significativo de la suplementación de vitamina D en presión arterial y varios factores de riesgo cardiovasculares, aunque había un aumento significativo de los triglicéridos en plasma en el grupo con déficit de la vitamina D¹⁰⁷.

Los datos de los ensayos disponibles hasta la fecha son incapaces de demostrar una reducción estadísticamente significativa en la mortalidad cardiovascular y riesgo asociado con la vitamina D. A pesar de la evidencia de una relación consistente entre la vitamina D y la presión arterial, aún quedan preguntas en relación con la causalidad de esta relación. Los resultados de la literatura sugieren la posibilidad de una relación causal, pero varios ECA han tratado de abordar estas preguntas, con resultados inconsistentes. Se necesitan grandes ECA para determinar si la administración de suplementos de vitamina o la terapia pueden ser beneficiosos en la prevención o el tratamiento de la hipertensión.

2.8 Niveles de vitamina D.

La falta de estandarización de los métodos de determinación de la 25 (OH)-vitamina D hace que exista una gran variabilidad entre los distintos métodos de medida. Por ello, los clínicos deben entender que la variabilidad intra-métodos existente y la imprecisión analítica de los resultados informados por los laboratorios clínicos hace que sea difícil determinar los puntos de corte diagnósticos. En la actualidad, existe bastante controversia al respecto, y no está claro cuáles son los valores de 25 (OH)-vitamina D idóneos¹⁰⁸.

--El IOM recomienda mantener los niveles de 25 (OH)-vitamina D por encima de 20 ng/mL (50 nmol/L)⁸⁸. Un valor inferior a 20 ng/mL lo considera deficiencia de vitamina D e inferior a 10 ng/mL una insuficiencia severa de vitamina D.

--- La Endocrine Society propone que la deficiencia de vitamina D corresponde a concentraciones inferiores a 20 ng/mL (50 nmol/L) y la insuficiencia a concentraciones de 20 a 30 ng/mL (50-75 nmol/L), por lo que recomienda en la práctica clínica mantener los niveles de 25(OH)-vitamina D por encima de 30 ng/mL (75 nmol/L)¹⁰⁹.

Las principales discrepancias entre la IOM y la Endocrine Society se observan en los puntos finales de salud general. La IOM hace recomendaciones para garantizar la salud del esqueleto y sugiere que falta nivel de evidencia suficiente para hacer recomendaciones de los posibles beneficios no esqueléticos, considerando que los sujetos con valores inferiores a 20 ng/mL no son deficientes ya que el 97% de los sujetos con estos niveles tienen una correcta salud ósea⁹⁰. La Endocrine Society considera que los niveles séricos de 25(OH)-vitamina D superiores a 30 ng/mL proporcionan mayores beneficios para la salud en general comparados con los valores de 20 ng/mL y que la salud del esqueleto no está garantizada con valores inferiores a 30 ng/mL.

En España, se han realizado diferentes estudios que indican que la población española en general presenta déficit de vitamina D. Un estudio realizado en la población española ambulatoria mayor de 64 años sin factores de riesgo conocidos de hipovitaminosis, presentaba una prevalencia de deficiencia de 25 (OH)-vitamina D del 87%¹¹⁰. También existen estudios en población joven, como el realizado en Canarias a estudiantes universitarios, que reflejó que el 61% presentan niveles de insuficiencia o deficiencia¹¹¹. Más recientemente, se ha realizado un estudio para ver la situación de la población pediátrica y se ha encontrado una alta prevalencia de deficiencia de vitamina D sobre todo en primavera¹¹²; los estudios internacionales muestran resultados similares a los obtenidos en España, con una alta prevalencia de deficiencia de vitamina D¹¹³⁻¹²⁰.

Debido al déficit generalizado que presenta la población mundial en vitamina D y las numerosas consecuencias perjudiciales para la salud atribuidas a la insuficiencia de vitamina D, no es de extrañar que se haya defendido la medición de vitamina D en la población general. Sin embargo, no hay pruebas que demuestren los beneficios de la medición generalizada de la vitamina D a nivel de la población; para ello debería demostrarse la rentabilidad y viabilidad de la estrategia de cribado, así como los beneficios para la salud. En ausencia de evidencias claras, actualmente sólo se recomienda la medición de los niveles de 25 (OH)-vitamina D en los grupos de personas de alto riesgo de sufrir deficiencia de vitamina D.

2.9 Requerimientos nutricionales vitamina D.

La determinación de los requerimientos o del aporte recomendado de vitamina D es difícil, debido a que la principal fuente de vitamina D es endógena (síntesis a partir del 7-dehidrocolesterol en la piel). Cuando la radiación solar es suficiente la vitamina D exógena es innecesaria. Un dato a tener en cuenta es que los requerimientos de vitamina D varían en función la ingesta de calcio y fósforo, edad, sexo, grado de exposición al sol, cantidad de pigmentación de la piel, etc. El Comité de Alimentos y Nutrición del IOM de la Academia Nacional de Ciencias Americana instituyó las siguientes ingestas diarias recomendadas de vitamina D.

a) De 0 a 1 año: El IOM recomienda como ingesta adecuada diaria para niños 200-400 UI/día, aunque se ha demostrado que ingestas de 100 UI/día son suficientes para prevenir la aparición de raquitismo en niños que se exponen frecuentemente al sol. En la leche materna hay niveles relativamente bajos de vitamina D, excepto cuando se suplementa la dieta de la madre con grandes dosis de vitamina D, por lo que los niños alimentados al pecho son propensos a desarrollar deficiencia de vitamina D. Dado que las fórmulas infantiles están normalmente suplementadas con vitamina D, los niños alimentados de esta forma suelen recibir cantidades adecuadas de esta vitamina.

b) De 1 a 18 años: La IOM aconseja una ingesta diaria de 200 UI/día para niños que están adecuadamente expuestos a la luz solar, y de 400 UI/día para el resto. Los niños y adolescentes necesitan la vitamina D para el desarrollo óptimo del esqueleto y la mineralización ósea. La mayoría de los niños reciben suficiente radiación solar, lo que ayuda a asegurar niveles adecuados de vitamina D. No obstante, los niños con alta pigmentación cutánea y aquellos que reciben poca luz solar son grupos de riesgo de deficiencia en vitamina D.

c) De 19 a 50 años: La IOM aconseja una ingesta diaria adecuada de 200 UI/día. Se considera que una ingesta de 400 UI/día sería también razonable y no causaría ningún efecto adverso.

d) De 51 a 70 años: La ingesta diaria recomendada para este grupo de edad es de 400 UI/día. Esta ingesta puede ser incrementada hasta 600 UI/día en individuos que no están expuestos a la luz solar.

e) Mayores de 71 años: La ingesta diaria recomendada para este grupo de edad es de 600 UI. La edad disminuye la capacidad de producir vitamina D3 porque disminuye la concentración de su precursor, el 7-deshidrocolesterol; además, se calcula que la capacidad de producir vitamina D3 en la piel de una persona de 65 años es 3-4 veces menor que la capacidad de la piel de un adulto joven saludable. A estos hechos hay que añadir que la edad disminuye la capacidad renal de hidroxilación de la 25(OH) vitamina D3. Los ancianos de países industrializados son, por tanto, un grupo de riesgo de deficiencia de vitamina D.

f) Embarazo y lactancia: Aunque cabría pensar que el embarazo y la lactancia deberían incrementar los requerimientos de vitamina D, no existen datos suficientes en la literatura que avalen esta hipótesis. Por tanto, se considera la ingesta adecuada durante la lactancia y el embarazo de 200 UI/día. No obstante, podría ser razonable incrementar esta cantidad hasta 400 UI/día, que es la cantidad proporcionada en los suplementos dietéticos prenatales.

2.10 Deficiencias y Toxicidad.

a) Déficit de vitamina D.

La principal causa de la deficiencia de vitamina D es la disminución de la producción endógena, debido a que el 90 % de vitamina D se sintetiza de manera endógena gracias a la fotobiogénesis. Cualquier factor que afecte a la recepción de la radiación UVB dificultando su penetración en la piel producirá una disminución de 25(OH)- vitamina D. Los principales factores que intervienen son:

---Uso de protector solar con factor de protección superior a 30, produce una reducción de la síntesis de vitamina D en la piel superior al 95%.

--- La pigmentación de la piel es otro factor muy importante, en personas de piel oscura la melanina absorbe la radiación UVB¹²¹ y requieren un tiempo de exposición solar de 3 a 5 veces superior al de una persona de piel de tono clara para sintetizar la misma cantidad de vitamina.

---El envejecimiento de la piel, ya que la edad disminuye la capacidad cutánea de producir vitamina D, principalmente relacionada con la disponibilidad disminuida de 7-dehidrocolesterol.

---Los daños en la piel como las quemaduras disminuyen la producción de vitamina D.

---La contaminación atmosférica y la nubosidad pueden actuar como filtro solar.

---La alteración del ángulo cenital del sol causado por un cambio en la latitud, la estación del año o la hora del día influyen dramáticamente en la producción en la piel de vitamina D¹²²⁻¹²⁴. Por encima y debajo de latitudes de aproximadamente 33 °, la síntesis de vitamina D en piel es muy baja o ausente durante la mayor parte del invierno, como por ejemplo ocurre en España (excepto en la Islas Canarias).

La segunda causa importante es la baja ingesta de vitamina D ya que hay un número relativamente pequeño de alimentos que contienen altas cantidades de dicha vitamina; entre éstos están los pescados azules (como salmón, caballa, sardinas), la yema de huevo y las setas. Para aumentar la ingesta de vitamina D, existen productos fortificados como los productos lácteos (leche, mantequilla) y zumos, sin embargo las cantidades de vitamina D que contienen pueden ser insuficientes para mantener unos niveles adecuados. Algunos estudios reflejan que los aportes nutricionales son insuficientes¹²⁵.

La tercera causa es la obesidad que se asocia a deficiencia de vitamina D debido a que la grasa corporal secuestra la vitamina D, que es liposoluble. La obesidad no afecta a la capacidad de producir vitamina D por la piel, sino que altera la liberación de la vitamina D3 a la circulación, debido a que se deposita en la grasa¹²⁶.

Otra causa de deficiencia de vitamina D es la malabsorción de grasas. Las causas por las que se puede reducir la absorción incluyen: el uso de quelantes de los ácidos grasos biliares (por ejemplo colestiramina), fibrosis quística, enfermedad celíaca, enfermedad de Whipple, enfermedad de Crohn, etc.²².

Por último, otras causas que pueden conducir a la deficiencia de vitamina D son un grupo de medicamentos (anticonvulsivos, glucocorticoides o el tratamiento para VIH) que aumentan la expresión hepática del enzima citocromo P-450 y aumentan el catabolismo de 25(OH)-vitamina D. La insuficiencia hepática grave también afecta a la 25-hidroxilación de vitamina D2 y D3. En el síndrome nefrótico se pierde en orina la VDBP. En la enfermedad crónica granulomatosa, algunos linfomas y en el hiperparatiroidismo primario, los pacientes tienen aumentado el metabolismo de 25(OH)-vitamina D a 1,25(OH)₂-vitamina D y también están en alto riesgo de deficiencia de vitamina.

CAUSAS DE ALTERACIONES EN LA ACCIÓN DE LA VITAMINA D
<p>Déficit de vitamina D</p> <ul style="list-style-type: none"> Alteraciones en la producción cutánea Ausencia de la vitamina en los alimentos Absorción deficiente
<p>• Pérdida acelerada de la vitamina D</p> <ul style="list-style-type: none"> Aumento del metabolismo (barbitúricos, difenilhidantoína, rifampicina) Alteraciones de la circulación enterohepática
<p>• Alteraciones de la 25-hidroxilación</p> <ul style="list-style-type: none"> Enfermedad hepática Isoniazida
<p>• Alteraciones de la 1α-hidroxilación</p> <ul style="list-style-type: none"> Hipoparatiroidismo Insuficiencia renal Ketoconazol Mutación de 1α-hidroxilasa Osteomalacia oncógena Raquitismo hipofosfatémico ligado a X
<p>• Resistencia de órganos diana</p> <ul style="list-style-type: none"> Mutación del receptor de vitamina D Difenilhidantoína

Tabla IV. Alteraciones de la producción de vitamina D.

Déficits leves y moderados de vitamina D son asintomáticos, mientras que deficiencias prolongadas provocan hipocalcemia e hiperparatiroidismo secundario, alteración de la mineralización esquelética (osteopenia) y miopatía proximal. La hipovitaminosis D se asocia con un aumento en la secreción de PTH, aumento del recambio óseo, osteoporosis, osteomalacia histológica e incremento en la rotura de cadera y otros tipos de fracturas, y su expresión más grave es la osteomalacia.

En los niños, el déficit de vitamina D provoca un retraso del crecimiento en relación con la expansión de la placa de crecimiento que se denomina raquitismo. Como consecuencia de calcificación inadecuada, los huesos de individuos con raquitismo son blandos, y la tensión propia de la carga de peso da lugar a las deformidades características. En adultos, la deficiencia de vitamina D origina osteomalacia, que se caracteriza por acumulación generalizada de matriz ósea submineralizada.

b) Intoxicación por vitamina D.

Concentraciones muy elevadas de 25(OH)-vitamina D pueden conducir a hipercalcemia por interacción directa con el VDR (a pesar de su poca actividad en condiciones fisiológicas) y por desplazamiento del calcitriol de la VDBP, lo que resulta en una mayor biodisponibilidad de la hormona activa. La toxicidad por vitamina D, al contrario que su déficit, provoca un aumento de la concentración sanguínea de calcio incrementado su absorción intestinal y la liberación desde el hueso y el intestino a la sangre. El exceso de calcio tiende a precipitar, especialmente en el riñón, en forma de cálculos. Como se mencionó anteriormente, la luz solar, al contrario que la suplementación dietética, no representa un riesgo de toxicidad por vitamina D ya que la exposición prolongada degrada el precursor de la vitamina D en la piel, previniendo su conversión en forma activa.

2.11 Aumento exponencial de las determinaciones de vitamina D en los últimos años.

En los últimos años, se ha producido un aumento casi exponencial de las peticiones de determinación de los niveles séricos de 25 (OH)-vitamina D; esto hace que sea necesario la adecuación de la demanda de tal determinación, por lo que sólo es razonable la medida de 25(OH)-vitamina D en los grupos de personas de alto riesgo de déficit de vitamina D que recomiendan las guías clínicas internacionales, ya que en la actualidad el cribado poblacional no se admite.

Este aumento es a nivel mundial, en la última década en Estados Unidos los laboratorios clínicos han incrementado la determinación de vitamina D un 80-90% al año¹²⁷, en Francia se produjo un aumento del 250% de determinaciones de vitamina D entre 2007 y 2009; y de un 1000% entre 2005 y 2009¹²⁸. Las estadísticas del gobierno australiano reflejan un aumento de 100 veces entre 2000 y 2010¹²⁹.

2.12 Técnicas de medida.

a) Introducción.

En la actualidad, numerosos estudios han sugerido que la vitamina D no sólo es necesaria para la salud de los huesos, sino que también desempeña un papel en las enfermedades autoinmunes, obesidad, diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. Este aumento en las nuevas implicaciones atribuidas a la vitamina D han dado lugar a un aumento en las solicitudes de pruebas de vitamina D por los médicos en los últimos años^{130,131}. Actualmente, existe un amplio consenso respecto a que la determinación de 25(OH)-vitamina D proporciona la mejor medida del estado de vitamina D y, por tanto, debe ser el ensayo preferible para su evaluación^{132,133}. La concentración sérica de 25 (OH)-vitamina D representa la síntesis de vitamina D endógena en la piel, así como la ingesta alimentaria. La medición de la 1,25 (OH)₂-vitamina D no es un buen indicador del estado de la vitamina D, ya que su vida media es muy corta, aproximadamente 4 h (25 (OH)-vitamina D presenta una vida media de 3-4 semanas); además, sus niveles en sangre están estrechamente regulados por los niveles séricos de la PTH, calcio y fosfato. Por último, decir que la concentración de calcitriol no refleja las reservas de vitamina D, ya que los niveles son elevados frecuentemente en individuos con deficiencia de vitamina D debido a un hiperparatiroidismo secundario. Por todo ello, como se ha mencionado anteriormente, el método más exacto para determinar el estado de vitamina D es la determinación del 25 (OH)-vitamina D.

b) Metabolitos vitamina D.

El metabolito que mejor refleja el estado nutricional de la vitamina D es según consenso internacional el 25 (OH)-vitamina D. En el suero encontramos tanto el ergocalciferol (25 (OH)-vitamina D₂) como el colecalciferol (25(OH)-vitamina D₃). Ambas formas de la vitamina D se someten a hidroxilaciones idénticas para producir 25 (OH)-vitamina D en el hígado y 1,25 (OH)₂-vitamina D en el riñón⁷. Por lo tanto, las directrices actuales para la medición de los niveles séricos de 25 (OH)-vitamina D estipulan que los ensayos deben reconocer los niveles de 25 (OH)-vitamina D₃ y 25 (OH)-vitamina D₂ en cantidades equimolares con el fin de evitar la falta de representación y un diagnóstico erróneo¹³⁴; es decir, las técnicas de determinación de vitamina D deben detectar 25 (OH)-vitamina D Total. Sin embargo, un dato a tener en cuenta es la existencia de otros metabolitos de la vitamina D que pueden interferir en las técnicas de medida. El principal metabolito de la vitamina D que interfiere en las técnicas de medida es el epímero C3 del 25(OH)-vitamina D. Los epímeros presentan la misma estructura química a excepción de la presencia de un carbono asimétrico. La presencia del epímero C3 del 25(OH)-vitamina D se observó por primera vez en los recién nacidos en el año 2001¹³⁵, pero también se ha reportado en adultos^{136,137}. Este epímero C3 puede representar una proporción importante de los niveles circulantes de 25(OH)-vitamina D en niños menores de 1 año (hasta el 60%), aunque también se ha descrito una alta prevalencia en ancianos¹³⁸. La importancia fisiológica de 3-epi-25 (OH)-vitamina D₃ es incierta. Sin embargo, se ha demostrado que la forma epimérica de calcitriol es capaz de suprimir la secreción de PTH en concentraciones similares a los de la forma no epimérica¹³⁹. Además, se han descrito efectos calcémicos y de regulación sobre genes que responden al receptor de vitamina D implicados en el metabolismo óseo (p.ej., osteocalcina). Por tanto, la determinación individualizada de 25(OH)-vitamina D y 3-epi-25(OH)-vitamina D puede

ser biológicamente relevante¹⁴⁰. En la actualidad, aunque el significado biológico del C3 epímero es actualmente incierto, debido a sus altas concentraciones en neonatos y ancianos, se recomienda que se determinen de forma individualizada para no interferir en la concentración final de 25(OH)-vitamina D¹⁴¹.

Otro metabolito de la vitamina D es el 24,25 (OH)₂-vitamina D, que también está presente en el suero e interfiere en algunos inmunoensayos, aunque este metabolito informa del estado nutricional de la vitamina D ya que se han descrito acciones biológicas para él¹⁴².

c) Metodología para la determinación de vitamina D.

Actualmente, hay disponibles diferentes métodos para medir los niveles de 25(OH)-vitamina D. La falta de estandarización en los métodos hace que exista gran variabilidad intermétodo e interlote¹⁴³⁻¹⁴⁵, limitando la comparación entre estudios y el establecimiento de puntos de corte para definir la hipovitaminosis D¹⁴⁶.

De los métodos disponibles en el mercado, los que presentan mayor precisión son la cromatografía líquida de alta eficacia con detección ultravioleta (HPLC-UV) y la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS); aunque estos métodos son más precisos, requieren de una infraestructura, personal cualificado, mayor volumen de muestra y paso de extracción previo, lo que hace que en la mayoría de los laboratorios clínicos la determinación de los niveles de 25(OH)-vitamina D Total se realice mediante inmunoensayos automatizados. Los principales inmunoensayos presentes en el mercado son los de Liaison[®], IDS[®], Elecsys[®], Abbott[®] y Siemens[®]. Estos métodos son mucho más rápidos con un alto

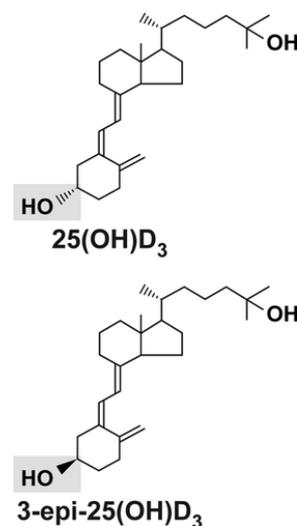


Figura 14. Estructura molecular 25(OH)-vitamina D₃ y C3-epi-25(OH)-vitamina D₃.

rendimiento, pero presentan posible susceptibilidad a efectos de matriz, variabilidad entre lotes, discutida recuperación de la 25 (OH)-vitamina D₂, alta reactividad cruzada con el 24,25-dihidroxitamina D e inadecuada liberación de la VDBP^{134,147}. En los inmunoensayos, la especificidad puede ser una cuestión analítica de relevancia especialmente en relación con la proporción de 25(OH)-vitamina D₂ que se cuantifica, aspecto que no afecta a los métodos HPLC y LC-MS/MS que son capaces de cuantificar ambos metabolitos de forma independiente¹⁴⁸.

MÉTODO	VENTAJAS	INCONVENIENTES
<p>-Inmunoensayos manuales</p> <p>RIA tras extracción con solventes</p> <p>Enzimoinmunoensayo directo (EIA)</p>	<p>Extracción minimiza efecto de matriz</p> <p>Relativamente barato</p> <p>Técnicamente sencillo</p> <p>Relativamente barato</p> <p>Técnicamente sencillo</p>	<p>Más tiempo-trabajo que inmunoensayo directos</p> <p>Genera residuos radioactivos</p> <p>Variabilidad entre lotes</p> <p>Baja recuperación 25(OH)D₂</p> <p>Susceptible a efectos de matriz</p> <p>Variabilidad entre lotes</p> <p>Especificidad (Baja recuperación de 25 (OH) D₂)</p> <p>¿Reactividad para C3-epi-25(OH)D₃?</p>
<p>-Inmunoensayos automatizados</p> <p>Liaison total[®]</p> <p>IDS[®]</p> <p>Elecsys[®]</p> <p>Abbott[®]</p> <p>Siemens[®]</p>	<p>Técnicamente sencillo</p> <p>Alto rendimiento</p>	<p>Susceptible a efectos de matriz</p> <p>Variabilidad entre lotes</p> <p>Especificidad (Baja recuperación de 25(OH)D₂) (56% Abbott[®], 81% Roche[®], 104% Liaison[®]; según inserts)</p> <p>¿Reactividad para C3-epi-25(OH)D₃?</p>

-Métodos de detección directos		
HPLC	Extracción: reduce interferencias. Puede ser (semi) automatizado. Resolución de 25-OH-D3 /D2 y C3-epi-25-OH-D3 Adaptabilidad a método de referencia (NIST) Determinación simultánea de otros componentes (vitamina A,E, Q10, carotenoides) Bajo coste de reactivos	Personal especializado Puede requerir mayor volumen de muestra ¿Más tiempo? / ¿Menor rendimiento?
LC/MS/MS	Alta exactitud y precisión (Gold standard)	Coste de equipos Susceptible de interferencia (supresión iónica)

Tabla V. Principales ventajas e inconvenientes de los métodos de determinación de vitamina D (tabla modificada de Córdoba C y Granado F (2013) Vitamina D: Una perspectiva actual. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC).

Muchos fabricantes de inmunoensayos describen un 100% de reactividad cruzada para 25(OH)-vitamina D3 y 25(OH)-vitamina D2 aunque también puede existir para otros metabolitos, incluido el 1,25(OH)₂-vitamina D. No obstante, debido a las bajas concentraciones de estos metabolitos, es improbable que afecten de forma significativa a las concentraciones de 25(OH)-vitamina D. Por último, los sistemas cromatográficos (HPLC y LC/MS), que utilizan columnas cromatográficas convencionales, no permiten la resolución del C-3-epi-25(OH)-vitamina D (coeluye con la forma no epímera).

d) Programas de control de calidad. Materiales de referencia.

El programa Vitamin D External Quality Assurance Survey (DEQAS) está designado como el mejor control de calidad externo en la evaluación de los niveles de 25 (OH)-vitamina D y cuenta con más de 1.100 participantes de más de 55 países. En él se compara la exactitud de los resultados de diferentes laboratorios calculando el porcentaje de desviación frente a la media promedio de todos los laboratorios (Avaraged Laboratory Trimmed Mean, ALTM)¹⁴⁹, se hacen comparaciones entre diferentes métodos y se realizan estudios sobre las principales interferencias de cada método. El DEQAS utilizaba como valor de referencia la media de todos los laboratorios (ALTM), pero a partir de abril de 2013 utiliza los valores asignados a los controles de calidad externo por el National Institute of Standards and Technology (NIST) de tal manera que los participantes pueden evaluar la exactitud de sus resultados comparándolos con un método de referencia reconocido a nivel internacional.

Además, el Centre for Diseases Control and Prevention (CDC) ha diseñado un programa en 2014-2015 (Vitamin D Standardization-Certification Program, VDSCP) que evalúa el rendimiento del ensayo (sesgo y la imprecisión) del fabricante de laboratorio o ensayo a lo largo de 1 año. Los criterios para superar dicha prueba eran una imprecisión global <10% en el intervalo de 22-275 nmol / L para vitamina D total; a los laboratorios que superaron esta primera prueba se les otorgó un certificado. Dentro de este programa, la mayoría de métodos que superaron la prueba eran LC/MS/MS, y sólo 2 inmunoensayos (ADVIA Centaur Vitamina D Total assay[®] e IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D[®]).

El DEQAS está intentando corregir los errores de imprecisión y sesgos de los principales métodos. Recientemente, ha informado que en muestras con alta concentración de 24,25 (OH)₂-vitamina D la mayoría de los inmunoensayos dan valores

muy superiores a los que asigna el NIST, sólo los inmunoensayos de Siemens ADVIA Centaur® y DiaSorin Liaison® están libres de interferencias por este metabolito, al igual que HPLC/UV y LC-MS/MS tampoco presentan interferencia. También ha reportado la existencia de interferencia de los HPLC/UV y LC-MS/MS con el 3-epi-25-(OH) D3, metabolito que no parece interferir en los inmunoensayos¹⁵⁰.

e) Rendimiento analítico.

Debido al alto rendimiento de la espectrometría de masas de cromatografía líquida en tándem (HPLC-MS / MS), se considera que es el "patrón oro" para la determinación de la vitamina D, pero necesita procedimientos de pretratamiento de muestra como extracción en fase sólida y derivatización¹⁵¹.

Aunque la determinación de la vitamina D se ha incrementado sustancialmente en los últimos años, hay poco consenso sobre cuál es el ensayo que proporciona mayor rendimiento analítico para medir su concentración y hay serias preocupaciones con respecto a la fiabilidad de su medición¹⁵². Las especificaciones que se deben considerar para seleccionar un ensayo para la determinación de la vitamina D, incluyen la determinación de 25 (OH)-vitamina D Total, la precisión, interferencias, reproducibilidad, la comparabilidad entre ensayos, y la rentabilidad¹⁵³. En 2011, la dilución isotópica cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS / MS) fue reconocida como el método de referencia por el Comité para la Trazabilidad en Medicina de Laboratorio¹⁵⁴. Como se mencionó anteriormente, existen diversos inmunoensayos automatizados para la determinación de 25 (OH)-vitamina D (Siemens®, IDS®, Abbott®, Roche®, y DiaSorin®). Todos estos inmunoensayos excepto Roche utilizan un método similar (pretratamiento de la muestra, disociación de 25(OH)-vitamina D de la proteína transportadora y posterior reconocimiento por anticuerpos específicos). Debido a que el

metabolito 25 (OH)-vitamina D es altamente lipofílico y tiene una fuerte afinidad de unión para VDBP, no es fácil medir su concentración en el suero del paciente. Hay una gran dispersión entre los diferentes ensayos, debido a las diferentes técnicas empleadas para la separación de 25 (OH)-vitamina D de la VDBP, así como su detección y medición¹⁵⁰. Aunque LC-MS / MS se considera el método de referencia para la medición de las concentraciones de 25 (OH)-vitamina D, el instrumento es muy costoso, no disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos, y su tiempo de respuesta es relativamente más largo que el de los inmunoensayos. Por lo tanto, los inmunoensayos automatizados y de alto rendimiento pueden ser una buena alternativa para los laboratorios clínicos.

En colaboración con los Institutos Nacionales de la Oficina de Suplementos Dietéticos de la Salud, el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología ha desarrollado materiales de referencia estándar (SRM) con el fin de mejorar la precisión y para permitir la normalización mundial de la determinación de 25 (OH)-vitamina D. El SRM 2972 contiene cantidades de 25 (OH)-vitamina D2 y de 25 (OH)-vitamina D3 disueltas en etanol definido. Este material se utiliza para la calibración directa de los procedimientos de medición de referencia LC-MS / MS. Aunque este material se puede utilizar con métodos cromatográficos como calibradores, la reacción antígeno-anticuerpo impide calibración directa de métodos inmunológicos mediante el uso de esta solución de calibración. Por lo tanto, se necesitan materiales a base de suero para la calibración de métodos inmunológicos. El NIST desarrolló material de referencia basado en suero, SRM 972, que consta de cuatro mezclas de suero humano con valores de analito de 25 (OH)-vitamina D2, 25 (OH)-vitamina D3, y 3-epi-25 (OH)-vitamina D3. A pesar de estos esfuerzos de normalización, las discrepancias no resueltas y prejuicios inaceptables persisten entre los inmunoensayos en comparación con los métodos de referencia. Por lo

tanto, más estudios de normalización de mediciones de 25 (OH)-vitamina D deben llevarse a cabo para obtener resultados fiables y definir correctamente el nivel de vitamina D en los pacientes¹³⁴.

f) Conclusiones metodología.

En general, existe poco consenso respecto al método que debería utilizarse para medir 25(OH)-vitamina D así como sobre la fiabilidad de las medidas. La variabilidad analítica ha mejorado notablemente en los últimos años, principalmente en los inmunoensayos que eran los que mayor variabilidad presentaban, que hoy en día presentan resultados aceptables¹⁵⁵, aunque todavía lejos de los métodos cromatográficos. Dado el amplio rango de ensayos disponibles, la elección del mejor método constituye un desafío especialmente debido al espectacular aumento de la demanda durante los últimos años, tanto a nivel de práctica clínica como con fines de investigación. La elección de un método adecuado dependerá de varios factores incluyendo el número de muestras a procesar, la experiencia del personal y el origen de las muestras.

OBJETIVOS

La utilidad del estudio se basa en analizar las distribuciones plasmáticas de la vitamina D e intentar adecuar su demanda; ya que en los últimos años se ha producido un aumento exponencial debido a las nuevas implicaciones atribuidas a la vitamina D, sin que existan resultados concluyentes en la bibliografía actual, produciéndose un gasto sanitario extra. Además, la metodología para determinar la 25 (OH)-vitamina D disponible en la actualidad (inmunoensayos automatizados, HPLC, Tandem masas, etc.) presentan baja precisión y reproducibilidad¹⁵⁶, por lo que, son necesarios más estudios para mejorar las técnicas de medida y poder cuantificar con gran precisión el status de la vitamina D en el organismo.

Los objetivos a tratar en la presente tesis doctoral son los siguientes:

1. Analizar la distribución de las determinaciones plasmáticas de vitamina D por patología y por servicios peticionarios.
2. Adecuar las peticiones de vitamina D en el Área de Salud de Badajoz a las guías clínicas que hacen recomendaciones al respecto.
3. Realizar un estudio económico de cuál sería la rentabilidad de la implantación de un protocolo de adecuación de la vitamina D siguiendo las recomendaciones actuales para su determinación.
4. Hacer un estudio comparativo entre el inmunoensayo utilizado de rutina en el laboratorio de Análisis Clínicos del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz (IDS-iSYS[®]) y otro inmunoensayo (Advia Centaur XP[®]), para determinar cuál de los dos es el más idóneo para nuestro laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estudio de las distribuciones plasmáticas de vitamina D y su adecuación.

En primer lugar, se realizó un estudio descriptivo transversal de las peticiones de vitamina D realizadas en el Área de Salud de Badajoz durante doce meses consecutivos (desde enero de 2013 hasta diciembre de 2013); para ello se utilizó el programa informático de laboratorio SIGLO[®], con el fin de seleccionar todas las peticiones realizadas durante este periodo de tiempo, y el programa asistencial JARA[®], para revisar el diagnóstico y la historia clínica. Durante este periodo de tiempo se realizaron un total de 3907 peticiones para determinar los niveles séricos de 25 (OH)-vitamina D. Cada petición se estudió detalladamente, viendo el diagnóstico de la petición de vitamina D y revisando la historia clínica del paciente, para así poder evaluar si la petición de vitamina D fue correctamente realizada. Para discriminar entre petición de vitamina D justificada e injustificada creamos un protocolo de petición a partir de los criterios de petición de las guías clínicas en las cuales se describen las patologías o situaciones clínicas en las que sería necesario medir los niveles de vitamina D séricos y la bibliografía más reciente sobre el tema. Las guías que utilizamos para crear dicho protocolo fueron la guía clínica de la Sociedad Americana de Endocrinología¹⁰⁹, la guía de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica¹⁵⁷, y el Consenso de la Alta Autoridad Sanitaria Francesa sobre la petición de vitamina D¹²⁸.

a) GUIA SOCIEDAD ENDOCRINA AMERICANA

- Raquitismo
- Osteomalacia
- Osteoporosis
- Insuficiencia renal crónica/ trasplante renal
- Hiperparatiroidismo
- Insuficiencia hepatocelular
- Síndrome de malabsorción

- Ciertos fármacos (glucocorticoides, antiepilépticos, antiretrovirales)
- Ancianos con antecedentes de caídas o fracturas
- Niños y adultos obesos ($IMC > 30 \text{ kg / m}^2$)
- Embarazado y lactancia
- Ciertos linfomas
- Enfermedades granulomatosas

b) SOCIEDAD ESPAÑOLA DE BIOQUIMICA CLINICA (SEQC)

- Pacientes con raquitismo
- Pacientes con osteoporosis u osteomalacia.
- Pacientes con caídas frecuentes
- Síndrome de malabsorción
- Tras cirugía bariátrica
- Pacientes con IRC en estadios 3-5 y pacientes trasplantados renales
- Pacientes con hiperparatiroidismo primario
- Trastornos granulomatosos (tuberculosis y sarcoidosis)
- Pacientes con insuficiencia hepática

c) CONSENSO DE LAS ALTAS AUTORIDADES SANITARIAS FRANCESAS

- Raquitismo
- Osteomalacia/Osteoporosis
- Ciertos fármacos (glucocorticoides, antiepilépticos, antiretrovirales)
- Caídas repetidas
- Trasplante renal e IRC
- Tras cirugía para la obesidad

Como se ha mencionado anteriormente, siguiendo las recomendaciones realizadas para la correcta utilización de la determinación de la 25 (OH)-vitamina D por las 3 guías clínicas y además haciendo una revisión exhaustiva de la bibliografía reciente, elaboramos un protocolo de petición con las patologías y situaciones clínicas en las cuales sería necesario determinar los niveles séricos de 25(OH)-vitamina D y de esta manera cualquier petición que no se ajustase al protocolo creado sería innecesaria y no reportaría beneficios para el paciente.

PROTOCOLO PETICIÓN VITAMINA D
• Raquitismo
• Osteomalacia
• Osteoporosis
• Caídas repetidas
• Insuficiencia renal crónica, estadios terminales 3-5
• TX renal
• Hiperparatiroidismo
• Insuficiencia hepatocelular
• Síndrome malabsorción (Celiaquía/Crohn/Pancreatitis/Fibrosis Quística)
• Cirugía Bariátrica
• Ciertos fármacos (glucocorticoides, antiepilépticos, antiretrovirales, algunos antifúngicos, colestiramina)
• Ciertos linfomas
• Enfermedades granulomatosas (sarcoidosis, tuberculosis, histoplasmosis, coccidiomicosis, beriliosis)

Tras la elaboración del protocolo de petición, después de revisar las indicaciones de las guías clínicas y la bibliografía, se revisaron las 3907 peticiones de 25 (OH)-vitamina D que se realizaron durante el año 2013. En primer lugar, las dividimos en peticiones justificadas y peticiones no justificadas si no se atendían a ningún criterio de petición del protocolo. Después analizamos más detenidamente las peticiones no justificadas y las organizamos por patología del paciente por un lado y por servicio peticionario por otro, así veíamos las patologías más frecuentes en las que se pedía determinación de vitamina D innecesaria y cuáles eran los servicios que más lo hacían.

Además, realizamos un estudio para ver cómo se había incrementado el número de determinaciones de vitamina D en los últimos 6 años (2009-2014) en nuestra Área de Salud.

A continuación, estudiamos el impacto económico que tuvo en nuestra zona (Área de Salud de Badajoz) las peticiones de vitamina D no justificadas, para ello utilizamos el coste directo de la determinación aislada de vitamina D para calcular el coste total en nuestra región en dicho año. El coste directo de la determinación de vitamina D en el equipo IDS-iSYS® es de 6,1 euros; al cual habría que añadirle los costes indirectos correspondientes a calibraciones, controles, repeticiones, costes de personal, etc. Como los costes indirectos son casi imposibles de calcular con exactitud (sólo se podría hacer una estimación), todos los cálculos sobre el impacto económico los hemos realizado con el coste directo de la determinación.

Por ultimo último realizamos una extrapolación de nuestros resultados al resto de Áreas de Salud del Servicio Extremeño de Salud (SES) para calcular el gasto en peticiones de vitaminas D no justificadas según el protocolo de petición en toda Extremadura. Para ello con los datos del número de peticiones de vitamina D que correspondían a las otras Áreas de Salud en función de la población atendida, se comparó con el número de peticiones reales de cada Área y se realizó un cálculo aproximado del gasto real de todo el SES en el año 2013.

2. Estudio comparativo de dos inmunoensayos en la determinación de vitamina D.

El segundo punto del estudio fue realizar un estudio comparativo entre los 2 inmunoensayos que han pasado la primera fase del proceso de estandarización de la vitamina D, ADVIA Centaur Vitamina D Total assay[®] (Advia Centaur) y IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D[®] (IDS-iSYS), para ver si existe correlación entre los 2 métodos y ver si son intercambiables o si, por el contrario, todavía queda mucho que hacer en el proceso de estandarización y sigue existiendo gran variabilidad entre métodos.

Para ello, se seleccionaron un total de 70 muestras (N=70) de suero de pacientes del Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz. Se realizó una selección de muestras ya analizadas por el inmunoensayo de rutina (IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D[®]) para tener resultados de concentraciones de 25 (OH)-vitamina D distribuidas por todo el rango de linealidad del método y así poder comparar las desviaciones entre métodos en diferentes puntos, de tal manera que seleccionamos al azar 30 muestras con concentraciones de 25(OH)-vitamina D menores de 20 ng/mL y 40 muestras con concentraciones >20 ng/mL. Los sueros se reanalizaron utilizando el equipo Advia Centaur XP[®] (Siemens).

El ensayo de IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D[®] es el inmunoensayo utilizado en nuestro laboratorio de rutina. Es un inmunoensayo con detección por quimioluminiscencia (CLIA), que utiliza 10 microlitros de muestra a las que somete a una fase de pretratamiento para desnaturalizar la fuerte unión de VDBP. Este ensayo que está validado para muestras de suero presenta un rango de medida que va desde 7-125 ng/mL, cualquier valor por debajo de 7 se debe informar como <7 y los valores mayores

de 125 ng/mL deben diluirse manualmente con una muestra de suero humano de baja concentración de vitamina D. Presenta una especificidad del 102% para 25-hidroxivitamina D, con una reacción cruzada del 1%



Figura 15. Autoanalizador IDS-iSYS.

para el 3-epi-25 (OH)-vitamina D. Según el insert también presentaba una detección equimolar de la 25 (OH)-vitamina D2.

El inmunoensayo con el que lo hemos comprobado es el ensayo ADVIA Centaur Vitamina D Total®. Es un inmunoensayo competitivo con detección por quimioluminiscencia, que utiliza 20 microlitros de muestra. El rango analítico va desde 4-



Figura 16. Autoanalizador ADVIA Centaur.

150 ng/mL. Los valores de vitamina D superiores a 150 ng/mL deben ser diluidos con el diluyente que incorpora el kit. Este inmunoensayo es válido tanto para muestras de suero como para muestras de plasma (EDTA, heparina de litio y heparina de

sodio). Presenta una especificidad del 104% para 25 (OH) vitamina D total, y una reacción cruzada del 1,1% para el 3-epi-25 (OH)-vitamina D.

La especificidad analítica de los 2 inmunoensayos reflejada como el porcentaje de reactividad cruzada y la interferencia con otros metabolitos de la vitamina D, que no son el 25 (OH) Vitamina D total se expresan en la Tabla VI.

REACCIÓN CRUZADA (%)	IDS-ISYS	ADVIA CENTAUR
25 (OH) Vitamina D3	102%	100,7%
25 (OH) Vitamina D2	100%	104,5%
24,25 (OH) ₂ Vitamina D3	100%	-
24,25 (OH) ₂ Vitamina D2	-	-
1,25 (OH) ₂ Vitamina D3	-	1%
1,25 (OH) ₂ Vitamina D2	-	4%
Colecalciferol	0%	0,3%
Ergocalciferol	1%	0,5%
3-epi-25 (OH)-vitamina D	1%	1,1%

Tabla VI. Porcentaje de reactividad cruzada de cada inmunoensayo (Advia Centaur[®] e IDS-iSYS[®]) con cada uno de los metabolitos de la vitamina D.

En un primer análisis estadístico, utilizamos todas las muestras (N=70) para la comparación de los dos inmunoensayos y después se analizaron por separado las muestras con concentración de 25 (OH)-vitamina D <20 ng/mL (n=30) y las muestras con concentraciones >20 ng/mL (n=40).

Dependiendo de los niveles de vitamina D, se distinguen 4 categorías: deficiencia de vitamina D (<20 ng/mL), insuficiencia de vitamina D (20-30 ng/mL), suficiencia de vitamina D (30- 150 ng/mL) y toxicidad (>150 ng/mL). En nuestro estudio, también observamos cuántos pacientes se encuadraban en cada categoría utilizando uno u otro inmunoensayo.

Además, se estudió la precisión de los 2 métodos; para ello se seleccionaron al azar 50 muestras y se analizaron por triplicado por los 2 equipos. Los resultados se expresaron con la desviación estándar (SD) y el coeficiente de variación (CV).

3. Análisis estadístico

Destacar que para el análisis de los resultados se utilizó:

---Estadística descriptiva: como parámetro estadístico de medidas de centralización hemos utilizado la media y como estadístico de medidas de dispersión la desviación estándar, calculando a partir de este el coeficiente de variación.

---Estadística inferencial: se ha demostrado que los métodos de correlación y regresión habituales para evaluar la concordancia entre medidas cuantitativas son insuficientes y que la interpretación del coeficiente de correlación de Pearson como una medida de concordancia es errónea^{158,159}. La igualdad de medias tan sólo garantiza que los 2 métodos se centran en el mismo valor, pero en ningún caso que todos sus valores sean iguales. Hay paquetes estadísticos (MedCalc[®]) que incorporan directamente un procedimiento de comparación de métodos en el que el cálculo de la mayoría de coeficientes, modelos de regresión y métodos gráficos están implementados, sin que sea necesaria la manipulación algebraica de las variables originales para llevarlos a cabo (SPSS[®] sólo tiene implementado el procedimiento para el cálculo del coeficiente de correlación intraclase).

En nuestro estudio, para realizar la comparación de métodos utilizamos el programa estadístico MedCalc[®] versión 16.8.4. Este programa permite realizar el análisis de Bland-Altman, regresión de Deming y regresión Passing-Bablok. Nosotros hemos utilizamos el análisis de Bland-Altman y el método de regresión Passing-Bablok realizando la comparación de los dos métodos, utilizando como método de referencia el que utilizamos de rutina en el laboratorio (IDS-iSYS[®]), y calculamos la pendiente, la intersección en el origen y el coeficiente de correlación de Spearman, todo con un intervalo de confianza del 95% (IC =95%).

RESULTADOS

1. Distribución de las determinaciones plasmáticas de 25 (OH)-vitamina D.

1.1 Adecuación de las peticiones de vitamina D según el protocolo.

En el año 2013, se realizaron un total de 3907 determinaciones de 25 (OH)-vitamina D en el Área de Salud de Badajoz. Si seguimos las recomendaciones del protocolo de petición creado a partir de las guías clínicas mencionadas anteriormente y de la bibliografía actual, sólo el 68 % (2638 peticiones) eran justificadas según la historia y el diagnóstico del paciente y el 32 % (1271 peticiones) no se adecuaban a las guías clínicas, por lo que se trataba de peticiones no justificadas.

DISTRIBUCIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE VITAMINA D SEGÚN EL DIAGNÓSTICO-HISTORIA CLÍNICA

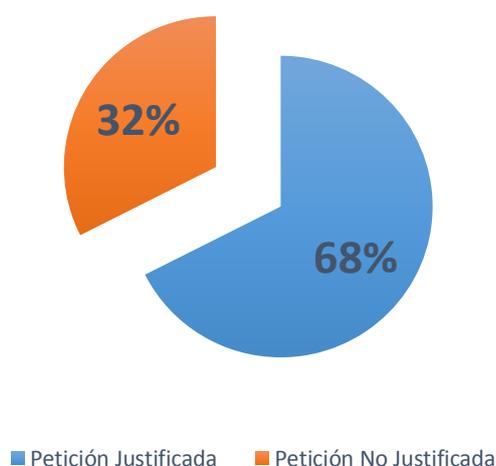


Figura 17. Distribución de las determinaciones de vitamina D según el diagnóstico y la historia clínica.

1.2 Distribución de las peticiones justificadas según el diagnóstico.

En la Tabla VII, se expresa el número de peticiones de los principales diagnósticos de las peticiones justificadas, así podemos comprobar que la insuficiencia renal (60,5%) es la patología más frecuente por la que se solicita una determinación de niveles plasmáticos de 25 (OH)-vitamina D, seguida de osteoporosis-osteopenia (18%).

DIAGNÓSTICO	Nº PETICIONES	% TOTAL
Insuficiencia Renal Crónica	1596	60,5
Osteoporosis-Osteopenia	502	18
Fractura de cadera	198	7,5
Trasplante renal	31	1,2
Otros (síndromes de malabsorción, Crohn, pancreatitis, etc)	309	12,8

Tabla VII. Distribución de las 2636 peticiones justificadas según el diagnóstico.

1.3 Distribución de las peticiones no justificadas según el diagnóstico.

En la Tabla VIII, se expresa el número de peticiones de las principales patologías en las que se pide determinación de vitamina D que no están justificadas, siendo la más frecuente la hipertensión con un 21,71 %, seguida de la diabetes con 10,38 % y de las dislipemias con un 9,04 %.

DIAGNÓSTICO	Nº PETICIONES	% TOTAL
Hipertensión arterial	276	21,71
Diabetes	132	10,38
Dislipemia	115	9,04
Enfermedades reumatológicas	75	5,90
Hipo e hipertiroidismo	68	5,35
Anemia	60	4,72
Cáncer	16	1,25

Otros (alergias, controles rutinarios, problemas neurológicos, etc.)	529	41,62
--	-----	-------

Tabla VIII. Distribución de las 1271 peticiones no justificadas según el diagnóstico.

1.4 Distribución de las peticiones no justificadas según el servicio peticionario.

En la Tabla IX, se puede observar cuáles son los servicios que más realizan peticiones no justificadas, y resalta la atención primaria (centros de salud) con más del 50% de las peticiones no justificadas.

SERVICIO PETICIONARIO	Nº PETICIONES	% TOTAL
Centro de Salud	637	50,11
Nefrología Pediátrica	108	8,49
Nefrología	64	5,03
Neurología	64	5,03
Medicina Interna	90	7,08
Otorrinolaringología	34	2,67
Reumatología	44	3,46
Endocrinología	46	3,61
Otros	184	14,47

Tabla IX. Distribución de las 1271 peticiones no justificadas según el servicio peticionario.

2. Evolución de las peticiones de Vitamina D en los últimos años.

Cuando realizamos este estudio para investigar si había variación en el número de determinaciones de vitamina D en los últimos años, como sucedía a nivel nacional e internacional, descubrimos

los siguientes resultados: en la Figura 18 podemos ver el aumento que se ha producido de peticiones de vitamina D en los últimos años en el Área de Salud de Badajoz y en la Tabla X se observan los números absolutos del

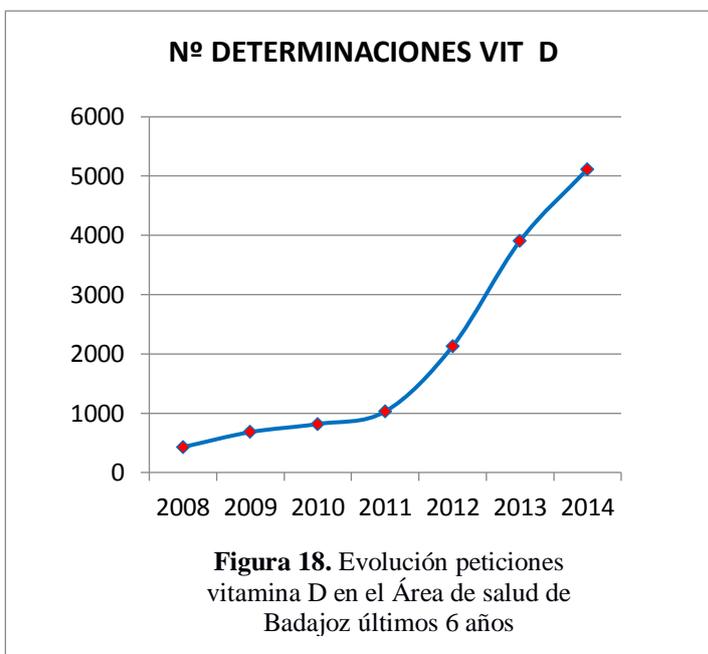


Figura 18. Evolución peticiones vitamina D en el Área de salud de Badajoz últimos 6 años

número de peticiones por año, reflejando un aumento de más del 1000% en 6 años.

AÑO	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Nº DETERMINACIONES VITAMINA D	428	681	818	1029	2131	3907	5117
% AUMENTO CON RESPECTO AL AÑO 2008	0%	59,1%	91,1%	140,4%	397,8%	812,8%	1095,5%

Tabla X. Evolución de las peticiones en el Área de Salud de Badajoz durante los últimos 6 años.

3. Estudio de la repercusión económica de la implantación del protocolo en el Área de Salud de Badajoz y extrapolación de los resultados al resto del SES.

Los resultados sobre la repercusión económica que tiene este estudio de adecuación de la demanda de vitamina D en el Área de Salud de Badajoz se pone de manifiesto de manera clara, ya que cada prueba de vitamina D tiene un precio por determinación de 6,1 euros (costes directos), sin contar costes indirectos. Por lo que, si tenemos 1271 peticiones cuya determinación no sería adecuada, estaríamos ante un exceso de gasto sanitario de 7753,1 euros. Además, conociendo la población de cada Área de Salud de Extremadura y el número de determinaciones realizadas en cada Área de Salud, podemos hacer una extrapolación de nuestros resultados y calculamos el exceso de gasto en determinaciones de vitamina D que se produjo en 2013 en Extremadura. En el Área de Salud de Badajoz, se realizaron un total de 14,33 peticiones /1000 habitantes, de las cuales, si nos guiamos por las guías clínicas, sólo estarían justificadas 9,68 peticiones/1000 habitantes, una vez descontadas las peticiones no justificadas.



Figura 19. Peticiones realizadas en cara Área de Salud por cada 1000 habitantes.

Como la patología es similar en toda Extremadura o incluso mayor en el Área de Salud de Badajoz (mayor número de especialidades médicas), se extrapola utilizando 9,68

peticiones correctas/1000 habitantes al resto de Áreas de Salud de Extremadura y se calcula el exceso de gasto, que ascendió a un total de 120.377 euros al año. Los resultados reflejaron cómo las áreas de Salud de Cáceres, Plasencia y Coria, presentaban un elevado número de peticiones por cada 1000 habitantes.

Área de Salud	Nº Peticiones	Nº Habitantes	Nº Peticiones/1000	Nº Peticiones no justificadas	Gasto no justificado(euros)
Badajoz	3907	272477	14,33	1271	7753,1
Mérida	3047	167190	18,22	1427	8704,7
Don Benito-Villanueva	1858	142464	13,04	478	2915,8
Llerena-Zafra	2438	106646	22,86	1405	8570,5
Cáceres	10982	198717	55,26	9057	55247,7
Coria	1535	47250	32,48	1077	6569,7
Plasencia	5998	112960	53,10	4904	29914,4
Navalmoral de la Mata	646	54706	11,80	115	701,5

Tabla XI. Exceso de gasto al no seguir el protocolo de petición de vitamina D en todas las Áreas del SES.

4. Comparación de dos inmunoensayos para la determinación de vitamina D.

4.1 Comparación de los resultados de los dos inmunoensayos utilizando todo el rango analítico.

Los resultados obtenidos al analizar las 70 muestras por cada uno de los inmunoensayos se muestran en la Tabla XII.

Nº MUESTRA	IDS-ISYS® (ng/ml)	ADVIA CENTAUR® (ng/ml)	Nº MUESTRA	IDS-ISYS® (ng/ml)	ADVIA CENTAUR® (ng/ml)
1	23	24	36	10,7	22,57
2	20,5	27,88	37	20,7	17,9
3	17,2	8,02	38	25,6	32,28
4	20,9	19,99	39	8,7	5,94
5	17,1	13,88	40	10	12,35
6	20,3	25,26	41	7	7,01
7	20,4	22,25	42	10,7	17,47
8	16,8	18,54	43	43,2	34,71
9	15,1	17,6	44	34,8	28,5
10	7,5	9,88	45	41,1	33,03
11	23,8	20,46	46	44,9	24,04
12	15	18,2	47	18,4	18,89
13	26,8	30,33	48	39	37,48
14	9,5	6,38	49	40,4	36,35
15	32,8	38,99	50	29,9	26,6
16	35,1	36,51	51	26,5	25,14
17	32,7	32,89	52	32,3	27,55
18	33,3	26,98	53	34,8	32,11
19	25	21,3	54	19,2	27,55
20	20,9	30,95	55	49,6	56,85
21	30,7	29,56	56	43,3	45,54
22	12,8	16,01	57	22	21,26
23	10,2	10,75	58	21,4	23,25
24	23,2	20,86	59	19,7	17,62
25	12,9	13,91	60	17	16,67
26	9,6	16,78	61	17,3	23,43

27	7	6,47	62	20,6	21,26
28	15,5	20,61	63	18,5	11,76
29	26	29,7	64	9,4	10,34
30	20,1	11,8	65	33,3	17,25
31	14,3	16,55	66	34,7	39,47
32	9,1	13,88	67	59,6	91,16
33	27,3	29,8	68	17,4	25,47
34	24,3	30,08	69	7	12,72
35	20,2	18,64	70	31,6	37,53

Tabla XII. Resultado de cada muestra al ser analizadas por cada inmunoensayo.

Cuando realizamos el estudio comparativo entre los dos métodos, utilizamos como método de referencia IDS-iSYS[®], siendo éste el método que utilizamos de rutina en nuestro laboratorio de Análisis Clínicos y empleamos como método comparativo Advia Centaur[®]. Calculamos la media, desviación estándar y los resultados mínimos y máximos para cada uno de los inmunoensayos.

	Muestras	Media (ng/mL)	Desv est (ng/mL)	Mínimo	Máximo
IDS-iSYS[®]	N=70	23,1	11,37	7	59,6
Advia Centaur[®]	N=70	23,92	12,88	5,94	91,16

Tabla XIII. Media, desviación típica, máximo y mínimo del total de las muestras al ser analizadas con cada inmunoensayo (Advia Centaur[®] e IDS-iSYS[®]).

Al realizar la regresión lineal de Passink-Bablok con todas las muestras (N=70), obtuvimos un punto de corte en el origen de 1,15 (IC 95%: -1,44 a 3,93), una pendiente de la recta de 0,98 (IC 95%: 0,84 a 1,14) y una recta de regresión calculada de $y = 1,15 + 0,98x$, como se puede observar en la Figura 20. El coeficiente de correlación de Spearman entre los dos métodos analizados fue de 0,86 (IC 95%: 0,78 a 0,91) con un nivel de significación $P < 0,0001$.

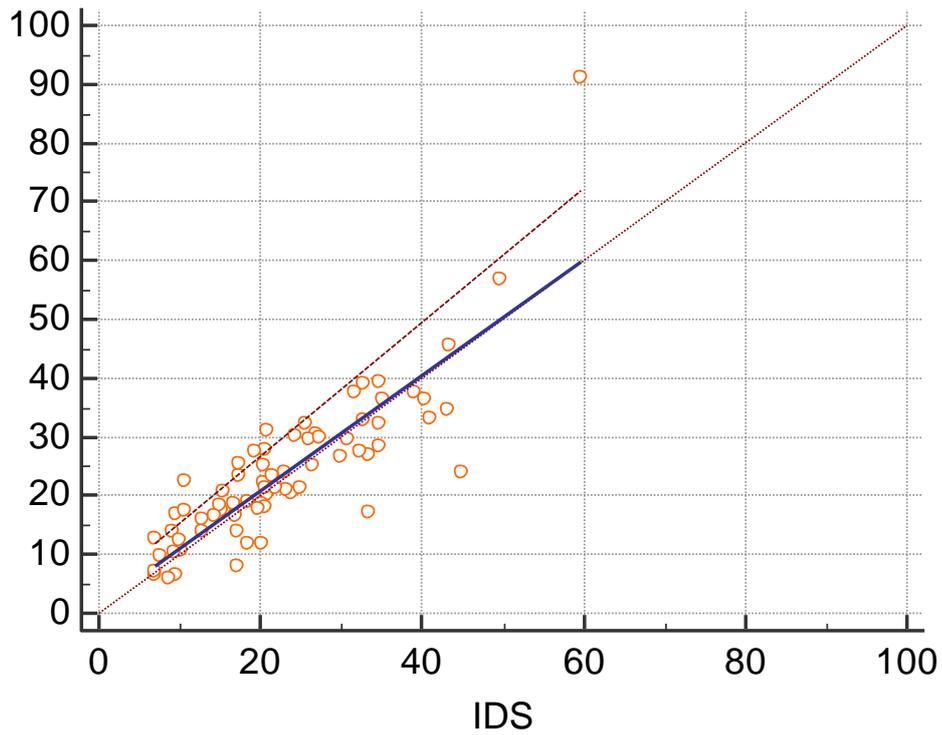


Figura 20. Regresión lineal de Passing-Bablok al analizar todo el tamaño muestra (N=70).

También se realizó el análisis de Bland-Altman, el cual nos indica la dispersión respecto a la media de los resultados obtenidos, y la diferencia entre los dos métodos, Figura 21.

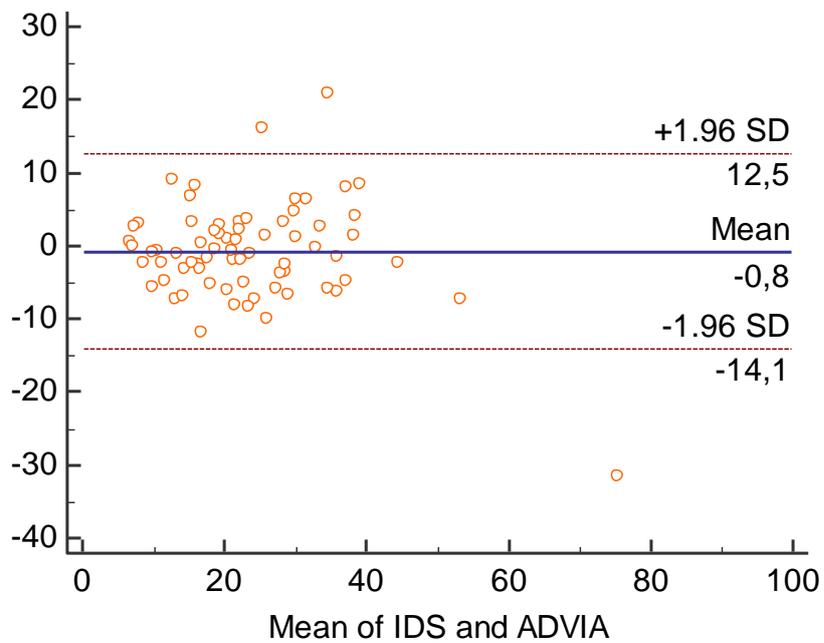


Figura 21. Análisis de Bland-Altman el cual nos indica la dispersión de cada método con respecto a la media.

4.2 Comparación de los resultados de los dos inmunoensayos por rangos clínicos.

Cuando se analizaron las muestras menores de 20 ng/mL (deficiencia de vitamina D) por un lado y las mayores de 20 ng/mL por otro, los resultados nos indican que no existe correlación entre la medición de la concentración de 25 (OH) vitamina D entre los diferentes métodos en el rango de deficiencia (<20 ng/mL), coeficiente de correlación de Spearman = 0,57. Sin embargo, al analizar los resultados mayores de 20 ng/mL encontramos una correlación baja, con un r de Spearman de 0,69. En la Tabla XIV se expresan los resultados obtenidos; en la Figura 22 la regresión de Passink-Bablok al analizar las muestras con resultado menor de 20 ng/mL y, en la Figura 23, cuando se utilizaron las muestras con resultados mayores de 20 ng/mL.

	<20 ng/mL (n=30)			>20 ng/mL (n=40)		
	\bar{x}	SD	r	\bar{x}	SD	r
IDS-iSYS®	13,35	4,32	0,57	30,41	9,31	0,69
Advia Centaur®	14,97	5,68		30,74	12,69	

Tabla XIV. Análisis de la media, desviación típica y coeficiente de correlación de Spearman por los dos inmunoensayos para las muestras <20 ng/mL y >20 ng/mL.

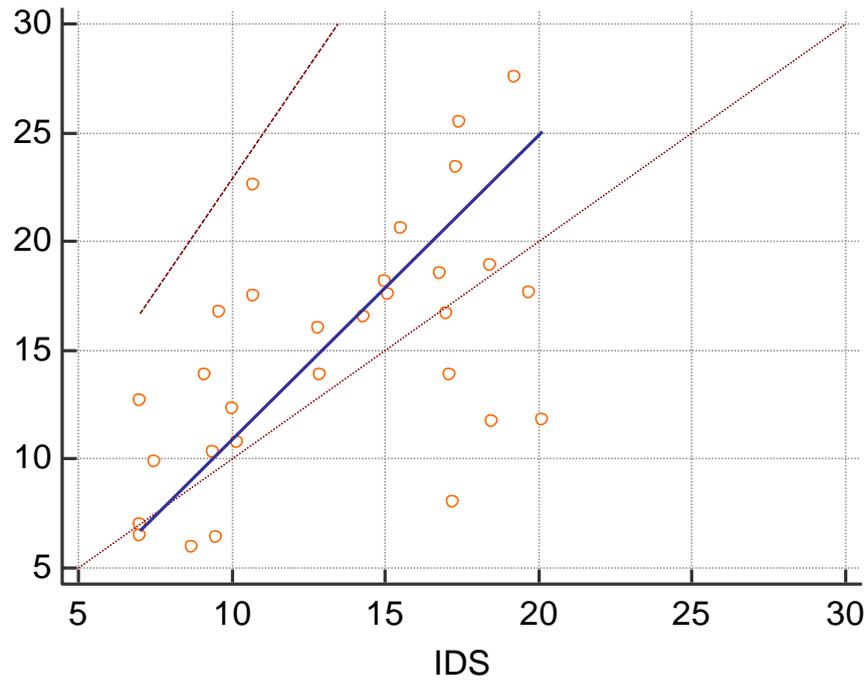


Figura 22. Regresión lineal de Passing- Bablok al analizar las muestras <20 ng/mL. Punto de corte -3,06 (IC 95%: -11,97 a 2,29); pendiente de la recta 1,40 (IC 95%: 0,98 a 2,06) coeficiente correlación Spearman 0,57 (IC 95%: 0,27 a 0,77) con un nivel de significación $p=0,001$.

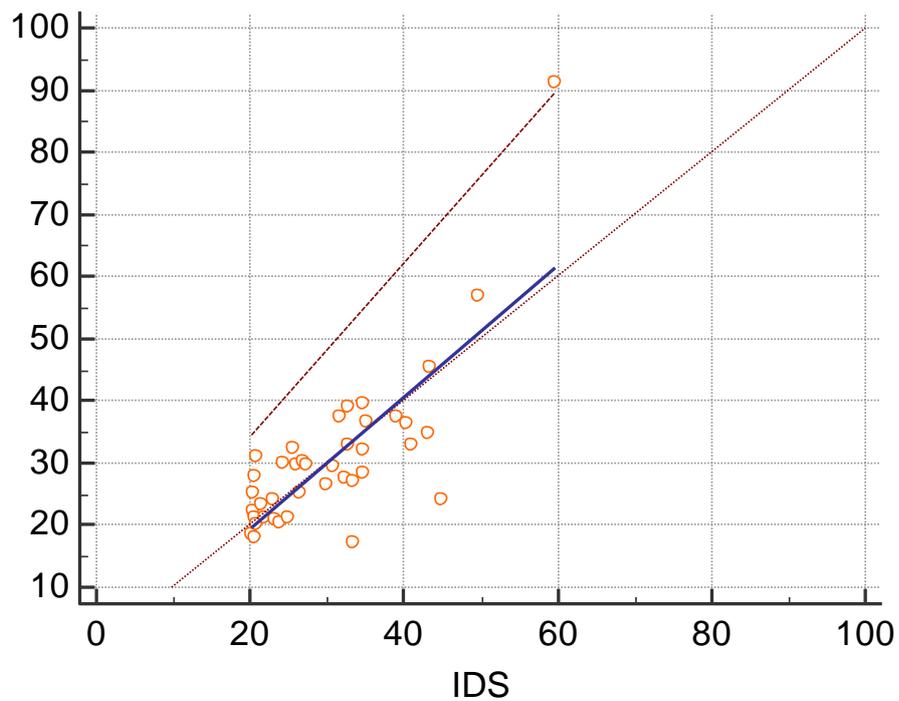


Figura 23. Regresión lineal de Passing-Bablok al analizar las muestras >20 ng/mL. Punto de corte -1,92 (IC 95%: -11,31 a 6,32); pendiente de la recta 1,06 (IC 95%: 0,76 a 1,40) coeficiente correlación Spearman 0,69 (IC 95%: 0,48 a 0,82) con un nivel de significación $p<0,0001$.

4.3 Distribución en los diferentes rangos según método utilizado.

Los 70 resultados obtenidos de las determinaciones por los dos inmunoensayos se clasificaron en categorías clínicas, según la cual se dividían en pacientes con deficiencia de vitamina D (<20 ng/mL), insuficiencia de vitamina D (20-30 ng/mL), suficiencia de vitamina D (30- 150 ng/mL) y toxicidad (>150 ng/mL); los resultados obtenidos se expresan en la Tabla XV.

La variación analítica entre métodos hacía que se clasificara a pacientes en diferentes categorías clínicas. Además, estudiamos cada paciente individualmente:

---En cinco pacientes en los cuales el resultado con Advia Centaur® lo incluía en el grupo de deficiencia, sin embargo con IDS-iSYS® en el rango de insuficiencia.

---En cuatro pacientes ocurría lo contrario, con el método de IDS-iSYS® presentaban resultados de deficiencia y con el de Advia Centaur® insuficiencia.

Es decir, al estudiar las determinaciones de 25 (OH)-vitamina D de forma individual de los pacientes que se encontraban en el rango de deficiencia (29 sujetos con cada inmunoensayo), los resultados obtenidos con el IDS-iSYS® no coincidían con los resultados si las muestras eran analizadas con el Advia Centaur®. Lo mismo ocurría con los pacientes que se encontraban en el rango de insuficiencia.

	Deficiencia	Insuficiencia	Suficiencia	Toxicidad
IDS-iSYS®	29	22	19	0
Advia Centaur®	29	24	17	0

Tabla XV. Distribución de las muestras en cada una de las categorías dependiente de los niveles de vitamina D, al analizarlas con los dos inmunoensayos.

4.4 Reproducibilidad de los resultados en cada inmunoensayo.

El estudio de precisión realizado analizando las muestras de 50 pacientes por triplicado por los dos métodos nos reportó los resultados reflejados en la Tabla XVI para el coeficiente de variación y la desviación típica existente entre cada método y el resultado final se refleja en la Tabla XVII.

	Centauro	Centauro	IDS-iSYS	IDS-iSYS		Centauro	Centauro	IDS-iSYS	IDS-iSYS
Nº	SD	% CV	SD	% CV	Nº	SD	% CV	SD	% CV
1	0,00	0,00	2,65	24,24	26	1,40	5,81	3,55	12,53
2	1,78	20,95	1,32	13,03	27	3,01	3,86	1,95	2,59
3	0,21	4,76	0,70	6,14	28	1,16	3,74	3,23	9,08
4	1,19	9,22	1,46	9,91	29	0,57	2,28	1,46	4,63
5	0,82	5,57	2,11	14,91	30	1,52	4,24	4,78	13,28
6	1,27	18,09	2,52	18,16	31	1,56	7,73	4,19	12,33
7	1,96	21,98	2,22	22,09	32	0,85	3,81	0,35	1,18
8	0,83	4,69	4,15	19,23	33	1,57	6,05	2,41	7,28
9	0,98	4,38	3,31	12,04	34	0,49	2,07	1,57	5,24
10	0,56	2,59	1,15	5,01	35	1,76	4,11	4,12	9,99
11	1,42	7,94	1,47	5,56	36	1,36	5,25	3,65	11,01
12	0,75	4,68	4,51	20,70	37	0,60	1,80	1,76	3,56
13	1,22	22,02	2,39	15,03	38	1,03	4,87	5,66	22,99
14	0,96	5,79	3,17	15,13	39	2,45	12,59	12,88	49,34
15	1,17	7,42	2,10	9,49	40	1,08	8,02	3,00	14,18
16	1,05	5,28	1,50	8,13	41	0,96	4,02	1,71	5,96
17	0,37	1,65	2,96	11,63	42	1,88	13,47	0,84	4,57
18	1,06	6,20	1,01	5,40	43	1,50	4,06	5,44	13,75
19	1,80	12,10	1,14	4,56	44	0,20	0,79	2,38	6,88
20	1,01	5,17	5,36	22,10	45	0,70	3,28	2,41	9,02
21	0,83	3,47	2,65	9,83	46	0,89	2,57	4,29	9,14
22	1,01	9,41	3,70	18,54	47	1,75	7,91	2,37	7,32
23	0,91	10,80	1,05	9,85	48	0,55	4,75	0,75	4,42
24	3,89	6,15	6,54	10,26	49	0,78	5,51	1,82	9,71
25	0,54	1,88	4,57	12,58	50	0,78	5,87	1,08	9,09

Tabla XVI. Resultado de SD y CV al analizar las muestras por triplicado por cada inmunoensayo.

	SD	CV (%)
Advia Centaur®	1,18	6,75
IDS-iSYS®	2,87	11,65

Tabla XVII. Media del SD y CV de cada inmunoensayo al analizar las 50 muestras.

4.5 Coeficiente de variación entre los dos métodos analizados.

Al realizar un análisis comparativo entre los dos métodos para ver la desviación estándar y el coeficiente de variación, reflejando así la variación de los resultados utilizando diferente método obtenemos una SD de 4,81 y un CV del 20,45 %.

DISCUSIÓN

1. Análisis de la distribución de las determinaciones plasmáticas de vitamina D y su adecuación en el Área de Salud de Badajoz.

La correcta distribución de las determinaciones de vitamina D se ajustaría a los criterios de petición de las guías clínicas pero, en realidad el aumento de funciones atribuidas a la vitamina D hace que se realice la determinación en ciertas situaciones clínicas aunque no esté aconsejado por las guías clínicas.

Como podemos observar en los resultados obtenidos en este estudio, las situaciones clínicas por las cuales se pide mayor número de determinaciones de vitamina D son: la insuficiencia renal crónica (1596 peticiones), la osteoporosis-osteopenia (502 peticiones) y la hipertensión (276 peticiones). En la insuficiencia renal crónica y la osteoporosis-osteopenia, está indicado determinar los niveles séricos de vitamina D^{160,161}, ya que en la insuficiencia renal crónica se produce un deterioro de las distintas funciones del riñón y, por lo tanto, se reduce la formación de calcitriol, al disminuir la acción de la alfa-1-hidroxilasa; y en la osteoporosis-osteopenia también es una recomendación de las guías clínicas determinar los niveles séricos de vitamina D, ya que los niveles insuficientes de vitamina D contribuyen a esta patología. Sin embargo, en el caso de la hipertensión, en la actualidad no existe un consenso sobre los beneficios de la vitamina D en el control de esta patología y la disminución del riesgo cardiovascular¹⁰⁷, por lo que las guías clínicas no aconsejan ni su medición ni la suplementación con vitamina D.

Cuando utilizamos el protocolo de petición creado a partir de las guías clínicas y la bibliografía reciente para analizar todas las peticiones realizadas en el Área de Salud de Badajoz en el año 2013, nos encontramos que alrededor de un tercio son peticiones que no siguen ningún criterio aceptado de petición. Dentro del grupo de peticiones innecesarias según diagnóstico e historia clínica, se pone de manifiesto que las principales patologías en las que se pide determinación de vitamina D son la hipertensión con un

21,71 %, seguida de la diabetes con 10,38 % y de las dislipemias con un 9,04 %; no existen evidencias científicas que apoyen la necesidad de determinar los niveles de 25 (OH) vitamina D en estas patologías.

En la revisión bibliográfica, nos encontramos numerosos estudios que ponen de manifiesto la asociación entre una deficiencia de vitamina D y estas patologías (hipertensión, diabetes y dislipemias), la mayoría de ellos son estudios epidemiológicos. Sin embargo, en los estudios de tipo ensayos clínicos los resultados encontrados en la bibliografía son contradictorios, no existen evidencias claras que indiquen que los suplementos de vitamina D tengan un papel en la prevención o mejora de estas enfermedades^{85,107} y no está claro si la deficiencia de vitamina D es una causa o la consecuencia de padecer estas enfermedades. Lo mismo sucede con otras patologías como la artritis reumatoide, anemia y cáncer, en los que no existen evidencias sobre la mejora de estas patologías con suplementos de vitamina D^{45,90,108}, por lo que la determinación de los niveles de 25 (OH) D no está recomendada.

El estudio sobre la distribución de la determinación de vitamina D según el servicio peticionario nos ayudó para controlar las peticiones por servicio. Encontramos que más del 50 % de las peticiones no recomendadas por las guías clínicas procedían de atención primaria (centros de salud). Opinamos que sería importante la restricción de la petición de vitamina D desde los servicios de atención primaria sin una justificación que atendiera a criterios clínicos. Además, independientemente del servicio peticionario, se ha producido un aumento casi exponencial en el número de determinaciones de vitamina D en los últimos años y todo parece indicar que se debe al aumento de estudios descriptivos sobre nuevas implicaciones de la vitamina D, aunque las guías clínicas no aconsejan la determinación de sus niveles en estas situaciones hasta que no haya más datos

concluyentes. Este aumento en nuestra Área de Salud fue de más del 1000% en los últimos 6 años. También el aumento exponencial se está produciendo a nivel mundial; en Francia se produjo un aumento del 250% de determinaciones de vitamina D entre 2007 y 2009 y de un 1000% entre 2005 y 2009¹²⁸. Las estadísticas del gobierno australiano reflejan un aumento de 100 veces entre 2000 y 2010¹²⁹. Por ello se, hace necesaria la implantación de un protocolo de petición en toda la región, para evitar que las peticiones sigan aumentando en los próximos años sin ningún criterio clínico.

2. Estudio económico de cuál sería la rentabilidad de la implantación de un protocolo de adecuación de la vitamina D siguiendo las recomendaciones actuales para su determinación.

La mala racionalización de la determinación de 25(OH)-vitamina D supone un exceso de gasto para los sistemas sanitarios, al igual que otras pruebas de laboratorio. La rentabilidad de la implantación del protocolo de petición de vitamina D creado en el Área de Salud de Badajoz supondría, según los resultados de 2013, un ahorro de 7753,1 euros al año. Este exceso de gasto sanitario en el Área de Salud de Badajoz habría que sumarles los costes indirectos de la determinación de la vitamina D (calibraciones, controles, personal, etc.) y el incremento en el número de determinaciones que se está produciendo año a año.

Si nos fijamos en los resultados de todas las Áreas de Salud del SES nos percatamos que principalmente en las Áreas de Salud de Cáceres y Plasencia no existe ningún control de la demanda y son las que mayor gasto suponen al SES. El sobrecoste sanitario que se produjo en el SES en 2013 ascendió a 120.377 euros, gasto que sigue aumentando año a año, por lo que la implantación de protocolos de petición de vitamina D en toda Extremadura ayudaría a una correcta adecuación de la demanda y, lo que es más importante, una correcta utilización de los recursos sanitarios. Este problema de racionalización de la vitamina D no sólo afecta a Extremadura, sino que sería interesante realizar estudios en otras Comunidades Autónomas y, si es necesario, tomar medidas al respecto. Para ello, los expertos en vitamina D a nivel internacional aconsejan medir sólo los niveles de vitamina D en los grupos de riesgo, ya que el cribado poblacional no se admite¹⁶².

3. Estudio comparativo entre el inmunoensayo utilizado de rutina en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Infanta Cristina (IDS iSYS) y otro inmunoensayo (Advia Centaur XP).

Un aspecto muy importante a tener en cuenta a la hora de hablar de vitamina D es el método utilizado para realizar su determinación. Tanto es así, que debido a la falta de estandarización de su medida se hace difícil establecer unos puntos de corte sobre los niveles de suficiencia. En 2010, desarrollaron un método de LC-MS/MS¹⁵⁴ que más tarde se ha reconocido como el método de referencia para la medición de 25(OH)-vitamina D. Éstos han disminuido su imprecisión en los últimos años de un 13,4% a un 6,9 %¹⁶³, por lo que son métodos más consistentes (CV 5-10%) y mucho más precisos (sesgo 5%) que los métodos basados en anticuerpos. Pero, su complejidad y la necesidad de personal muy especializado en su manejo lo convierten en un método poco útil en la práctica diaria. La disponibilidad de inmunoanálisis automatizados permite asumir desde el punto de vista asistencial el aumento en la demanda de la determinación de este parámetro.

En 2014-2015, el Centre For Diseases Control and Prevention (CDC) diseñó un programa (Vitamin D Standardization-Certification Program, VDSCP) que evalúa el rendimiento del ensayo (sesgo e imprecisión) a lo largo de un año; los criterios para superar dicha prueba eran una imprecisión global menor al 10% para la vitamina D total. La mayoría de métodos que superaron la prueba eran LC/MS/MS y sólo dos inmunoensayos (ADVIA Centaur Vitamina D Total assay[®] e IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D[®]).

Los dos métodos que hemos comparado son los dos inmunoensayos que superaron el programa VDSCP. Al compararlos, presentan una correlación estadísticamente significativa entre sí, con un coeficiente de correlación de Spearman de 0,86 al analizar todas las muestras en conjunto. Sin embargo, al analizar las menores de 20 ng/mL por

separado, nos encontramos que la correlación es baja, al presentar un coeficiente de correlación de 0,57, objetivando una mayor dispersión de los resultados entre los 2 métodos en los valores de decisión clínica. Los datos muestran que los resultados no son intercambiables y la gran variabilidad que se produce en valores bajos podría estar explicada por las diferencias en las reactividades cruzadas que presenta cada método¹⁴⁸. Esta variabilidad intermétodo en valores de decisión clínica hace que la inclusión de un paciente en un rango analítico concreto de vitamina D (deficiencia, insuficiencia, suficiencia o toxicidad) no sea igual¹⁶⁴, y utilizando diferente método hay pacientes que pasan de una categoría a otra, influyendo en la toma de decisión del clínico, por lo que cada laboratorio debería ajustar sus propios valores de referencia dependiendo del método utilizado.

En el estudio de precisión, el Advia centaur[®] presenta mejor CV que IDS-iSYS[®], siendo en este aspecto este inmunoensayo mejor, aunque todavía presentan CV muy elevados, presentando gran variabilidad intramétodo.

Existen otros estudios de comparación de inmunoensayos en los cuales se han obtenido resultados similares:

---En un estudio se compararon dos inmunoensayos de Roche[®] y uno de Abbott[®] para la determinación de la 25 (OH)-vitamina D. Se comparó el nuevo método de Roche con uno más antiguo de esta misma casa comercial y con el de Abbott[®], encontrando unos coeficientes de correlación al realizar el análisis de regresión de Passing-Bablok de 0,72 y 0,86 respectivamente. El nuevo método de Roche[®] fue el que presentó mejor CV (3,47 a 6,14%). Los resultados de este estudio demuestran que Abbott[®] y Roche[®] son métodos rápidos y precisos para la determinación de 25 (OH)-vitamina D, pero las diferencias encontradas entre los 3 métodos sigue indicando la necesidad de estandarización¹⁶⁵.

---En otro estudio se comparó el ensayo Lumipulse G 25-OH vitamina D[®] (Fujirebio) con el método de Diasorin[®]. Los resultados mostraron una buena concordancia clínica entre los 2 inmunoensayos, sin embargo, los resultados globales medidos en Lumipulse[®] fueron más altos en un promedio de 6,5%. Por lo que, al igual que en el resto de estudios comparativos entre inmunoensayos en la determinación de la vitamina D se hace necesaria la estandarización¹⁶⁶.

---Otro estudio de comparación de método para la determinación de la 25 (OH)-vitamina D, se analizó la concordancia entre los resultados de 3 inmunoensayos (Liaison[®], Elecsys[®] y Architect[®]). Los resultados se analizaron mediante el método de regresión de Passing-Bablok y mostraron una correlación estadísticamente significativa entre sí, como demuestran los elevados coeficientes de correlación hallados superiores al 0,9. Sin embargo, los resultados de 25(OH)-vitamina D obtenidos no son intercambiables, ya que existen diferencias constantes y proporcionales entre los 3 métodos¹⁶⁷.

---En este estudio se evaluó el rendimiento analítico del ensayo Beckman Coulter Unicel DXI 800[®]. Éste lo comparó con un método LC-MS/MS y otro de quimioluminiscencia (Liaison, DiaSorin). Los resultados mostraron una correlación del ensayo de Beckman Coulter[®] con el LC-MS/MS de 0,94 y de también de 0,94 con el método de DiaSorin[®]. Ambos inmunoensayos logran moderadamente clasificar a los pacientes según su estado de vitamina D. Sin embargo, necesitamos una mayor estandarización de los ensayos de la vitamina D para mejorar la exactitud y la comparabilidad¹⁶⁸.

Parece estar claro que, a día de hoy, la determinación por inmunoensayos de 25 (OH)-vitamina D presenta unos coeficientes de variación elevados y los resultados no son intercambiables. Los estudios sobre determinación de niveles de vitamina D continúan, y aunque el National Institute of Standards and Technology (NIST) desarrolló en 2009 materiales de referencia para la medición de 25 (OH)-vitamina D total, como el uso de

calibradores de referencia (SRM 972 y SRM 2972) para todas las casas comerciales confiando que mejorasen las variaciones entre métodos, los resultados siguen siendo muy variables y ahora mismo se está investigando más sobre las posibles interferencias con el restos de metabolitos de la vitamina D^{134,138,150}.

Algunos artículos sugieren que para estudiar la verdadera relación entre la vitamina D y la enfermedad es necesario la medición simultánea de las concentraciones de varios metabolitos de la vitamina D¹⁶⁹, aspecto que sólo se pueden conseguir mediante los métodos de LC-MS/MS; entre estos metabolitos cobra cada vez más importancia el 24,25-dihidroxitamina D¹⁷⁰. El metabolito de la vitamina D 24-25 (OH)₂-vitamina D es un interferente en algunos inmunoensayos; por un lado unos no lo detectan y por otro los que lo detectan lo hacen como vitamina D Total. En este aspecto, la idoneidad del inmunoensayo es ser capaz de detectar individualmente los diferentes metabolitos de la vitamina D, cosa que todavía no se ha conseguido.

Por último, otro aspecto importante es la diferencia en las concentración de vitamina D que se han encontrado entre raza blanca y negra; se había postulado que eran debidas a diferencias en la biodisponibilidad de los diferentes metabolitos de la vitamina D, debido principalmente a la concentración en la VDBP, sin embargo estas observaciones postuladas por inmunoensayos, al analizar las concentraciones de VDBP por LC-MS/MS no se han obtenido tales diferencias entre razas¹⁷¹.

CONCLUSIÓN

De los resultados obtenidos en la realización de la presente Tesis Doctoral, durante la cual se llevó a cabo un estudio descriptivo retrospectivo sobre la distribución de la determinaciones de vitamina D y su adecuación y además se hizo un estudio comparativo de los dos mejores inmunoensayos según el CDC, se concluye que:

1. Resaltar que las peticiones de determinación de vitamina D no se ajustan a los criterios de petición de las guías clínicas, esto no solo suponen un gasto sanitario extra, sino que además no reporta beneficios para los pacientes. Además se hace necesario controlar principalmente la demanda desde los centro de Atención Primaria ya que es el servicio que peor se ajusta a las guías clínicas.
2. Necesidad de implantar de un protocolo de petición de vitamina D tanto en el Área de Salud de Badajoz, como en el resto de Áreas del SES, para el control de la demanda de la vitamina D.
3. La rentabilidad de la implantación del protocolo de vitamina D supondría más de 120.000 euros al año en Extremadura, lo que supone un exceso de gasto para el sistema sanitario.
4. La variabilidad intermétodo e intramétodo encontrada en la comparación de los 2 inmunoensayos hace que ahora mismo sus resultados no sean intercambiables, por lo que un cambio en la metodología supondría ajustar los valores de normalidad para cada inmunoensayo. Con los resultados obtenidos el inmunoensayos ADVIA Centaur[®] presenta unos valores ligeramente mejores que el inmunoensayos que estamos utilizando ahora en rutina.
5. La vitamina D está considerada como un metabolito difícil de medir y el proceso de estandarización es difícil, por lo que recomendamos que hasta que finalice dicho proceso para el perfeccionamiento de la técnica y exista una buena correlación entre los diferentes métodos sería necesario que cada laboratorio en

consenso con los clínicos, definiera sus propios valores de referencia dependiendo el método utilizado. Además todo apunta a que en el futuro la vitamina D será necesaria medirla mediante LC-MS/MS, para medir por separado los diferentes metabolitos de la vitamina D y calcular así el verdadero nivel fisiológico de la vitamina D.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Institute of Medicine. **Dietary reference intakes: calcium and vitamin D.** Washington, DC: National Academies Press, 2011.
2. McCollum EV y Davis M. **The necessity of certain lipids in the diet during growth.** J Biol Chem. 1913; 15: 167–75.
3. Mellanby E. **Experimental rickets, fifed.** Research Council, Special Rep Series. 1921; No. 6'1.
4. McCollum EV, Simmonds N, Becker JE, Shipley PG. **Studies on experimental rickets. XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition.** J Biol Chem. 1922; 53: 293–321.
5. Goldblatt H y Soames KM. **A Study of Rats on a Normal Diet Irradiated daily by the Mercury Vapour Quartz Lamp or kept in Darkness.** Biochem J. 1923; 17(2):294–7.
6. Okereke OI, Singh A. **The role of vitamin D in the prevention of late-life depression.** J Affect Disord. 2016; 1(198): 1-14.
7. Holick MF. **Vitamin D deficiency.** N Engl J Med. 2007; 357: 266-81.
8. Lehmann B, Meurer M. **Vitamin D metabolism.** Dermatol Ther. 2010; 23: 2-12.
9. Hossein-Nezhad A, Holick MF. **Vitamin D for health: A global perspective.** Mayo Clin Proc. 2013; 88: 720-55.
10. Palermo NE, Holick MF. **Vitamin D, bone health, and other health benefits in pediatric patients.** J Pediatr Rehabil Med, 2014; 7:179-92.
11. Zittermann A, Pilz S, Hoffman H, März W. **Vitamin D and airway infections: a European perspective.** Eur J Med Res. 2016; 21(14): 1-10.
12. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT Jr, Anderson RR, et al. **Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiological consequences.** Science. 1980; 210:203–5.

13. Collins E D, Norman AW. **Vitamin D, in Handbook of Vitamins**, eds Rucker RB, Suttie JW, McCormick DB, Machlin LJ, editors. (New York, NY: Marcel Dekker Inc.). 2001; 51–113.
14. Holick MF. **Photobiology of Vitamin D, in Vitamin D, 3rd Edn.**, eds Feldman D., Pike J. W., Adams J. S., editors. (London, GB: Elsevier). 2011; 13–22.
15. Bickle DD. **Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications.** Chem Biol. 2014; 21: 319-29.
16. Trang HM, Cole DE, Rubin LA, Pierratos A, Siu S, Vieth R. **Evidence that vitamin D3 increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2.** Am J Clin Nutr. 1998; 68(4): 854–8.
17. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. **Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans.** J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89(11):5387–91.
18. Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Fassino V, Mazzei F, D'Erasmo E, et al. **Short and long-term variations in serum calciotropic hormones after a single very large dose of ergocalciferol (vitamin D2) or cholecalciferol (vitamin D3) in the elderly.** J Clin Endocrinol Metab. 2008; 93(8): 3015–20.
19. Glendenning P, Chew GT, Seymour HM, Gillett MJ, Goldswain PR, Inderjeeth CA, et al. **Serum 25-hydroxyvitamin D levels in vitamin D-insufficient hip fracture patients after supplementation with ergocalciferol and cholecalciferol.** Bone. 2009; 45(5): 870–5.
20. Heaney RP, Recker RR, Grote J, Horst RL, Armas LA. **Vitamin D3 is more potent than vitamin D2 in humans.** Metab. 2011; 96(3):E447-52.
21. Lehmann U, Hirche F, Stangl GI, Hinz K, Westphal S, Dierkes J. **Bioavailability of vitamin D2 and D3 in healthy volunteers, a randomized placebo-controlled trial.** J Clin Endocrinol. Metab. 2013; 98(11):4339-45.

22. Margulies SL, Kurian D, Elliott MS, Han Z. **Vitamin D deficiency in patients with intestinal malabsorption syndromes- think in and outside the gut.** J Dig Dis. 2015; 16(11):617-33.
23. Battault S, Whiting SJ, Peltier SL, Sadrin S, Gerber G, Maixent JM. **Vitamin D metabolism, functions and needs: from science to health claims.** Eur J Nutr. 2012; 52(2):429-41.
24. Jones G. **Pharmacokinetics of vitamin D toxicity.** Am J Clin Nutr. 2008; 88: 582S–586S.
25. Zehnder D, Bland R, Williams MC, McNinch RW, Howie AJ, Stewart PM, et al. **Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d (3)-1 alfa-hydroxylase.** J Clin Endocrinol Metab. 2001; 86(2):888-94.
26. Holick MF, Garabedian M. **Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications.** In: Favus MJ, ed. **Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th ed.** Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research. 2006; 129-37.
27. Omdahl JL, Morris HA, May BK. **Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation.** Annu Rev Nutr. 2002; 22:139–66.
28. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, et al. **Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter.** Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(4):1387–91.
29. Zierold C, Nehring JA, DeLuca HF. **Nuclear receptor 4A2 and C/EBPbeta regulate the parathyroid hormone-mediated transcriptional regulation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase.** Arch Biochem Biophys. 2007; 460(2):233–9.

30. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, et al. **The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed.** J Bone Miner Res. 1998; 13(3):325-49.
31. DeLuca HF. **Overview of general physiologic features and functions of vitamin D.** Am J Clin Nutr. 2004; 80(6 Suppl):1689S-96S.
32. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. **Vitamin D.** Am J Physiol Renal Physiol. 2005; 289(1): F8-28.
33. Giangreco AA, Dambal S, Wagner D, Van der Kwast T, Vieth R, Prins GS, et al. **Differential expression and regulation of vitamin D hydroxylases and inflammatory genes in prostate stroma and epithelium by 1,25-dihydroxivitamin D in men with postate cáncer and an in vitro model.** J Steroid Biochem Mol Biol. 2015; 148:156-65.
34. Aggarwal A, Höbaus J, Tennakoon S, Prinz-Wohlgenannt M, Graça J, Price SA, et al. **Active vitamin D potentiates the anti-neoplastic effects of calcium in the colon: A cross talk through the calcium-sensing receptor.** J Steroid Biochem Mol Biol. 2016; 155:231-8.
35. Hanchette CL, Schwartz GG. **Geographic patterns of prostate cancer mortality. Evidence for a protective effect of ultraviolet radiation.** Cancer. 1992; 70(12):2861-9.
36. John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. **Vitamin D and breast cancer risk: The NHANES I Epidemiologic follow-up study, 1971–1975 to 1992. National Health and Nutrition Examination Survey.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1999; 8(5):399-406.

37. Luscombe CJ, Fryer AA, French ME, Liu S, Saxby MF, Jones PW, et al. **Exposure to ultraviolet radiation: Association with susceptibility and age at presentation with prostate cancer.** *Lancet.* 2001; 358(9282):641-2.
38. Grant, WB. **An estimate of premature cancer mortality in the U.S. due to inadequate doses of solar ultraviolet-B radiation.** *Cancer.* 2002; 94(6):1867-75.
39. Siegel R, J. Ma, Z. Zou, A. Jemal A. **Cancer statistics, 2014.** *CA Cancer J Clin.* 2014; 64(1):9-29.
40. Garland C, Shekelle RB, Barrett-Connor E, Criqui MH, Rossof AH, Paul O. **Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer: a 19-year prospective study in men.** *Lancet.* 1985; 1(8424): 307–309.
41. McCullough ML, Robertson AS, Rodriguez C, Jacobs EJ, Chao A, Carolyn J, et al. **Calcium, vitamin D, dairy products, and risk of colorectal cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort (United States).** *Cancer Causes Control.* 2003; 14(1):1-12.
42. Lee JE, Li H, Chan AT, Hollis BW, Lee IM, Stampfer MJ, et al. **Circulating levels of vitamin D and colon and rectal cancer: The Physicians' Health Study and a meta-analysis of prospective studies.** *Cancer Prev Res (Phila).* 2011; 4(5)735–43.
43. Garland CF, Comstock GW, Garland FC, Helsing KJ, Shaw EK, Gorham ED. **Serum 25-hydroxyvitamin D and colon cancer: Eight-year prospective study.** *Lancet.* 1989; 2(8673):1176–1178.
44. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(2):69-90.
45. Manson JE, Mayne ST, Clinton SK. **Vitamin D and prevention of cancer: ready for prime time?** *N Engl J Med.* 2011; 364:1385-87.

46. Villaseñor A, Ballard-Barbash R, Ambis A, Bernstein L, Baumgartner K, Baumgartner R, et al. **Associations of serum 25-hydroxyvitamin D with overall and breast cancer-specific mortality in a multiethnic cohort of breast cancer survivors.** *Cancer Causes Control.* 2013; 24(4):759-67.
47. Bertone-Johnson ER, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, et al. **Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(8):1991-7.
48. Scarmo S, Afanasyeva Y, Lenner P, Koenig KL, Horst RL, Clendenen TV, et al. **Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and risk of breast cancer: A nested case-control study.** *Breast Cancer Res.* 2013; 26;15(1):R15.
49. Prentice RL, Pettinger MB, Jackson RD, Wactawski-Wende J, Lacroix AZ, Anderson GL, et al. **Health risks and benefits from calcium and vitamin D supplementation: Women's Health Initiative clinical trial and cohort study.** *Osteoporos Int.* 2013; 24(2):567-80.
50. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB, Grant WB, Giovannucci EL, Lipkin M, et al. **Vitamin D and prevention of breast cancer: Pooled analysis.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007; 103(3-5):708-11.
51. Grundmann M, von Versen-Höynck F. **Vitamin D. Roles in women's reproductive health?** *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 2;9:146.
52. Bosetti C, Turati F, La Vecchia C. **Hepatocellular carcinoma epidemiology.** *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2014; 28(5):753-70.
53. Forner A, Llovet JM, Bruix J. **Hepatocellular carcinoma.** *Lancet.* 2012; 31;379(9822):1245-55
54. Finkelmeier F, Kronenberger B, Köberle V, Bojunga J, Zeuzem S, Trojan J, et al. **Severe 25-hydroxyvitamin D deficiency identifies a poor prognosis in patients**

- with hepatocellular carcinoma. A prospective cohort study.** *Aliment Pharmacol Ther.* 2014; 39(10):1204-12.
55. Fedirko V, Duarte-Salles T, Bamia C, Trichopoulou A, Aleksandrova K, Trichopoulos D, et al. **Prediagnostic circulating vitamin D levels and risk of hepatocellular carcinoma in European populations: A nested case-control study.** *Hepatology.* 2014; 60(4):1222-30.
56. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. **Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: Results of a randomized trial.** *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(6):1586-91.
57. Holick MF, Chen TC. **Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences.** *Am J Clin Nutr.* 2008; 87(4):1080S–1086S.
58. Schoindre Y, Terrier B, Kahn JE, Saadoun D, Souberbielle JC, Benveniste O, et al. **Vitamin D and autoimmunity. Second part: Clinical aspects.** *Rev Med Interne.* 2012; 33(2):87-93.
59. Rosen Y, Daich J, Soliman I, Brathwaite E, Shoenfeld Y. **Vitamin D and autoimmunity.** *Scand J Rheumatol.* 2016; 18:1-9.
60. Raghuwanshi A, Joshi SS, Christakos S. **Vitamin D and multiple sclerosis.** *J Cell Biochem.* 2008; 105(2):338-343.
61. Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K, Valery PC, Pender MP, Taylor BV, et al. **Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination.** *Neurology.* 2011; 76(6):540-8.
62. McDowell TY, Amr S, Culpepper WJ, Langenberg P, Royal W, Bever C, et al. **Sun exposure, vitamin D and age at disease onset in relapsing multiple sclerosis.** *Neuroepidemiology.* 2011; 36(1):39–45.

63. Duan S, Lv Z, Fan X, Wang L, Han F, Wang H, et al. **Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis.** *Neurosci Lett.* 2014; 570:108-113.
64. Hiremath GS, Cettomai D, Baynes M, Ratchford JN, Newsome S, Harrison D, et al. **Vitamin D status and effect of low-dose cholecalciferol and high-dose ergocalciferol supplementation in multiple sclerosis.** *Mult Scler.* 2009; 15(6):735-740.
65. Steffensen L, Brustad M, Skeie L, Jorgensen Y, Figenschau M, Kampman M. **Vitamin D status in individuals with multiple sclerosis at baseline and after supplementation with 20,000 IU cholecalciferol a week for 48 weeks.** 2009 (Internet).
66. Steffensen LH, Jorgensen L, Straume B, Mellgren SI, Kampman MT. **Can vitamin D3 supplementation prevent bone loss in persons with MS? A placebo-controlled trial.** *J Neuro.* 2011; 258(9):1624–1631.
67. Smolders J. **Vitamin d and multiple sclerosis: correlation, causality, and controversy.** *Autoimmune Dis.* 2011;629538.
68. Kamen DL. **Vitamin D in lupus-new kid on the block?** *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2010; 68:218-22.
69. Cutolo M, Otsa K, Uprus M, Paolino S, Serio B. **Vitamin D in rheumatoid arthritis.** *Autoimmun Rev.* 2007; 7(1):59-64.
70. Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E, et al. **The complex role of vitamin D in autoimmune diseases.** *Scand J Immunol.* 2008; 68(3):261-9.
71. García-Carrasco M, Romero JL. **Vitamin D and autoimmune rheumatic disease.** *Reumatol Clin.* 2015; 11:333-4.

72. Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, Ioannidis JP. **Vitamin D and multiple health outcomes: Umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials.** *BMJ.* 2014;348:g2035.
73. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. **Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response.** *Science* 2006; 311:1770-3.
74. Laaksi I, Ruohola JP, Tuohimaa P, Auvinen A, Haataja R, Pihlajamäki H, et al. **An association of serum vitamin D concentrations < 40 nmol/L with acute respiratory tract infection in young Finnish men.** *Am J Clin Nutr.* 2007; 86:714-7.
75. Roth D, Jones A, Prosser C, Robinson J, Vohra S. **Vitamin D receptor polymorphisms and the risk of acute lower respiratory tract infection in early childhood.** *J Infect Dis.* 2008; 197:676-80.
76. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R. **Immunohistochemical localization of the 1,25(OH)2D3 receptor and calbindin D28k in human and rat pancreas.** *Am J Physiol.* 1994; 267:E356–360.
77. Bland R, Markovic D, Hills CE, Hughes SV, Chan SL, Squires PE, et al. **Expression of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in pancreatic islets.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 89-90:121-125.
78. Maestro B, Dávila N, Carranza MC, Calle C. **Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 84:223–230.
79. Van Etten E, Mathieu C. **Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts.** *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 97:93-101.

80. Giulietti A, van Etten E, Overbergh L, Stoffels K, Bouillon R, Mathieu C. **Monocytes from type 2 diabetic patients have a proinflammatory profile. 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) works as anti-inflammatory.** *Diabetes Res Clin Pract.* 2007; 77:47–57.
81. Svensson J, Lyngaae-Jørgensen A, Carstensen B, Simonsen L, Mortensen H, Registry DCD. **Long-term trends in the incidence of type 1 diabetes in Denmark: the seasonal variation changes over time.** *Pediatr Diabetes.* 2009; 10:248-54.
82. Mohr S, Garland C, Gorham E, Garland F. **The association between ultraviolet B irradiance, vitamin D status and incidence rates of type 1 diabetes in 51 regions worldwide.** *Diabetologia.* 2008; 51:1391-8.
83. Liu C, Lu M, Xia X, Wang J, Wan Y, He L, et al. **Correlation of serum vitamin D level with type 1 diabetes mellitus in children: a meta-analysis.** *Nutr Hosp.* 2015; 32(4):1591-1594.
84. Shen L, Zhuang QS, Ji HF. **Assessment of vitamin D levels in type 1 and type 2 diabetes patients: Results from meta-analysis.** 2016; 60(5):1059-67.
85. Kampmann U, Mosekilde L, Juhl C, Moller N, Christensen B, Rejnmark L, et al. **Effects of 12 weeks high dose vitamin D3 treatment on insulin sensitivity, beta cell function, and metabolic markers in patients with type 2 diabetes and vitamin D insufficiency - a double-blind, randomized, placebo-controlled trial.** *Metabolism.* 2014; 63:1115-1124.
86. Seida JC, Mitri J, Colmers IN, Majumdar SR, Davidson MB, Edwards AL, et al. **Clinical review: Effect of vitamin D3 supplementation on improving glucose homeostasis and preventing diabetes: a systematic review and meta-analysis.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99(10):3551-60.

87. Krul-Poel YH, Westra S, ten Boekel E, ter Wee MM, van Schoor NM, van Wijland H, et al. **Effect of Vitamin D Supplementation on Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes (SUNNY Trial): A Randomized Placebo-Controlled Trial.** *Diabetes Care.* 2015; 38(8):1420-6.
88. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. **The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know?** *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(1):53-8.
89. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. **Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited.** *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:1153-1158.
90. Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, et al. **The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement.** *Endocr Rev.* 2012; 33:456-492.
91. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, et al. **Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence.** *Autoimmun Rev.* 2013; 12:976-989.
92. Pilz S, Gaksch M, O'Hartaigh B, Tomaschitz A, Marz W. **The role of vitamin D deficiency in cardiovascular disease: where do we stand in 2013?** *Arch Toxicol.* 2013; 87:2083-2103.
93. Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P. **Vitamin D status and ill health: a systematic review.** *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014; 2(1):76-89.
94. Kunutsor SK, Apekey TA, Steur M. **Vitamin D and risk of future hypertension: meta-analysis of 283,537 participants.** *Eur J Epidemiol.* 2013; 28:205-221.

95. Kienreich K, Grubler M, Tomaschitz A, Schmid J, Verheyen N, Rutters F, et al. **Vitamin D, arterial hypertension & cerebrovascular disease.** Indian J Med Res. 2013; 137:669-679.
96. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. **A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010.** Lancet. 2012; 380:2224-2260.
97. Witham MD, Price RJ, Struthers AD, Donnan PT, Messow CM, Ford I, et al. **Cholecalciferol treatment to reduce blood pressure in older patients with isolated systolic hypertension: the VitDISH randomized controlled trial.** JAMA Intern Med. 2013; 173:1672-1679.
98. Scragg R, Slow S, Stewart AW, Jennings LC, Chambers ST, Priest PC, et al. **Long-term high-dose vitamin D3 supplementation and blood pressure in healthy adults: a randomized controlled trial.** Hypertension. 2014; 64:725-730.
99. Kunutsor SK, Burgess S, Munroe PB, Khan H. **Vitamin D and high blood pressure: causal association or epiphenomenon?** Eur J Epidemiol. 2014; 29:1-14.
100. Wood AD, Secombes KR, Thies F, Aucott L, Black AJ, Mavroeydi A, et al. **Vitamin D3 supplementation has no effect on conventional cardiovascular risk factors: a parallel-group, double-blind, placebo-controlled RCT.** J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97:3557-3568.

101. Forman JP, Scott JB, Ng K, Drake BF, Suarez EG, Hayden DL, et al. **Effect of vitamin D supplementation on blood pressure in blacks.** Hypertension. 2013; 61:779-785.
102. Wamberg L, Kampmann U, Stodkilde-Jorgensen H, Rejnmark L, Pedersen SB, Richelsen B. **Effects of vitamin D supplementation on body fat accumulation, inflammation, and metabolic risk factors in obese adults with low vitamin D levels results from a randomized trial.** Eur J Intern Med. 2013; 24:644-649.
103. Suzuki M, Yoshioka M, Hashimoto M, Murakami M, Noya M, Takahashi D, et al. **Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of vitamin D supplementation in Parkinson disease.** Am J Clin Nutr. 2013; 97:1004-1013.
104. Dalbeni A, Scaturro G, Degan M, Minuz P, Delva P. **Effects of six months of vitamin D supplementation in patients with heart failure: a randomized double-blind controlled trial.** Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2014; 24:861- 868.
105. Witham MD, Ireland S, Houston JG, Gandy SJ, Waugh S, Macdonald TM, et al. **Vitamin D therapy to reduce blood pressure and left ventricular hypertrophy in resistant hypertension: randomized, controlled trial.** Hypertension. 2014, 63:706-712.
106. Jehle S, Lardi A, Felix B, Hulter HN, Stettler C, Krapf R. **Effect of large doses of parenteral vitamin D on glycaemic control and calcium/phosphate metabolism in patients with stable type 2 diabetes mellitus: a randomised, placebo-controlled, prospective pilot study.** Swiss Med Wkly. 2014; 144:w13942.
107. Pilz S, Gaksch M, Kienreich K, Grubler M, Verheyen N, Fahrleitner-Pammer A, et al. **Effects of Vitamin D on Blood Pressure and Cardiovascular Risk Factors A Randomized Controlled Trial.** Hypertension. 2015; 65(6):1195-201.

108. Aloia JF. **Clinical Review: The 2011 Report on Dietary Reference Intake for Vitamin D: Where Do We Go From Here?** J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96(10):2987-96.
109. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. **Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline.** J Clin Endocrinol Metab. 2011; 96(7):1911-30.
110. Vaqueiro M, Baré M, Anton E, Andreu E, Moya A, Sampere R, et al. **Hipovitaminosis D asociada a exposición solar insuficiente en la población mayor de 64 años.** Med Clin. 2007; 129(8):287-91.
111. González-Padilla E, Soria López A, González-Rodríguez E, García-Santana S, Mirallave-Pescador A, Groba Marco Mdel V, et al. **Elevada prevalencia de hipovitaminosis D en los estudiantes de medicina de Gran Canaria, Islas Canarias (España).** Endocrinol Nutr. 2011; 58(6):267-73.
112. Durá-Travé T, Gallinas-Victoriano F, Chueca-Guindulain MJ y Berrade-Zubiri S. **Deficiencia de vitamina D en escolares y adolescentes con un estado nutricional normal.** Nutr Hosp. 2015; 32(3):1061-66.
113. Harkness LS, Cromer BA. **Vitamin D deficiency in adolescent females.** J Adoles Health. 2005; 37(1):75
114. Weng FL, Shults J, Leonard MB, Stallings VA, Zemel BS. **Risk factors for low serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in otherwise healthy children and adolescents.** Am J Clin Nutr. 2007; 86(1): 150-8.
115. Kumar J, Muntner P, Kaskel FJ, Hailpern SM, Melamed ML. **Prevalence and associations of 25-hydroxyvitamin D deficiency in US children: NHANES 2001-2004.** Pediatrics. 2009; 124(3): 362-70.

116. Bener A, Al-Ali M, Hoffmann GF. **Vitamin D deficiency in healthy children in a sunny country: associated factors.** *Int J Food Sci Nutr.* 2009; 60: 60-70.
117. González-Gross M, Valtueña J, Breidenassel C, Moreno LA, Ferrari M, Kersting M, et al. **Vitamin D status among adolescents in Europe: the Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence study.** *Br J Nutr.* 2012; 107: 755-64.
118. Turer CB, Lin H, Flores G. **Prevalence of vitamin D deficiency among overweight and obese US children.** *Pediatrics.* 2013; 131(1): e152-61.
119. Vierucci F, Del Pistoia M, Fanos M, Gori M, Carlone G, Erba P, et al. **Vitamin D status and predictors of hypovitaminosis D in Italian children and adolescents: a cross-sectional study.** *Eur J Pediatr.* 2013; 172(12): 1607-17.
120. Gutiérrez Medina S, Gavela-Pérez T, Domínguez-Garrido MN, Gutiérrez-Moreno E, Rovira A, Garcés C, et al. **The influence of puberty on vitamin D status in obese children and the possible relation between vitamin D deficiency and insulin resistance.** *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015; 28(1-2):105-10.
121. Clemens TL, Adams JS, Henderson SL, Holick MF. **Increased skin pigment reduces the capacity of the skin to synthesize vitamin D.** *Lancet.* 1982; 1:74-6.
122. Giacomoni PU. **Spectral intensity of natural UVR and its dependence on various parameters.** In: Urbach F, editor. *The Biologic Effects of Ultraviolet Radiation.* Oxford and New York. Pergamon Press. 1969; 351-8.
123. Webb AR, Kline L, Holick MF. **Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: Exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin.** *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 67:373-8.

124. Chen TC. **Photobiology of vitamin D. In: Holick MF, editor. Vitamin D physiology, molecular biology, and clinical applications.** New Jersey: Humana Press. 1998; 17–37.
125. Sanchez CL, Rodríguez AB, Sánchez J, González R, Rivero M, Barriga C y Cubero J. **Análisis nutricional en el aporte de mineral calcio en mujeres con lactancia.** Arch Latinoam Nutr. 2008; 58:4
126. Souberbielle JC, Courbebaisse M, Cormier C, Pierrot-Deseilligny C, Viard JP, Jean G, Cavalier E. **When should we measure Vitamin D concentration in clinical Practice?** Scan J Clin Lab Invest. 2012; 72 (Suppl):129-35.
127. Singh R. **Are clinical laboratories prepared for accurate testing 25-hydroxyvitamin D?** Clin Chem. 2008; 54:221-331.
128. Haute Autorité de santé. **Rapport D`Evaluation technologique: Utilité clinique du dosage de la vitamine D.** 2013 (Internet).
129. Farrell CJ, Hermann M. **Determination of vitamin D and its metabolites.** Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2013; 27(5):675-88.
130. Ganji V, Zhang X, Shaikh N, Tangpricha V. **Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with prevalence of metabolic syndrome and various cardiometabolic risk factors in US children and adolescents based on assay-adjusted serum 25-hydroxyvitamin D data from NHANES 2001-2006.** Am J Clin Nutr; 2011; 94:225–33.
131. Vanlint S. **Vitamin D and obesity.** Nutrients. 2013; 5:949-56.
132. Kennel KA, Drake MT, Hurley DL. **Vitamin D Deficiency in Adults: When to Test and How to Treat.** Mayo Clin Proc. 2010; 85(8):752-8.
133. Thacher TD, Clarke BL. **Vitamin D Insufficiency.** Mayo Clin Proc. 2011; 86(1):50-60.

134. Thienpont LM, Stepman HC, Vesper HW. **Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2.** Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2012; 243:41–9.
135. Reddy GS, Muralidharan KR, Okamura WH, Tserng K-Y, McLane JA. **Metabolism of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and its C-3 epimer 1 α ,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D3 in neonatal human keratinocytes.** Steroids. 2011; 66:441–50.
136. Baecher S, Leinenbach A, Wright JA, Pongratz S, Kobold U, Thiele R. **Simultaneous quantification of four vitamin D metabolites in human serum using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for vitamin D profiling.** Clin Biochem. 2014; 45:1491–6.
137. Granada-Lorencio F, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán B, Donoso-Navarro E, Silvestre-Mardomingo R. **Serum levels of 3-Epi-25-OH-D3 during Hypervitaminosis D in Clinical Practice.** J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97:E2266–E70.
138. Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. **The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) is present in adult serum.** J. Clin Endocrinol Metab. 2012; 97(1):163-8.
139. Brown AJ, Ritter CS, Weiskopf AS, Vouros P, Sasso GJ, Uskokovic MR, et al. **Isolation and identification of 1 α -hydroxy-3-epi-vitamin D3, a potent suppressor of parathyroid hormone secretion.** J Cell Biochem. 2005; 96:569–78.
140. Yetley EA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, Phinney KW, Lacher DA, Christakos S, et al. **Vitamin D Roundtable on the NHANES Monitoring of Serum 25(OH)D: Assay Challenges and Options for Resolving Them NHANES Monitoring of**

- serum 25-hydroxyvitamin D: A roundtable summary.** J Nutr. 2010; 140(11):2030S-45S.
141. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SK. **C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25- hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status.** J Clin Endocrinol Metab. 2006; 91(8):3055-61.
142. Cashman KD, Hayes A Galvin K, Merkel J, Jones G, Kaufmann M, et al. **Significance of serum 24,25-dihydroxivitamin D in the assessment of vitamin D status: a double-edged sword?.** Clin Chem. 2015; 61(4):636-45.
143. Moon HW, Cho JH, Hur M, Song J, Oh GY, Park CM, et al. **Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays.** Clin Biochem. 2012; 45:326-30.
144. Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. **State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods.** Clin Chem. 2012; 58:531-41.
145. Binkley N, Krueger DC, Morgan S, Wiebe D. **Current status of clinical 25-hydroxyvitamin D measurement: an assessment of between-laboratory agreement.** Clin Chim Acta. 2010; 411:1976-82.
146. De la Hunty A, Wallace AM, Gibson S, Viljakainen H, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. **UK Food Standards Agency Workshop Consensus Report: the choice of method for measuring 25-hydroxyvitamin D to estimate vitamin D status for the UK National Diet and Nutrition Survey.** Brit J Nutr. 2010; 104(4):612-9.

147. 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. 2010; 58:543-548.
148. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. **Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations.** Steroids. 2010; 75(7):477–88.
149. Carter GD. **Accuracy of 25-Hydroxyvitamin D Assays: Confronting the Issues.** Curr Drug Targets. 2011; 12:19-28.
150. Carter GD. **25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte.** Clin Chem. 2012; 58:486-8.
151. Fang H, Yu S, Cheng Q, Cheng X, Han J, Qin X, et al. **Determination of 1,25-dihydroxyvitamin D2 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human serum using liquid chromatography with tandem mass spectrometry.** J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2016; 1027:19-26.
152. Lai JK, Lucas RM, Clements MS, Harrison SL, Banks E. **Assessing vitamin D status: pitfalls for the unwary.** Mol Nutr Food Res. 2010; 54:1062–71.
153. Hollis BW. **Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs.** Am J Clin Nutr. 2008; 88:507S–10S.
154. 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 chromatography-tandem mass spectrometry.** Anal Chem. 2010; 82:1942–8.

155. Freeman J, Wilson K, Spears R, Shalhoub V, Sibley P. **Performance evaluation of four 25-hydroxyvitamin D assays to measure 25-hydroxyvitamin D₂**. Clin BioChem. 2015; 48(16-17):1097-104.
156. Hollis BW, Horst RL. **The Assessment of Circulating 25(OH)D and 1,25(OH)₂D: Where We Are and Where We Are Going?** J Steroid Biochem Mol Biol. 2007; 103:473–476.
157. Córdoba C y Granado F. **Vitamina D: Una perspectiva actual. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC)**. 2013 (Internet).
158. Altman DG, Bland JM. **Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies.** The Statistician. 1983;32:307-17.
159. Lluís-Carrasco J, Jover LL. **Métodos estadísticos para evaluar la concordancia.** Med Clin (Barc). 2004;122 Supl 1:28-34.
160. Kruger MC, Wolbr FM. **Osteoporosis: Modern Paradigms for Last Century's Bones.** Nutrients. 2016 Jun 17;8(6). pii:E376
161. Bover J, Egido J, Fernández-Giráldez E, Praga M, Solozábal-Campos C, Torregrosa JV, Martínez-Castelao A. **Vitamin D, vitamin D receptor and the importance of its activation in patients with chronic kidney disease.** Nefrologia. 2015;35(1):28-41.
162. Scott MG, Gronowski AM, Reid IR, Holick MF, Thadhani R, Phinney K. **Vitamina D: the more we know, the less we know.** Clin Chem. 2015;61(3):462-5.
163. Kvaskoff D, Heath AK, Simila HA, Ko P, English DR, Eyles DW. **Minimizing Matrix Effects for the Accurate Quantification of 25-Hydroxyvitamin D Metabolites in Dried Blood Spots by LC-MS/MS.** Clin Chem. 2016;62(4):639-46.

164. Górriz-Pintado S, Estela-Burriel PL. **Influencia del inmunoensayo empleado en la determinación de vitamina D sérica.** Endocrinol Nutr. 2014; 61(3):123-129.
165. Martins-Costa P, Martins H, Bravo F, Cruz M, Reis J, Oliveira JC. **Comparison of automated methods for measurement of 25-hydroxyvitamin D.** Clin Lab. 2013;59 (7-8):885-91.
166. Parra M, Foj L, Filella X. **Automated measurement of 25-OH Vitamin D on the LUMIPULSE® G1200: analytical verification and method comparison.** Br J Biomed Sci. 2016; 16:1-6.
167. Iglesias-Álvarez EM, Granada-Ybern ML, Doladé-Botías M, Barrallat-Martinez de Osaba J, Hidalgo Sáez I, Pastor-Ferrer MC. **Comparación de las concentraciones de vitamina D por 3 métodos comerciales.** Revista del Laboratorio Clínico
168. Ozcan N, Ucar F, Arzuhal AE, Bulut E, Ozturk A, Taslipinar Yavuz M, Temel I, Erden G. **Evaluation of the analytical performance of Unicel DXI 800 for the Total 25 (OH) Vitamin D measurements.** Clin Biochem. 2016;49(6):486-91.
169. Müller MJ, Volmer DA. **Mass spectrometric profiling of vitamin D metabolites beyond 25-hydroxyvitamin D.** Clin Chem. 2015 Aug;61(8):1033-48.
170. Berg AH, Powe CE, Evans MK, Wenger J, Ortiz G, Zonderman AB, et al. **24,25-Dihydroxyvitamin d3 and vitamin D status of community-dwelling black and White Americans.** Clin Chem. 2015;61(6):877-84.
171. Henderson CM, Lutsey PL, Misialek JR, Laha TJ, Selvin E, Eckfeldt JH, Hoofnagle AN. **Measurement by a Novel LC-MS/MS Methodology Reveals Similar Serum Concentrations of Vitamin D–Binding Protein in Blacks and Whites.** Clin Chem. 2016;62(1):179-87.

ANEXOS

REF IS-2700 	IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D (25OHD)	 CE
Instructions for Use	IN VITRO DIAGNOSTIC	

Intended Use

For In Vitro Diagnostic Use

The IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D Assay (IDS-iSYS 25OHD) is intended for the quantitative determination of 25-hydroxyvitamin D (25OHD) and other hydroxylated metabolites in human serum or plasma on the IDS-iSYS Multi-Discipline Automated Analyser (Analyser). Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in the assessment of vitamin D sufficiency in an adult population.

Summary and Explanation

Vitamin D is a commonly used collective term for a family of closely related seco-steroids. Upon exposure to sunlight, 7-dehydrocholesterol, located deep in the actively growing layers of the epidermis, undergoes photolytic cleavage of the "B" ring to yield pre-vitamin D₃ which is isomerised to vitamin D₃ (cholecalciferol). Vitamin D₃ and vitamin D₂ (ergocalciferol) may also be obtained by dietary supplementation or from a limited number of foods. Vitamin D₂ is metabolised in a similar way to vitamin D₃. Vitamin D is stored in adipose tissue and enters the circulation bound to vitamin D binding protein (VDBP) and albumin².

In the liver, vitamin D is hydroxylated to give 25OHD which also circulates as a complex with VDBP. A small proportion of the 25OHD is further hydroxylated in the kidney, under direct regulation by parathyroid hormone and ionised calcium levels, to form the biologically-active calcitropic hormone 1,25-dihydroxyvitamin D. Further hydroxylation and metabolism of vitamin D produces compounds that are water soluble and readily excreted. Hepatic vitamin D 25-hydroxylase activity is not tightly regulated and changes in cutaneous production of vitamin D₃, or ingestion of vitamin D (D₃ or D₂), result in changes in circulating levels of 25OHD³.

Serum concentration of 25OHD is considered to be the most reliable measure of overall vitamin D status and thus can be used to determine whether a patient is vitamin D sufficient⁴. Assessment of vitamin D status may be required to determine the cause of abnormal serum calcium concentrations in patients.

Method Description

The assay is based on chemiluminescence technology. 10µL of samples are subjected to a pre-treatment step to denature the VDBP. The treated samples are then neutralised in assay buffer and a specific anti-25OHD antibody labelled with acridinium is added. Following an incubation step, magnetic particles linked to 25OHD are added. Following a further incubation step, the magnetic particles are "captured" using a magnet. After a washing step and addition of trigger reagents, the light emitted by the acridinium label is inversely proportional to the concentration of 25OHD in the original sample.

Warnings and Precautions

The IDS-iSYS 25OHD is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in these Instructions for Use (IFU). IDS Limited will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute), howsoever caused arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: This kit contains material of animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Appropriate precautions and good laboratory practice must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Sodium Azide

Some reagents in this kit contain sodium azide <0.1 % (w/w) which may react with lead, copper or brass plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with large volumes of water to prevent azide build up.

Magnetic Particles

Xn. Harmful. Magnetic Particles contain methanol at >3 % but <10 %.

R20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R68/20/21/22 Harmful: possible risk of irreversible effects through inhalation, in contact with skin and if swallowed.

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

Assay Buffer

T. Toxic. Assay buffer contains methanol at >10 % but <20 %.

R20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.

R39/23/24/25 Toxic: danger of very serious irreversible effects through inhalation, in contact with the skin and if swallowed.

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

Sodium Hydroxide Solution

Xi. Irritant. Solution contains sodium hydroxide (<0.5M), 0.5 % ≤ C <2.0 %.

R36/38 Irritating to eyes and skin.

S36/37 Wear suitable protective clothing and gloves.

Handling Precautions

The reagents provided in the kit are ready to use. Before a new cartridge is loaded onto the Analyser, the magnetic particle container requires mixing by the operator with a brisk rotation motion. This will resuspend the magnetic particles that have settled during shipment. It is very important to avoid any foam formation.

Shelf Life and Storage of Reagents

Prior to first use, store the cartridge and the calibrators in an **upright** position in the dark at 2 to 8 °C. Do not freeze the cartridge or the calibrators.

Reagent shelf life	Cartridge	Calibrators
Before opening at 2 - 8 °C	To the expiry date	
After opening at 2 - 8 °C	14 Days	To the expiry date
On board the Analyser (*)	7 Days	3 hours

(*) Continuous on board stability.

REF IS-2700 	IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D (25OHD)	
Instructions for Use	IN VITRO DIAGNOSTIC	

Sample Collection and Storage

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin, ammonium heparin or sodium citrate) samples. Samples should be separated as soon as possible after collection. EDTA plasma cannot be used with the IDS-iSYS 25OHD assay. Store samples at -20 °C. Avoid repeated freeze-thaw of samples.

Samples containing particulate matter must be centrifuged before performing the assay.

Do not use heat-inactivated samples.

To minimise possible evaporation effects, samples, calibrators, and controls should be measured within 3 hours after being placed on the analyser.

Before assay, make sure that samples, calibrators and controls are at room temperature (20-25 °C).

Note: Some sample collection tubes that are commercially available might affect the results of testing in particular cases.

It is recommended to follow the instructions of the tube manufacturer especially when processing samples in primary tubes.

Procedure

Materials Provided

Reagent Cartridge

MPV1

Magnetic particles coated with 25OHD in phosphate buffer containing methanol (>3 % but <10 %) with sodium azide as preservative (<0.1 %), 1 bottle, 2.6 mL.

CONJ

Anti-25OHD sheep polyclonal antibody labelled with an acridinium ester derivative, in buffer containing bovine, sheep, rabbit and mouse proteins with sodium azide as preservative (<0.1 %), 1 bottle, 7.1 mL.

NaOH

Sodium hydroxide solution (<0.5 M), 1 bottle, 5.2 mL.

BUF

Assay buffer containing proprietary displacing compounds, methanol (>10 % but <20 %) and sodium azide as preservative (<0.1 %), 1 bottle, 26 mL.

Calibrators

CAL A
CAL B

Horse serum / buffer matrix containing 25OHD and sodium azide as preservative (<0.1 %), 1 each of 2 concentration levels, 2.5 mL.

Mini CD

Contains IFU for IDS-iSYS reagents, control ranges and CRY files.

Materials Required But Not Provided

IDS-iSYS Multi-Discipline Automated Analyser : IS-310400

IDS-iSYS 25OHD Control Set: IS-2730, 3 x 2.5 mL each of level 1, 2, and 3.

IDS-iSYS Cuvettes Cube: IS-CC100, box of 960 cuvettes.

IDS-iSYS System Liquid: IS-CS100, 5 L container, ready to use.

IDS-iSYS Wash Solution: IS-CW100, 10 L container, ready to use.

IDS-iSYS Triggers Set A and B: IS-CT100, 2 x 250 mL per bottle, ready to use.

IDS-iSYS Cartridge Check System: IS-6010, ready to use.

IDS-iSYS Sample Cups (500 µL): IS-SC105.

Assay Procedure

Reagent Cartridge

The reagents provided in the cartridge are ready to use. The analyser automatically performs the mixing of magnetic particles to maintain homogeneity. Before a new cartridge is loaded on board the analyser, mix the magnetic particles container by brisk rotation motion. Avoid foam formation.

The barcode is read when the cartridge is loaded on the reagent tray. If the label cannot be read by the analyser barcode reader, a manual procedure exists to enter the barcode data (see the IDS-iSYS User Manual).

Load the cartridge on the reagent tray and wait for at least 40 minutes before starting the assay.

If the cartridge is removed from the reagent tray, store the cartridge vertically at 2 – 8 °C in the dark.

Calibrators

The 25OHD calibrators are ready to use. Leave the calibrators at room temperature for 10 minutes and gently mix the bottles by hand. Avoid formation of foam. Pipette approximately 200 µL of calibrators into sample cups and place on the machine. Discard the material in the sample cups after use. DO NOT return material to the calibrator bottle.

Analyser Calibration

The two 25OHD calibrators are required to perform the adjustment of the master curve. The calibrators are supplied with the kit and calibrators from another lot must not be used.

Note that to perform a master curve adjustment controls MUST be run at the same time as the calibrators.

All data required for the calibration of the cartridge batch can be found on the mini CD. Use calibrator levels A and B to adjust the master curve to the reagents on board the Analyser. Check for the presence of a 25OHD cartridge on the reagent tray and the availability of the cartridge master curve in the database. If the data for the lot of calibrators is not available on board the analyser, load the data using the mini CD provided with the calibrator.

Start the immunoassay calibration on the IDS-iSYS Analyser according to the IDS-iSYS User Manual. The calibration is carried out in triplicate. RLU CVs of > 7 % will result in a failed calibration. One replicate may be removed to meet the calibration requirements. As stated above, please note that controls must also be run. Verify and approve the calibration according to the calibration status displayed in the calibration windows and discard the calibrator from the sample tray after use.

REF IS-2700 	IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D (25OHD) 
Instructions for Use	IN VITRO DIAGNOSTIC 

Calibration

There is currently no certified standard reference materials or agreed reference measurement method for 25-hydroxy-vitamin D.

IDS-iSYS 25-Hydroxyvitamin D Assay standardisation is traceable to U.V. quantification. Calibration was verified by comparison to a published ID-LC-MS/MS method².

Calibration Frequency

A new calibration is required:

- Each time a new lot of cartridges is loaded on board.
- Each time a new lot of trigger or cuvettes is used.
- When the control values do not fall within the defined ranges.
- When the calibration interval of 7 days has expired.
- After Analyser service.

Verification of the calibration is automatic and managed by the Analyser.

Quality Control

Use the IDS-iSYS 25OHD Control Set for quality control. To ensure validity of results at least three controls with varying levels of 25OHD should be measured. Other suitable control material can be used in addition to the IDS-iSYS 25OHD Control Set. Controls should be tested at (or near) the beginning of every run containing patient samples and also during calibrations or according to local regulations. It is recommended that the controls be routinely run in duplicate. Laboratories should test controls at least once per shift.

Refer to the IDS-iSYS 25OHD Control Set IFU for preparation and handling instructions.

Determination of Sample 25OHD levels

Process samples according to the IDS-iSYS User Manual.

Calculation of Results

The 25OHD concentration of each sample is calculated automatically. The display of the concentrations (screen or printed) is produced upon user request.

The IDS-iSYS 25OHD Assay uses a 4-parameter logistic curve fit (4PL) to calculate the 25OHD concentrations.

Conversion of Units:

$$\begin{array}{l}
 X \text{ ng/mL} \quad \times 2.5 \Rightarrow \quad Y \text{ nmol/L} \\
 \leftarrow \times 0.40
 \end{array}$$

Measurement Range (Reportable Range)

The reportable range of the assay is 5-140 ng/mL. Any value that reads below 5 ng/mL should be reported as "< 5 ng/mL".

Dilution

Samples with 25OHD concentrations above the reportable range should be diluted manually with a low concentration human serum sample in a ratio of 1 in 2. The results for diluted samples must be multiplied by the dilution factor 2 and corrected for the concentration of the low sample.

Limitations of Use

1. As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
2. The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
3. The following substances do not interfere in the IDS-iSYS 25OHD Assay when the concentrations presented in the following table are below the stated threshold.

Potentially Interfering Agent	Threshold Concentration
Lipid	2803 mg/dL
Bilirubin	20 mg/dL
Haemoglobin*	25 mg/dL
Biotin	300 nmol/L

*Samples showing visible signs of haemolysis may cause interference.

Haemoglobin concentrations >25 mg/dL may lead to lowered results.

Expected Values

Each laboratory should determine ranges for their local population.

There is no universal agreement on the optimal concentration of 25OHD. Ranges should be based on clinical decision values that apply to both sexes of all ages rather than population based reference ranges for 25OHD. To that end, a large study examined the relationship of intact PTH with vitamin D levels in serum. A plateau for iPTH was seen at ~30 ng/mL⁶. Similarly, Calcium (Ca) absorption increased with increasing 25OHD level until ~30 ng/mL 25OHD was reached. Optimal Ca absorption requires levels of 25OHD exceeding 30 ng/mL⁷.

In the case of 25OHD, there are also many other factors that may influence values: diet, time of day, sun exposure, season of year⁸, geographic location⁹, age¹⁰, use of sunscreen and/or protective clothing^{11,12} and skin pigmentation¹³. Thus, sampling a group of apparently healthy individuals is not the ideal way to establish the reference range.

The US National Osteoporosis Foundation recommends a level >30 ng/mL to protect bone health¹⁴. Similarly, the US National Kidney Foundation considers levels <30 ng/mL to be insufficient or deficient¹⁵.

From a review of the available literature, the recommendations for 25OHD levels are:

Level	Range (ng/mL)
Deficient	<10
Insufficient	10-29
Sufficient	30-100
Potential Intoxication	>100

The following range was determined using the IDS-iSYS 25OHD Assay and is provided for information only. The 95% reference interval for normal adults, collected from 272 apparently healthy adults, was calculated by a non-parametric method following the NCCLS guideline C28-A2, "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

Normal Adults 5.9 - 64.9 ng/mL (n=272)

REF IS-2700 	IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D (25OHD)	 CE
Instructions for Use	<i>IN VITRO DIAGNOSTIC</i>	

Performance Data

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

Sensitivity

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, "Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation" using 60 blanks and 96 low level samples.

LoB	1.8 ng/mL
LoD	3.6 ng/mL
LoQ	5.5 ng/mL

Precision

Precision was evaluated in accordance with a modified protocol based on CLSI EP-5A2, "Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods". Three serum controls were assayed using three lots of reagents in quadruplicate once per day for 20 days on two instruments.

Control	n	mean (ng/mL)	Within-run		Total	
			SD	CV%	SD	CV%
1	80	6.7	0.8	12.1	1.1	16.9
2	80	25.8	1.4	5.5	2.7	10.4
3	80	74.2	5.4	7.3	6.6	8.9

Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-6A, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach". Samples containing varying concentrations of 25-hydroxyvitamin D were assayed in duplicate. The resulting mean concentrations were compared to predicted concentrations. Samples were prepared by diluting a high patient sample with a low patient sample prior to assay.

Predicted Concentration (ng/mL)	Measured Concentration (ng/mL)	Variation	
		(ng/mL)	%
6.2	6.1	-0.1	-2
26.2	24.6	-1.6	-6
46.3	47.7	1.4	5
66.3	70.0	3.7	6
86.3	84.0	-2.3	-3
106.4	103.1	-3.2	-3
126.4	128.6	2.2	2
	>140		

Method Comparison

1) The IDS-iSYS 25OHD Assay was compared against a recognised radioimmunoassay for the quantitative determination of 25OHD, following CLSI EP-9A2, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 272 samples, selected to represent a wide range of 25OHD concentrations [7.6-62.6 ng/mL], was assayed by each method. Linear regression analysis was performed on the comparative data:

IDS-iSYS = 1.16 RIA - 3.04 (95 % CI of the slope and intercept were 1.11 to 1.22, and -4.45 to -1.64, respectively); correlation coefficient (r) = 0.87.

2) The IDS-iSYS 25OHD Assay was compared against a published ID-LC-MS/MS method⁵ (x) for the quantitative determination of 25OHD. A total of 50 samples, selected to represent a wide range of 25OHD concentrations [5.7-73.1 ng/mL], was assayed by each method. Linear regression analysis was performed on the comparative data:

IDS-iSYS = 1.14 (x) - 2.14 (95 % CI of the slope and intercept were 1.06 to 1.23, and -4.19 to -0.09, respectively); correlation coefficient (r) = 0.97.

Specificity

The specificity was assessed with the following analytes at 50% binding of B₀.

Analyte	Cross-Reactivity
25-hydroxyvitamin D ₃	100%
25-hydroxyvitamin D ₂	100%
24,25-dihydroxyvitamin D ₃	≥100%
Cholecalciferol (D ₃)	2.7%
Ergocalciferol (D ₂)	2.7%

Bibliography

- Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004;79: 362-371.
- Dusso AS. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289(1): F8-28.
- Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N. Engl. J. Med* 1989;320: 981-991.
- Holick MF. Vitamin D: Photobiology, Metabolism, etc., In "Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism", American Society for Bone and Mineral Research 1996; 3rd Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 74-81.
- Maunsell Z, Wright DJ, Rainbow SJ. Routine isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D₂ and D₃. *Clin Chem*. 2005 Sep;51(9):1683-90.
- Chapuy M-C, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997;7: 439-443.
- Heaney, RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr* 2004;80 (suppl):1706S-1709S.
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1678S - 1688S.
- Webb AR, Kline L, Holick MF. Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67: 373-378.
- Holick MF, Matsuoka LY, Wortsman J. Age, vitamin D and solar ultraviolet. *Lancet* 1989;ii:1104-1105.
- Matsuoka LY, Ide L, Wortsman J et al. Sunscreens suppress cutaneous vitamin D₃ synthesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64: 1165-1168.
- Salih FM. Effect of clothing varieties on solar photosynthesis of previtamin D₃: an in vitro study.

REF IS-2700 	IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D (25OHD)	
Instructions for Use	IN VITRO DIAGNOSTIC	CE

- Photodermatol Photoimmunol Photomed 2004;20: 53-58.
13. Clemens TL, Henderson SL, Adams JS, Holick MF. Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesize vitamin D₃. Lancet 1982;9: 74-76.
 14. National Osteoporosis Foundation. Prevention – Vitamin D.
<http://www.nof.org/prevention/vitaminD.htm>
 15. KDOQI Clinical Practice Guidelines for Bone Metabolism and Disease in Children With Chronic Kidney Disease.
http://www.kidney.org/PROFESSIONALS/kdoqi/guidelines_pedbone/guide8.htm

 Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd), 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear, NE35 9PD, England
 Tel.: +44 191 519 0660 • Fax: +44 191 519 0760
 e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com

Immunodiagnostic Systems

UK Immunodiagnostic Systems Ltd (IDS Ltd),
 10 Didcot Way, Boldon Business Park, Boldon, Tyne & Wear,
 NE35 9PD, England
 Tel.: +44 191 519 0660 • Fax: +44 191 519 0760
 e-mail: info.uk@idsplc.com • www.idsplc.com

USA Immunodiagnostic Systems Inc (IDS Inc.),
 P.O. Box 17063, Fountain Hills, AZ 85269-7063, USA
 Tel.: 1 480 836 7435 • Fax: 1 480-836-7437
 e-mail: info.us@idsplc.com • www.idsplc.com

Germany Immunodiagnostic Systems GmbH (IDS GmbH),
 Mainzer Landstrasse 49, 60329 Frankfurt am Main, Germany
 Tel.: +49 69 3085-5025 • Fax: +49 69 3085-5125
 e-mail: info.de@idsplc.com • www.idsplc.com

France Immunodiagnostic Systems France S.A.,
 153 Avenue d'Italie, 75013 PARIS, France
 Tel.: +33 1 40 77 04 70 • Fax: +33 1 40 77 04 77
 e-mail: info.fr@idsplc.com • www.idsplc.com

Scandinavia Immunodiagnostic Systems Nordic a/s (IDS
 Nordic a/s), Marielundvej 30, 2. Sal, 2730 Herlev, Denmark
 Tel.: +45 44 84 0091
 e-mail: info.nordic@idsplc.com • www.idsplc.com

Belgium Immunodiagnostic Systems S.A.,
 Rue E. Solvay 101, 4000 Liège, Belgium
 Tel.: +32 4 252 26 36, Fax : +32 4 252 51 96
 e-mail: info.be@idsplc.com • www.idsplc.com

SIEMENS



ADVIA Centaur®
ADVIA Centaur® XP
 Immunoassay Systems

Vitamin D Total (VitD)

Revisión y fecha actual	Rev. C, 2012-08	
Nombre del producto	Ensayo ADVIA Centaur® VitD (100 pruebas)	REF 10491994
	Ensayo ADVIA Centaur VitD (500 pruebas)	REF 10631021
Materiales necesarios pero no suministrados	Calibrador para ADVIA Centaur VitD, 2 cartuchos	REF 10493589
	Calibrador para ADVIA Centaur VitD, 6 cartuchos	REF 10630911
	Control de calidad para ADVIA Centaur VitD, 3 cartuchos	REF 10632229
	Diluyente para ADVIA Centaur VitD, 2 cartuchos	REF 10494100
Tipo de muestra	Diluyente para ADVIA Centaur VitD, 1 botella	REF 10632114
	Suero y plasma humanos (con EDTA, heparina de litio, heparina de sodio)	
Volumen de la muestra	20 µl	
Rango del ensayo	4,2–150 ng/ml (10,5–375 nmol/l)	

Uso previsto

El ensayo ADVIA Centaur Vitamin D Total (VitD) es una prueba de diagnóstico *in vitro* para la determinación cuantitativa de 25 (OH) vitamina D total en suero y plasma (con EDTA, heparina de litio, heparina de sodio) humanos utilizando los sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP. El ensayo ADVIA Centaur VitD está diseñado para su uso como ayuda en la determinación de suficiencia de vitamina D.

Resumen y explicación de la prueba

La vitamina D es una hormona esteroidea que participa en la absorción intestinal del calcio y en la regulación de la homeostasis del calcio. La vitamina D es esencial para la formación y el mantenimiento de huesos sanos y fuertes.

La deficiencia de vitamina D puede ser consecuencia de una falta de exposición al sol, ingesta alimentaria inapropiada, disminución de la absorción, metabolismo anormal o resistencia a la vitamina D¹. Recientemente, muchas enfermedades crónicas como el cáncer^{2,3,4}, la presión sanguínea alta⁵, la osteoporosis^{6,7} y diversas enfermedades autoinmunes^{9,10} se han asociado a la deficiencia de vitamina D. Ya sea consumida o producida, ambas formas de vitamina D (D₂ y D₃) se metabolizan en el hígado a 25(OH)D, y después se convierten en el hígado o en el riñón en 1,25-dihidroxitamina D¹¹. Los metabolitos de vitamina D se unen a una proteína transportadora en el plasma y se distribuyen por todo el cuerpo. El indicador clínico más fiable del estado de la vitamina D es la 25(OH)D, ya que los niveles de 25(OH)D en suero y plasma reflejan los niveles de vitamina D almacenados en el organismo, y la 25(OH)D está relacionada con los síntomas clínicos de la deficiencia de vitamina D¹².

VitD

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

Principios del análisis

El ensayo ADVIA Centaur VitD es un inmunoensayo competitivo de anticuerpos de un paso de 18 minutos que utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón anti-fluoresceína unido de forma covalente a partículas paramagnéticas (PMP), un anticuerpo monoclonal de ratón anti-25(OH) vitamina D marcado con éster de acridinio (AE) y un análogo de la vitamina D marcado con fluoresceína.

Existe una relación inversa entre la cantidad de vitamina D presente en la muestra del paciente y la cantidad de unidades relativas de luz (RLU) detectadas por el sistema.

Reactivos

Reactivo	Descripción	Conservación	Estabilidad
Cartucho de reactivo primario ReadyPack® para ADVIA Centaur VitD	Reactivo lite 5,0 ml/cartucho de reactivo: anticuerpo (monoclonal de ratón) anti-VitD marcado con éster de acridinio (~0,8 µg/ml) en tampón con seroalbúmina bovina, IgG murina y azida sódica (< 0,1%).	Conservar los reactivos en posición vertical a una temperatura de 2–8°C. Mantener protegidos los cartuchos de reactivos de toda fuente de luz y calor.	Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del cartucho. En el instrumento: 28 días.
Cartucho de reactivo primario ReadyPack para ADVIA Centaur VitD	Fase sólida 10,0 ml/cartucho de reactivo: partículas paramagnéticas (PMP) (~0,60 mg/ml) recubiertas con anticuerpo monoclonal de ratón anti-fluoresceína en tampón con seroalbúmina bovina, surfactante y azida sódica (< 0,1%).	Conservar los reactivos en posición vertical a una temperatura de 2–8°C. Mantener protegidos los cartuchos de reactivos de toda fuente de luz y calor.	Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del cartucho. En el instrumento: 28 días.
Cartucho de reactivo primario ReadyPack para ADVIA Centaur VitD	Reactivo del pocillo auxiliar 5,0 ml/cartucho de reactivo: análogo de la vitamina D conjugado con fluoresceína (~0,2 µg/ml) y ácido 1-anilinoftaleno-8-sulfónico en tampón con seroalbúmina bovina y azida sódica (< 0,1%).	Conservar los reactivos en posición vertical a una temperatura de 2–8°C. Mantener protegidos los cartuchos de reactivos de toda fuente de luz y calor.	Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del cartucho. En el instrumento: 28 días.
Cartucho de reactivo auxiliar ReadyPack para ADVIA Centaur VitD	Reactivo de cartucho auxiliar para VitD 25,0 ml/cartucho de reactivo: agente liberador en tampón salino con azida sódica (< 0,1%) y estabilizadores.	Conservar los reactivos en posición vertical a una temperatura de 2–8°C. Mantener protegidos los cartuchos de reactivos de toda fuente de luz y calor.	Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del cartucho. En el instrumento: 28 días.

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

VitD

Reactivo	Descripción	Conservación	Estabilidad
Cartucho de reactivo auxiliar diluyente para ADVIA Centaur VitD	Cartucho de reactivo auxiliar diluyente para VitD 25,0 ml/ cartucho de reactivo: tampón fosfato con BSA, colesterol y azida sódica (< 0,1%).	Almacenar los reactivos en posición vertical a una temperatura de 2–8°C. Mantener protegidos los cartuchos de reactivos de toda fuente de luz y calor.	Hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del cartucho o bien 28 días consecutivos tras la apertura del cartucho de reactivo auxiliar.
Solución de lavado 1 para ADVIA Centaur* 	1500 ml/cartucho solución salina tamponada con fosfato con azida sódica (< 0,1%) y surfactante.	Almacenar los reactivos en posición vertical a una temperatura de 2–25°C.	Hasta la fecha de caducidad indicada en el vial. Estabilidad en el instrumento– 1 mes.
Solución de lavado 1 para ADVIA Centaur* 	2500 ml/cartucho solución salina tamponada con fosfato con azida sódica (< 0,1%) y surfactante.	Almacenar los reactivos en posición vertical a una temperatura de 2–25°C.	Hasta la fecha de caducidad indicada en el vial. Estabilidad en el instrumento–1 mes.

* Consultar *Material necesario pero no suministrado*.

Nota Desechar los cartuchos de reactivos al finalizar el intervalo de estabilidad en el instrumento de 28 días. No usar los reactivos después de la fecha de caducidad.



Mantener protegidos los cartuchos de reactivos de toda fuente de luz y calor. Los cartuchos de reactivos cargados en el instrumento están protegidos de la luz. Conservar los cartuchos de reactivos no usados a una temperatura de 2 a 8°C protegidos de toda fuente de luz y calor.



Conservar los cartuchos de reactivos en posición vertical.

Advertencias y precauciones

Las fichas de datos de seguridad (MSDS/SDS) están disponibles en www.siemens.com/diagnostics.



PRECAUCIÓN

Este dispositivo contiene material de origen animal y debe manipularse como potencial portador y transmisor de enfermedades.

Nota Algunos componentes de este producto utilizan azida sódica como conservante. La azida sódica puede reaccionar con las tuberías de cobre o plomo y formar azidas metálicas explosivas. Cuando se eliminen los reactivos, enjuagar con agua abundante para evitar la acumulación de azidas. La eliminación a través de los sistemas de desagüe debe realizarse de acuerdo con la normativa vigente.

Desechar los materiales peligrosos y contaminados biológicamente de acuerdo con la normativa del centro. Desechar todos los materiales de forma segura y aceptable de acuerdo con la normativa vigente.

Para uso diagnóstico *in vitro*.

VitD

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

Preparación de los reactivos

Los reactivos son líquidos y están listos para el uso. Sacar todos los reactivos del refrigerador y mezclar todos los cartuchos de reactivos primarios manualmente antes de cargarlos en el sistema. Inspeccionar visualmente el fondo del cartucho de reactivo para asegurarse de que todas las partículas se hayan dispersado y se encuentren en suspensión. Para obtener información detallada sobre cómo preparar los reactivos para su uso, consultar el manual del usuario del sistema.

Asegurarse de que el sistema tenga suficientes cartuchos de reactivos primarios y auxiliares. Cargar los cartuchos de reactivos primarios en el área de reactivos primarios. Las flechas en la etiqueta del extremo se pueden usar como guía para la colocación. El sistema mezcla automáticamente los cartuchos de reactivos primarios para mantener la suspensión homogénea de los reactivos. Cargar el cartucho de reactivo auxiliar en la entrada de reactivos auxiliares. Para obtener información detallada sobre la carga de reactivos, consultar las instrucciones de funcionamiento del sistema o el sistema de ayuda en pantalla.

Para obtener información detallada sobre la preparación del sistema, consultar las instrucciones de funcionamiento del sistema o el sistema de ayuda en pantalla.

Recogida y manipulación de las muestras

El instituto estadounidense sobre normas de laboratorio Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ha elaborado las siguientes recomendaciones para la manipulación y el almacenamiento de muestras de sangre¹³:

Recogida de muestras

- Todas las muestras de sangre deben recolectarse de acuerdo con las precauciones universales de venopunción. Todas las muestras deben manipularse como si pudieran transmitir enfermedades.
- Para este ensayo se recomienda utilizar muestras de suero y plasma (con EDTA, heparina de litio, heparina de sodio) humanos.
- Dejar que las muestras coagulen adecuadamente antes de la centrifugación.
- Mantener los tubos tapados y en posición vertical en todo momento.
- Una vez recogidas las muestras, éstas deben analizarse lo antes posible.
- No deben utilizarse muestras que hayan estado almacenadas a temperatura ambiente durante más de 24 horas.
- No utilizar muestras con contaminación microbiana evidente.

Conservación de las muestras

- Si el ensayo no se completa en el transcurso de 24 horas, tapar bien las muestras y refrigerarlas a una temperatura entre 2 y 8°C durante un máximo de 7 días. Las muestras pueden almacenarse en el coágulo hasta 6 días¹⁴.
- Si las muestras no se analizan en el transcurso de 7 días, congelarlas a una temperatura inferior o igual a -20°C¹⁴.
- Las muestras pueden congelarse hasta 4 veces y deben mezclarse perfectamente después de descongelarlas¹⁴.
- No almacenar las muestras en congeladores con mecanismo antiescarcha.

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

VitD

Procedimiento

Materiales suministrados

REF	Contenido	Número de pruebas
10491994	1 cartucho de reactivo primario ReadyPack que contiene reactivo lite, fase sólida y reactivo del pocillo auxiliar para ADVIA Centaur VitD 1 cartucho auxiliar ReadyPack que contiene reactivo auxiliar para ADVIA Centaur VitD Tarjeta de curva maestra para ADVIA Centaur VitD	100
10631021	5 cartuchos de reactivo primario ReadyPack que contienen reactivo lite, fase sólida y reactivo del pocillo auxiliar para ADVIA Centaur VitD 5 cartuchos auxiliares ReadyPack que contienen reactivo auxiliar para ADVIA Centaur VitD Tarjeta de curva maestra para ADVIA Centaur VitD	500

Material necesario pero no suministrado

Elemento	Descripción					
REF 10493589	Calibrador para ADVIA Centaur VitD, 2 cartuchos	2 viales de calibrador bajo <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>L</td></tr></table> 2 viales de calibrador alto <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>H</td></tr></table>	CAL	L	CAL	H
CAL	L					
CAL	H					
REF 10630911	Calibrador para ADVIA Centaur VitD, 6 cartuchos	6 viales de calibrador bajo <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>L</td></tr></table> 6 viales de calibrador alto <table border="1"><tr><td>CAL</td><td>H</td></tr></table>	CAL	L	CAL	H
CAL	L					
CAL	H					
REF 10632229	Control para ADVIA Centaur VitD, 3 cartuchos	3 viales de control 1 <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>1</td></tr></table> 3 viales de control 2 <table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>2</td></tr></table>	CONTROL	1	CONTROL	2
CONTROL	1					
CONTROL	2					
REF 10494100	Diluyente para ADVIA Centaur VitD	2 cartuchos de reactivo auxiliar que contienen diluyente <table border="1"><tr><td>VITD</td><td>DIL</td></tr></table>	VITD	DIL		
VITD	DIL					
REF 10632114	Diluyente para ADVIA Centaur VitD	1 botella que contiene 25 ml <table border="1"><tr><td>VITD</td><td>DIL</td></tr></table>	VITD	DIL		
VITD	DIL					
01137199 (112351)	Solución de lavado 1 para ADVIA Centaur <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>1</td></tr></table>	WASH	1	2 x 1500 ml/cartucho		
WASH	1					
o bien						
03773025	Solución de lavado 1 para ADVIA Centaur <table border="1"><tr><td>WASH</td><td>1</td></tr></table>	WASH	1	2 x 2500 ml/cartucho		
WASH	1					

Procedimiento del ensayo

Para obtener instrucciones sobre cómo realizar el procedimiento, consultar las instrucciones de funcionamiento del sistema o el sistema de ayuda en pantalla.

Antes de colocarlas en el sistema, asegurarse de que las muestras tengan las características siguientes:

- Las muestras no contienen fibrina ni otro tipo de partículas. Retirar la materia en partículas mediante centrifugación a 1000 x g durante un periodo de 10 a 15 minutos.
- Las muestras no tienen burbujas.

VitD

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

Este ensayo requiere 20 µl de muestra para una determinación única. Este volumen no incluye el volumen muerto del contenedor de muestras ni el volumen adicional que se requiere cuando se realizan múltiples réplicas u otras pruebas en la misma muestra. Para obtener información detallada acerca de la determinación del volumen mínimo requerido, consultar *Requisitos de los volúmenes de las muestras* en las instrucciones de funcionamiento del sistema o el sistema de ayuda en pantalla.

Los sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP realizan automáticamente los pasos siguientes:

1. Dispensa 20 µl de la muestra en una cubeta y la incuba durante 15 segundos.
2. Dispensa 200 µl de reactivo de cartucho auxiliar e incuba la solución durante 4,5 minutos a 37°C.
3. Dispensa 50 µl de reactivo lite e incuba la solución durante 5,5 minutos a 37°C.
4. Dispensa 100 µl de reactivo de fase sólida y 50 µl de reactivo del pocillo auxiliar, e incuba la mezcla durante 2,75 minutos a 37°C.
5. Separa la fase sólida de la mezcla y aspira el reactivo no unido.
6. Lava la cubeta con solución de lavado 1.
7. Dispensa 300 µl de reactivo ácido y 300 µl de reactivo base para iniciar la reacción de quimioluminiscencia.

Los sistemas ADVIA Centaur presentan los resultados obtenidos de acuerdo con la opción seleccionada, tal y como se describe en las instrucciones de funcionamiento del sistema o en el sistema de ayuda en pantalla.

Calibración del ensayo

El ensayo ADVIA Centaur VitD requiere una calibración de la curva maestra cuando se utiliza un nuevo número de lote de reactivo. Utilizar el lector de códigos de barras o el teclado para introducir en el sistema los valores de la curva maestra cada vez que se use un número de lote nuevo de reactivo lite y fase sólida. La tarjeta de curva maestra contiene los valores de la curva maestra. Para obtener información detallada sobre la introducción de valores de curva maestra, consultar las instrucciones de funcionamiento del sistema o el sistema de ayuda en pantalla.

Calibrar el ensayo al final de los 28 días del intervalo de calibración. Además, este ensayo requiere una calibración a dos puntos cuando:

- Cambien los números de lote de los cartuchos de reactivos primarios.
- Se sustituyan componentes del sistema.
- Los resultados del control de calidad estén repetidamente fuera de rango.

Para obtener información detallada sobre la introducción de valores de calibración, consultar las instrucciones de funcionamiento del sistema o el sistema de ayuda en pantalla.

Uso de las etiquetas de código de barras

Las etiquetas de código de barras del calibrador corresponden a un número de lote específico. No utilizar las etiquetas de código de barras de un determinado lote de calibradores con ningún otro lote de calibradores.

Al realizar los ensayos ADVIA Centaur VitD, utilizar las etiquetas de código de barras del calibrador para ADVIA Centaur VitD para identificar las copas de muestras de los calibradores alto y bajo. Colocar la etiqueta de código de barras sobre la copa de muestras de manera que los caracteres legibles del lateral de la etiqueta queden en posición vertical sobre la copa de muestras.

Realización de una calibración

Cada lote de calibradores contiene una tarjeta de valores asignados del calibrador para facilitar la introducción de los valores de calibración en el sistema. Introducir los valores por medio del lector de código de barras o el teclado.

Realizar el procedimiento de calibración mediante los pasos siguientes:

Nota Este procedimiento utiliza suficiente volumen de calibrador para medir cada calibrador por duplicado.

1. Programar los calibradores de acuerdo con la lista de trabajo.
2. Etiquetar 2 copas de muestras con etiquetas de código de barras de calibrador: una para el bajo y otra para el alto.
3. Mezclar suavemente los calibradores alto y bajo y dispensar al menos 0,5 ml en las copas de muestras correspondientes.
4. Cargar las copas de muestras en un soporte.
5. Colocar el soporte en la cadena de entrada de muestras.
6. Asegurarse de que estén cargados el ensayo y los reactivos auxiliares.
7. Iniciar la cadena de entrada si es necesario.

Nota Desechar todo resto de calibrador que permanezca en las copas de muestras más de 10 horas. No rellenar las copas de muestras cuando se agote el contenido; si es necesario, dispensar calibradores sin usar.

Realización del control de calidad

Seguir la normativa vigente o los requisitos de acreditación con respecto a la frecuencia del control de calidad.

Para supervisar el funcionamiento y los gráficos de tendencias del sistema, como requerimiento mínimo, deben ensayarse 2 niveles de material de control de calidad cada día que se analicen muestras. También deben analizarse muestras de control de calidad cuando se lleve a cabo una calibración a dos puntos. Tratar todas las muestras para control de calidad como si se tratase de muestras de pacientes.

Para el control de calidad del ensayo ADVIA Centaur VitD, utilizar material de control de calidad para ADVIA Centaur VitD. Consultar la tarjeta de valores esperados para ver los valores esperados sugeridos específicos para el número de lote de los controles.

Para obtener información detallada sobre la introducción de valores de control de calidad, consultar las instrucciones de funcionamiento del sistema o el sistema de ayuda en pantalla.

Uso de las etiquetas de código de barras

Las etiquetas de código de barras del control corresponden a un número de lote específico. No utilizar etiquetas de código de barras de un lote de controles con otros lotes de controles.

Al realizar el ensayo ADVIA Centaur VitD, utilizar las etiquetas de código de barras de material de control de calidad para ADVIA Centaur VitD para identificar las copas de muestras negativa y positiva. Colocar la etiqueta de código de barras sobre la copa de muestras de manera que los caracteres legibles del lateral de la etiqueta queden en posición vertical sobre la copa de muestras.

VitD

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

Realizar el procedimiento de control de calidad mediante los pasos siguientes:

Nota Este procedimiento utiliza suficiente volumen de control para medir cada control por duplicado.

1. Programar las muestras de control de calidad en la lista de trabajo.
2. Etiquetar 2 copas de muestras con etiquetas de código de barras de calibrador: una para el control positivo y otra para el negativo.
3. Mezclar suavemente los materiales de control de calidad y dispensar al menos 250 µl en las copas de muestras correspondientes.
4. Cargar las copas de muestras en un soporte.
5. Colocar el soporte en la cadena de entrada de muestras.
6. Asegurarse de que estén cargados los reactivos del ensayo.
7. Iniciar la cadena de entrada si es necesario.

Nota Desechar todo material de control de calidad que permanezca en las copas de muestras más de 10 horas. No rellenar las copas de muestras cuando se agote el contenido; si es necesario, dispensar materiales de control de calidad sin usar.

Aplicación de medidas correctoras

Si los resultados del control de calidad no están dentro de los valores esperados o de los valores establecidos del laboratorio, no informar los resultados. Realizar las acciones siguientes:

1. Determinar y corregir la causa de los resultados de control inaceptables:
 - a. Verificar que los materiales no hayan caducado.
 - b. Verificar que se haya llevado a cabo el mantenimiento requerido.
 - c. Asegurarse de que el ensayo se haya realizado de acuerdo con las instrucciones de uso.
 - d. Repetir el ensayo con muestras de control de calidad nuevas, y verificar que los resultados de control de calidad se encuentren dentro de los límites aceptables antes de procesar las muestras de los pacientes.
 - e. Si los resultados de control de calidad no se encuentran dentro de los límites aceptables, volver a calibrar el ensayo y repetir el paso d.
 - f. Si es necesario, ponerse en contacto con el proveedor local de asistencia técnica.
2. Repetir el análisis de las muestras de pacientes antes de informar los resultados.

Realizar las acciones correctoras de acuerdo con el protocolo de laboratorio establecido.

Resultados

Los resultados deben interpretarse siempre en combinación con la anamnesis del paciente, su evaluación clínica y otras pruebas diagnósticas.

El sistema presenta los resultados de VitD en suero en ng/ml (unidades comunes) o nmol/l (unidades SI), dependiendo de las unidades que se definan al configurar el ensayo. La fórmula de conversión es: 1 ng/ml = 2,5 nmol/l.

Para obtener información detallada sobre cómo calcula el sistema los resultados, consultar las instrucciones de funcionamiento del sistema o el sistema de ayuda en pantalla.

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

VitD

Diluciones

Las muestras de suero con niveles de vitamina D superiores a 150 ng/ml (375 nmol/l) deben diluirse y volver a analizarse para obtener resultados precisos. Diluir manualmente las muestras del paciente con Diluyente para ADVIA Centaur Vitamin D y, a continuación, cargar la muestra diluida en el soporte de muestras, reemplazando la muestra no diluida. La dilución recomendada es 1:2.

Asegurarse de que los resultados se corrijan matemáticamente con respecto a la dilución. Si se introduce un factor de dilución al programar la prueba, el sistema calculará automáticamente el resultado.

Limitaciones

Los anticuerpos heterófilos del suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas del reactivo e interferir en los inmunoensayos *in vitro*¹⁵. Los pacientes que están expuestos habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y podrían observarse resultados anormales. Puede ser necesaria información adicional para efectuar un diagnóstico.

No usar muestras hemolizadas. La hemoglobina a concentraciones ≥ 155 mg/dl generará resultados reducidos falsos.

Valores esperados

Según una revisión de la literatura disponible^{1,16,17,18}, las recomendaciones para los niveles de 25(OH)D son:

Estado de vitamina D	Rango
Deficiencia	< 20 ng/ml (50 nmol/l)
Insuficiencia	20–30 ng/ml (50–75 nmol/l)
Suficiencia	30–100 ng/ml (75–250 nmol/l)
Toxicidad	> 100 ng/ml (250 nmol/l)

Los datos del ensayo ADVIA Centaur VitD se obtuvieron a partir de muestras de 542 adultos: 258 adultos que no ingerían suplementos con vitamina D y 284 adultos que ingerían suplementos con vitamina D. Las muestras se recogieron en distintas estaciones del año y en diversas regiones geográficas de Estados Unidos. Las muestras con valores anormales de PTH, calcio, magnesio, fósforo y TSH se excluyeron de este estudio. Sobre la base del intervalo de confianza del 95%, se establecieron los siguientes valores de acuerdo con el protocolo C28-A2 del CLSI¹⁹.

Se obtuvieron los siguientes valores:

Valores observados	
Mediana de 25 OH Vitamina D	21,1 ng/ml (52,8 nmol/l)
Rango observado del percentil 2,5 a 97,5	10,6–43,4 ng/ml (26,5–108,5 nmol/l)

Al igual que en todos los ensayos de diagnóstico *in vitro*, cada laboratorio debe determinar sus propios rangos de referencia para la evaluación diagnóstica de las muestras de los pacientes¹⁹.

VitD

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

Características de la prueba**Rango de ensayo**

El ensayo ADVIA Centaur VitD mide la 25(OH) vitamina D en concentraciones de 4,2 a 150 ng/ml (10,5 a 375 nmol/l).

Especificidad

El ensayo ADVIA Centaur VitD Total presenta una elevada especificidad para la 25(OH) vitamina D₂ y la 25(OH) vitamina D₃. Los compuestos siguientes se analizaron con concentraciones de 25(OH) vitamina D total de 35 y 115 ng/ml. El cambio porcentual se calcula como:

$$\text{Porcentaje de reactividad cruzada} = \left(\frac{\text{valor del ensayo corregido}}{\text{cantidad de compuesto inoculado}} \right) \times 100$$

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Compuesto	Concentración (ng/ml)	Reactividad cruzada (%)
1, 25 (OH) ₂ Vitamina D ₂	100	4,0
1, 25 (OH) ₂ Vitamina D ₃	100	1,0
25 OH Vitamina D ₂	30	104,5
25 OH Vitamina D ₃	30	100,7
Paricalcitol	24	0,1
3-epi-25-OH Vitamina D ₃	100	1,1
Vitamina D ₂	1000	0,5
Vitamina D ₃	1000	0,3

Sensibilidad

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron tal como se describe en el documento EP17-A²⁰ del CLSI. El ensayo ADVIA Centaur VitD presenta un LoB de 1,7 ng/ml (4,3 nmol/l), un LoD de 3,20 ng/ml (8,0 nmol/l) y un LoQ de 4,2 ng/ml (10,5 nmol/l). El LoD se define como la concentración más baja de 25(OH) vitamina D que se puede detectar con una probabilidad del 95%.

La sensibilidad funcional del ensayo ADVIA Centaur VitD es 3,33 ng/ml (8,33 nmol/l). La sensibilidad funcional se determinó utilizando múltiples muestras con concentraciones dentro del rango de 2 a 10 ng/ml (5 a 25 nmol/l). Todas las muestras se analizaron en 4 repeticiones dos veces al día durante 10 días utilizando 2 lotes (n = 320 para cada muestra) de reactivos para el ensayo ADVIA Centaur VitD.

Linealidad

La linealidad se evaluó conforme al protocolo EP6-A²¹ del CLSI. Una muestra que contenía niveles elevados de 25(OH) vitamina D total se mezcló en varias proporciones con una muestra que contenía niveles bajos de 25(OH) vitamina D total. Las mezclas de muestras resultantes se analizaron para detectar la vitamina D total. En el sistema ADVIA Centaur, el ensayo VitD es lineal de 4,2 a 150 ng/ml.

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

VitD

Precisión

La precisión se evaluó conforme al protocolo EP5-A2²² del CLSI. Seis muestras se analizaron en 4 repeticiones dos veces al día durante 20 días (n = 160 repeticiones por muestra) utilizando el ensayo ADVIA Centaur VitD. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Media (ng/ml)	Dentro de la serie		Total	
	DE	CV (%)	DE	CV (%)
11,7	0,81	7,0	1,30	11,1
18,0	1,20	6,6	1,74	9,6
32,4	1,87	5,8	3,17	9,8
49,9	2,22	4,5	4,07	8,2
55,8	2,66	4,8	4,38	7,8
132,1	3,53	2,7	6,33	4,8

Comparación de la recogida de muestras

El ensayo ADVIA Centaur VitD se evaluó utilizando diferentes matrices y tipos de tubos de recogida de muestras. Se realizó un estudio de los tipos de tubos de recogida de sangre utilizando pares de muestras en diferentes tipos de tubos, incluidos de suero con tapón rojo, separadores de suero, EDTA, heparina de litio y heparina de sodio. Los valores de vitamina D se encontraban dentro del rango de 11,9 a 136,9 ng/ml (29,8 a 342,3 nmol/l). El análisis de regresión lineal se realizó utilizando los tipos de tubos siguientes:

- suero (x) frente a tubo separador de suero (y₁)
- suero (x) frente a EDTA (y₂)
- suero (x) frente a heparina de litio (y₃)
- suero (x) frente a heparina de sodio (y₄)

No se observaron diferencias significativas entre los tipos de tubos. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tipos de tubo*	Pendiente	Punto de corte	R
Suero frente a tubo separador de suero	1,01	-0,33	0,994
Suero frente a EDTA	1,09	-0,17	0,993
Suero frente a heparina de litio	1,04	0,18	0,992
Suero frente a heparina de sodio	1,04	0,90	0,992

* Este estudio se realizó utilizando tubos Becton Dickinson.

VitD

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

Comparación de métodos

Para 195 muestras dentro del rango de 6,2 a 150 ng/ml (15,3 a 375 nmol/l), la relación entre el ensayo ADVIA Centaur VitD (y) y el ensayo IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA se define por la siguiente ecuación de regresión de Deming:

$$\text{ADVIA Centaur VitD} = 1,00 (\text{IDS 25-Hydroxy Vitamin D EIA}) + 2,22 \text{ ng/ml}, r = 0,96$$

Para 580 muestras con concentraciones dentro del rango de 4 a 150 ng/ml (10 a 375 nmol/l), la relación entre el ensayo ADVIA Centaur VitD (y) y la cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas en tándem (LC/MS/MS) (x) se define por la siguiente ecuación de regresión de Deming:

I
$$\text{ADVIA Centaur VitD} = 1,15 (\text{LC/MS/MS}) + 0,70 \text{ ng/ml}, r = 0,91$$

Recuperación con dilución

Ocho muestras de suero con concentraciones dentro del rango de 154 a 237 ng/ml (385 a 592,5 nmol/l) de 25 (OH) vitamina D total se diluyeron a 1:2 con diluyente para ADVIA Centaur VitD y se analizaron para determinar la recuperación y el paralelismo. Las recuperaciones variaron entre el 91 y el 109% con una media del 99,6%.

Muestra	Dilución	Cantidad observada ng/ml (nmol/l)	Cantidad esperada ng/ml (nmol/l)	Recuperación (%)
1	1:2	76,9	77,2	100
2	1:2	93,0	95,6	97
3	1:2	83,5	89,0	94
4	1:2	124,8	118,6	105
5	1:2	126,2	116,0	109
6	1:2	96,3	93,1	103
7	1:2	84,2	85,6	98
8	1:2	71,9	79,0	91
Media				99,6

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

VitD

Interferencias

Las sustancias interferentes se analizaron tal como se describe en el documento EP7-A2²³ del CLSI utilizando el ensayo ADVIA Centaur VitD.

Las muestras que están o son	Demuestran un cambio ≤ 10% en los resultados hasta
hemolizadas	155 mg/dl de hemoglobina
lipémicas	540 mg/dl de triglicéridos
ictéricas	40 mg/dl de bilirrubina conjugada
ictéricas	40 mg/dl de bilirrubina no conjugada

Las muestras que contienen	Demuestran un cambio ≤ 10% en los resultados hasta
colesterol	350 mg/dl
ácido úrico	20 mg/dl
inmunoglobulina humana	12 g/dl

Normalización

El ensayo ADVIA Centaur VitD está normalizado con estándares internos que son conformes al método LC/MS/MS. La relación entre el ensayo ADVIA Centaur VitD (y) y la cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas en tándem (LC/MS/MS) (x) se define por la siguiente regresión lineal:

$$\text{ADVIA Centaur VitD} = 1,01 (\text{LC/MS/MS}) + 8,9 \text{ ng/ml}, r = 0,99$$

Asistencia técnica

Para obtener servicio al cliente, ponerse en contacto con el proveedor local de servicio técnico.

www.siemens.com/diagnostics

Referencias

- Holick MF. Vitamin D Deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266–81.
- Blutt SE, Weigel NL. Vitamin D and prostate cancer. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1999; 221(2):89–98.
- Feskanich D, Ma J, Fuchs CS, et al. Plasma vitamin D metabolites and risk of colorectal cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004; 13(9):1502–1508.
- Shin MH, Holmes MD, Hankinson SE, Wu K, Colditz GA, Willett WC. Intake of dairy products, calcium, and vitamin D and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2002; 94(17):1301–1311.
- Krause R, Buhning M, Hopfenmuller W, Holick MF, Sharma AM. Ultraviolet B and blood pressure. *Lancet.* 1998; 352(9129):709–710.
- Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev.* 2001; 22(4):477–501.
- Lips P, Hosking D, Lippuner K, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J Intern Med.* 2006; 260(3):245–254.
- Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet.* 2001; 358(9292):1500–1503.
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, et al. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology.* 2004; 62(1):60–65.

VitD

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

10. Merlino LA, Curtis J, Mikuls TR, Cerhan JR, Criswell LA, Saag KG. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(1)72–77.
11. Hollis BW, Horst RL. The Assessment of Circulating 25(OH)D and 1,25 (OH)2D: Where We Are and Where We Are Going. *J Steroid Biochem Mol Biol.* March 2007;103(3-5):473–76.
12. Hart GR. Medical Conditions Associated with Vitamin D Deficiency and the Clinical Consequences. Review Series Volume 1, Sept 2004;1–8.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline - Third Edition. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004. NCCLS Document H18-A3.
14. Data on file at Siemens Healthcare Diagnostics.
15. Boscatto LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. *Clin Chem.* 1988;34:27–33.
16. Holick MF. MrOs is D-ficient. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(4):1092–3.
17. Rollins G. Vitamin D Testing—What's the Right Answer? Labs Grapple with Confusing Analytics, Evidence. *Clinical Laboratory News.* July 2009;35(7): 1,6.
18. Freeman R. Vitamin D: The sunshine hormone. How and when to treat deficiencies. *Menopausal Medicine.* May 2009; 58–11.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). *How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2000. NCCLS Document C28-A2.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004. NCCLS Document EP17A.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003. NCCLS Document EP-6A.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline - Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2004. NCCLS Document EP5-A2.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS). *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline - Second Edition.* Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. NCCLS document EP7-A2.

ADVIA Centaur y ReadyPack son marcas comerciales de Siemens Healthcare Diagnostics.

Todas las demás marcas comerciales son propiedad de sus respectivos propietarios.

© 2011 Siemens Healthcare Diagnostics. Reservados todos los derechos.

US Pats 5,609,822; 5,788,928

Origin: US
 Siemens Healthcare Diagnostics Inc.
 Tarrytown, NY 10591-5097 USA



Siemens Healthcare Diagnostics Ltd.
 Sir William Siemens Sq.
 Frimley, Camberley, UK GU16 8QD

Sistemas ADVIA Centaur y ADVIA Centaur XP

VitD

Descripción de los símbolos

Los siguientes símbolos pueden aparecer en la etiqueta del producto:

Símbolo	Definición	Símbolo	Definición
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>	REF	Número de referencia
	Fabricante		Representante autorizado en la Unión Europea
	Símbolo de la CE		Marca de la CE con número de identificación del organismo notificado
	Consulte las instrucciones de uso		¡Precaución! Peligro Biológico Potencial
	No congelar (> 0°C)		Limitación de la temperatura (2–8°C)
	Temperatura mínima (≥ 2°C)		Limitación superior de la temperatura (≤ -10°C)
	Mantener protegido de la luz solar		Fecha de caducidad
	Conservar en posición vertical		Agite vigorosamente el paquete de reactivos. Consulte el apartado <i>Preparación de los reactivos</i> en las instrucciones del producto ADVIA Centaur específico del ensayo para obtener información detallada.
	Código de lote		Contiene material para (n) pruebas
2010-01	Formato de fecha (año-mes)		Imprimido con tinta de soja
	Punto verde		Reciclar

PUBLICACIONES Y CONGRESOS

Publicaciones en revistas científicas

- Valero FJ, Luengo LM, Cubero J (2016) **ADECUACIÓN DE LAS PETICIONES AL LABORATORIO DE LOS NIVELES DE VITAMINA D.**
Nutr Hosp. 2016; 33(5):1159-1163
- Valero FJ, Luengo LM, Alejo S, Bravo R, Cubero J (2016) **COMPARISON BETWEEN TWO IMMUNOASSAYS AFTER THE FIRST PHASE OF VITAMIN D STANDARDIZATION.** “EN REVISIÓN”
- Valero FJ, Bravo R, Cubero J, Luengo LM (2016) **REVISIÓN DE LA ASOCIACIÓN ENTRE VITAMINA D Y DIABETES.** “EN REVISIÓN”

Comunicaciones en congresos

- Valero FJ, Luengo LM, Sánchez G, Cubero J. **Importancia de la fortificación de alimentos con vitaminas liposolubles.** Congreso Regional, Universidad de Extremadura (Workshop). “Alimentos funcionales: presente y futuro” celebrado en Badajoz el 25 de Marzo de 2015. **Comunicación Póster**
- Valero FJ, Alejo S, Cubero J, Luengo LM, Sánchez G, Arias F. **Comparación de la determinación de 25 (OH) vitamina D por 2 inmunoensayos.** IX Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, celebrado en Madrid del 7 al 9 de octubre de 2015. **Comunicación Póster**
- Valero FJ, Luengo LM, Cubero J, Alejo S, Macía MD. **Adecuación de la demanda de vitamina D.** X Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, celebrado en Zaragoza del 19 al 21 de octubre de 2016. **Comunicación Póster**

Ponencias

- Valero FJ. **Racionalización de la determinación de vitamina 25-OH-D.** XI congreso de la Sociedad Extremeña de Endocrinología y Nutrición celebrado en Mérida del 13-14 noviembre de 2015. **Ponencia**



IMPORTANCIA DE LA FORTIFICACIÓN DE ALIMENTOS CON VITAMINAS LIPOSOLUBLES

Valero Chávez, Francisco Javier¹; Luengo Pérez, Luis Miguel¹; Sánchez Salgado, Guillermo¹ y Cubero Juanéz, Javier²

¹ Departamento de Ciencias Biomédicas. ² Área de Didáctica de Ciencias Experimentales. Universidad de Extremadura. fjvalerochavez@hotmail.com

INTRODUCCIÓN: Las vitaminas liposolubles son compuestos imprescindibles para el organismo, y es necesario su aporte exógeno para el mantenimiento de la homeostasis. Existen vitaminas antioxidantes que disminuyen el estrés oxidativo previniendo el envejecimiento, entre las que se encuentran las vitaminas A y E¹. Otras vitaminas como la vitamina D se encarga principalmente de la regulación del metabolismo del fosfo-calcio junto con la PTH², además de otras funciones descubiertas en los últimos años; y aunque su síntesis es principalmente endógena a partir de la luz solar, existe un déficit generalizado en la población y es necesario su aporte exógeno para intentar mantener los niveles séricos dentro de los límites.

OBJETIVOS: Nuestro objetivo fue el conocimiento y la formación a través de la revisión bibliografía respecto a la importancia de la fortificación de alimentos con vitaminas liposolubles para prevenir enfermedades y aumentar la calidad de vida de la población.

MÉTODOS: Analizamos la bibliografía en Pud Med[®] realizando una búsqueda de las publicaciones en los últimos 5 años relacionados con alimentos funcionales y su fortificación con las vitaminas liposolubles A, E y D. Además se utilizó la base de datos USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos) para revisar aquellos alimentos fortificados con mayor aporte de estas vitaminas.

RESULTADOS: La búsqueda en Pud Med[®] nos reportó un total de 18 publicaciones las cuales estudiaban los beneficios de la fortificación de los alimentos con vitaminas liposolubles (Tabla 1), se indica el número de publicaciones encontradas en relación a cada vitamina liposoluble.

Según los datos obtenidos de la USDA los principales alimentos funcionales con mayores concentraciones de vitamina A y D son los productos lácteos (leche, queso) y los jugos de naranja son los que tienen mayores concentraciones de vitamina E.

Vitamina	A	E	D
Nº Publicaciones	2	11	5

Tabla1: Número de publicaciones relacionadas con la fortificación con cada vitamina.

CONCLUSIONES: Aunque existen pocos estudios de alimentos funcionales fortificados con vitaminas liposolubles en los últimos años, si existen gran número de productos fortificados con vitaminas A, D y E, debido a sus beneficios y sobre todo para intentar disminuir el déficit generalizado de vitamina D en la población. Estos alimentos son muy importantes ya que ayudan a la prevención de enfermedades tales como la osteoporosis, problemas visuales, neurodegenerativos, cardiovasculares, etc^{4,5,6}.

¹ Gil Hernández, A. Tratado de nutrición. 2ª edic. Edit. Médica Panamericana, 2010. 487-495; 545-569.

² Gil Hernández, A. Tratado de nutrición. 2ª edic. Edit. Médica Panamericana, 2010. 573-592

³ Dennis Bromley, Peter C. Anderson and Valerie Daggett. Structural Consequences of Mutations to the α Tocopherol Transfer Protein Associated with the Neurodegenerative Disease Ataxia with Vitamin E Deficiency Biochemistry. 2013 June 18; 52(24): 4264-4273.

⁴ Quesada Gómez J. y Sosa Henríquez M. Nutrición y osteoporosis. Calcio y vitamina D. Rev Osteoporos Metab Miner 2011 3;4: 165-182

⁵ J. Almirall. Papel del déficit de vitamina D en la hipertensión arterial y la enfermedad cardiovascular. Hipertens riesgo vasc. 2010; 27(3):89-92

COMPARACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE 25(OH) VITAMINA D POR 2 INMUNOENSAYOS

Valero Chávez, Francisco Javier; Alejo González, Socorro; Cubero Juanez, Javier; Luengo Pérez, Luis Miguel; Sánchez Salgado, Guillermo; Arias Meneses, Fernando.

Introducción: La vitamina D es una vitamina liposoluble cuya función principal es la regulación del metabolismo del fosfo-calcio junto con la PTH, y su deficiencia se asocia a enfermedades como el raquitismo, osteoporosis y osteomalacia. Además en los últimos años numerosas publicaciones y estudios han demostrado que esta vitamina está implicada en gran número de procesos. El aumento de la demanda en los últimos años hace que la mayoría de los laboratorios clínicos determinen los niveles de 25 (OH) vitamina D total mediante inmunoensayos automatizados por su mayor rapidez, aunque los métodos más precisos son el HPLC y LC-MS/MS, pero requieren de una infraestructura, personal cualificado, mayor volumen de la muestra y paso de extracción previo.

Objetivos: Comparar los resultados de 25(OH) vitamina D obtenidos por 2 inmunoensayos que han superado la primera fase del proceso de estandarización (VDSCP, programa de certificación y estandarización de la vitamina D); utilizando dicha comparación para estudiar la posible introducción de la vitamina D en el sistema automatizado ADVIA LABCELL, debida al aumento de la demanda de la vitamina D.

Materiales y Métodos: Se determinaron los niveles de 25(OH) vitamina D de 70 pacientes por 2 inmunoensayos; el que utilizamos habitualmente de rutina en el laboratorio de análisis clínicos IDS-iSYS® 25-Hydroxy Vitamin D (inmunoensayo con detección por quimioluminiscencia, validado para muestras de suero y que presenta un rango de medida que va desde 7-125 ng/mL), el cual utilizaremos como método de referencia y el otro ADVIA Centaur Vitamina D Total (inmunoensayo competitivo con detección por quimioluminiscencia, que está validado para muestras de suero y plasma, cuyo rango analítico va desde 4-150 ng/mL). Los resultados obtenidos se analizaron mediante una regresión lineal no paramétrica de Passing-Bablok, con el programa Method Validator. Además evaluamos la capacidad de los inmunoensayos en clasificar a los pacientes en las diferentes categorías: <10 ng/mL (deficiencia), 11-29 ng/mL (insuficiencia), 30-149 ng/mL (suficiencia) y >150ng/mL (toxicidad).

Resultados: El análisis estadístico mediante regresión lineal no paramétrica mostró un coeficiente de correlación (r) entre ambos métodos de 0,972; una pendiente de la recta de 1,010 (IC del 95%; 0,869 a 1,123) y una ordenada en el origen de 0,863 (IC del 95%; -1,124 a 3,482). La recta de regresión obtenida es la siguiente: $y = 1,010x + 0,863$ siendo la variable "x" el resultado de vitamina D obtenido por IDS-iSYS y la variable "y" el resultado de vitamina D obtenido por ADVIA Centaur.

Al clasificar a los pacientes por categorías utilizando cada método analítico, encontramos que utilizando el inmunoensayo de IDS se incluyen más pacientes en el rango de deficiencia.

Conclusiones: A raíz de los resultados obtenidos podemos afirmar que las variaciones de las concentraciones de vitamina D utilizando diferente inmunoensayo no son significativas, aunque hay que resaltar que existe dispersión de los resultados en todo el rango analítico, debido en parte a la falta de estandarización, existiendo gran variabilidad de resultados intermétodo. Por lo que un cambio de método en la determinación de vitamina D en el laboratorio conllevaría a definir nuevos valores de deficiencia, insuficiencia, suficiencia y toxicidad.

ADECUACIÓN DE LA DEMANDA DE VITAMINA D

Francisco Javier Valero Chávez (1), Andrea Espuch Oliver (2) Luis Miguel Luengo Pérez (1), Javier Cubero Juanez (3)

(1) Complejo Hospital Universitario de Badajoz (2) Hospital Universitario Virgen de las Nieves
(3) Universidad de Extremadura

Introducción:

En la actualidad numerosos artículos en su mayoría descriptivos han puesto de manifiesto la asociación entre la vitamina D y enfermedades tales como la diabetes, cáncer, enfermedades cardiovasculares, dislipemias, enfermedades autoinmunes, etc. No es de extrañar que se haya defendido la medición de los niveles de vitamina D en la población general. Sin embargo no existen suficientes estudios experimentales o son contradictorios que demuestren la viabilidad y rentabilidad de la estrategia de cribado en la población y tampoco se ha comprobado la existencia de beneficios para la salud. Por lo que en la actualidad solo es aconsejable la medida de 25 (OH) vitamina D en los grupos de personas de alto riesgo como indican las guías clínicas internacionales (Sociedad Americana de Endocrinología y Sociedad Española de Bioquímica Clínica, entre otras)

Objetivo:

Analizar las peticiones de vitamina D durante un año comprobando si se adecuan a las guías clínicas.

Materiales y métodos:

Se analizaron las peticiones de determinación de vitamina D durante 12 meses consecutivos (N=3907) en nuestro Área de Salud. En dicho estudio revisamos el diagnóstico de petición y la historia clínica del paciente para discriminar entre peticiones que se adecuaban a las guías clínicas o peticiones injustificadas que no tenían el respaldo de las sociedades científicas. Las clasificamos en peticiones justificadas y peticiones injustificadas que no reportarían ningún beneficio para el paciente, y por lo tanto suponían un gasto económico extra. Además nos fijamos en los servicios que no se adecuaban a las guías clínicas y por último hicimos un estudio económico.

Resultados:

En los resultados encontramos que casi un tercio de las peticiones (1271) no se adecuaban a ningún criterio de petición de las guías clínicas, por lo que suponían un exceso de gasto para la sanidad. Las principales patologías en las que se pedía vitamina D de manera injustificada eran: hipertensión (21,71 %), diabetes (10,38%) y dislipemias (9,04%). Un resultado a resaltar es que Atención Primaria suponía casi el 50% de las peticiones no justificadas. La determinación de vitamina D es una prueba cara, con un precio directo de 4,2 euros por determinación (sin contar calibraciones, controles, personal, etc.). Se produjo un exceso de gasto de 5338 euros en nuestra Área de Salud durante el año analizado.

ADECUACIÓN DE LA DEMANDA SEGÚN EL DIAGNÓSTICO-HISTORIA CLÍNICA

■ Petición Justificada ■ Petición No Justificada



Conclusión:

A raíz de los resultados obtenidos podemos afirmar que se está haciendo una mala utilización de la determinación de vitamina D, principalmente desde servicios como Atención Primaria, produciéndose un gasto extra que podría ser utilizado en otras funciones. Con respecto a patologías con hipertensión, diabetes y dislipemias y su asociación con la vitamina D, concluir que la mayoría son estudios epidemiológicos pero sin evidencias claras que indiquen que los suplementos de vitamina D tengan un papel en la prevención o mejora de estas enfermedades. Para terminar concluimos la necesidad de crear protocolos de petición de vitamina D, que se ajusten a las guías clínicas hasta que existan más estudios sobre las nuevas implicaciones de la vitamina D y así conseguir una correcta utilización de los recursos económicos.

PROTOCOLOS

PROTROCOS

- Solicitud de implantación del protocolo de Vitamina D en el Área de Salud de Badajoz. Comisión de Tecnología y Adecuación de Medios Diagnósticos (CTAMD) Abril de 2015.
- Implantación del protocolo de Adecuación de la demanda de vitamina D en el Área de Salud de Badajoz. Aprobado por la Comisión de Tecnología y Adecuación de Medios Diagnósticos (CTAMD) el 15 de Abril de 2016.



GOBIERNO DE EXTREMADURA
Consejería de Salud y Política Social

Informe Solicitud de Implantación de Tecnología

Responsable **FCO.VALERO CHAVEZ / SOCORRO ALEJO / PURA GARCIA YUN**

Servicio **ANALISIS CLINICOS**

Fecha **ABRIL 2015**

Denominación de la tecnología

Adecuación de la demanda de petición analítica de VITAMINA D

1. Características técnicas fundamentales.

Filtrado de solicitudes de análisis de vitamina D y rechazo de las que no procedan basándonos en los criterios de las guías clínicas de la Sociedad de Endocrinología Americana, el Consenso de la Alta Autoridad Sanitaria Francesa y Sociedad Española de Bioquímica Clínica.

2. Procedimientos para los que se utiliza (Propósito, principios básicos de funcionamiento, requisitos para la adquisición).

Reducir el número de peticiones de vitamina D no justificadas. La medición de niveles de 25 (OH) D en suero es una determinación cara y aunque la deficiencia de vitamina D sea frecuente el cribado universal no se admite. El aumento de las publicaciones sobre las nuevas implicaciones de la vitamina D, han producido un incremento en el número de determinación sérica de los niveles de esta hormona. A día de hoy, no hay evidencias científicas que demuestren los beneficios de la medición generalizada de la vitamina D a nivel de la población.

Para implantar el protocolo de adecuación de la demanda de vitamina D no hay requisitos especiales. Filtrado de solicitudes en función del diagnóstico clínico y del servicio peticionario. Se pondría como requisito obligatorio indicar el diagnóstico en el volante de petición.

Según los estudios de adecuación de la demanda realizados en nuestro laboratorio por el Dr. Francisco Javier Valero en su tesis doctoral, hay servicios

clínicos peticionarios que siempre cumplen los criterios de las guías clínicas, por lo que no se les aplicaría ningún filtro. Estos servicios son los siguientes:

- Endocrinología y endocrino infantil
- Nefrología y nefro infantil
- Medicina interna
- Pediatría y lactantes
- Traumatología
- Reumatología
- Gastro infantil
- Digestivo
- Diálisis
- Trasplante renal
- Hematología

Para el resto de servicios hospitalarios y Atención Primaria, tendrían que presentar en su solicitud alguno de los siguientes diagnósticos:

- Raquitismo
- Osteomalacia
- Osteoporosis
- Insuficiencia renal crónica (solo estadios terminales 3-5)
- Trasplante renal
- Hiperparatiroidismo
- Insuficiencia hepatocelular
- Síndromes de malabsorción (celiaquía, Crohn, pancreatitis, fibrosis quística, etc)
- Tras cirugía bariátrica
- Ciertos fármacos (glucocorticoides, antiepilépticos, medicación anti-retroviral)
- Caídas repetidas
- Ciertos linfomas
- Enfermedades granulomatosas (tuberculosis y sarcoidosis)

Si no se indica en el volante alguno de estos diagnósticos, se rechazará la solicitud de la prueba.

3. Situación actual en el centro: ¿Responde a una necesidad no cubierta? (Realizar una breve descripción).

No existe ningún protocolo para adecuación y uso racional de pruebas de vitamina D. Por lo que se solicita el respaldo de la Dirección Médica para implantarlo y rechazar las solicitudes que no proceden, haciendo un uso racional de los recursos hospitalarios.

4. ¿En qué prestación de la cartera de servicios se incluye la tecnología?

Catálogo de pruebas de laboratorio de Análisis Clínicos.

5. Fase en la que se encuentra la tecnología. (Pueden contemplarse diferentes alternativas en diferentes componentes de la tecnología evaluada).

- Investigación básica
- Ensayo clínico
- Uso tutelado
- Difusión controvertida
- Práctica clínica aceptada**
- Declive

La determinación de la vitamina D es una prueba de rutina en los laboratorios de Análisis Clínicos, pero existe una gran variabilidad de resultados entre diferentes laboratorios e interlote, en gran parte debido a la inexistencia de una técnica de referencia y por lo tanto no existe estandarización. El cribado de las peticiones injustificadas es necesario para conseguir un mayor rendimiento de los recursos del hospital y evitar falsos negativos (resultados de deficiencia) en peticiones no necesarias por la patología del paciente.

ClinicalChemistry (58:3, 486-488, 2012) Grahan D. Carter (responsable del DQAS, control externo de la vitamina D, y principal representante del proceso de estandarización de la vitamina D)

6. ¿A qué servicios o unidades va a afectar la tecnología?

Uso generalizado en servicios de Atención Primaria y algunos servicios hospitalarios de atención especializada. Atención Primaria hace el 50% de las peticiones que no se ajustan a ningún criterio clínico aceptado por las guías clínicas.

7. ¿A cuáles de los siguientes aspectos de la atención sanitaria afecta la tecnología? (Pueden contemplarse diferentes alternativas en diferentes componentes de la tecnología evaluada).

Preventivo

Diagnóstico

Tratamiento médico

Tratamiento quirúrgico

Tratamiento rehabilitador

Aspecto organizativos

Otros

8. Indicaciones clínicas (Criterios de inclusión y exclusión. Aportar referencias bibliográficas).

Siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Endocrinología, la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y el consenso al que llegó La Alta Autoridad Francesa sobre las indicaciones de determinación de vitamina D; las peticiones de vitamina D estarían justificadas en las siguientes patologías:

Raquitismo, Osteomalacia/Osteoporosis, Caídas frecuentes, Síndromes de malabsorción (enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal, fibrosis quística, enfermedad de Crohn...), Cirugía Bariátrica, Pacientes con IRC en

estadios 3-5, Pacientes con trasplante renal, Pacientes con Hiperparatiroidismo Primario, Trastornos granulomatosos (tuberculosis y sarcoidosis), fármacos como los glucocorticoides en altas dosis y ciertos linfomas.

- JoAnn E. Manson, M.D., Dr.P.H., Susan T. Mayne, Ph.D., and Steven K. Clinton, M.D., Ph.D. Vitamin D and Prevention of Cancer — Ready for Prime Time? *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*
- Nancy R. Cook Vitamin D and Cancer: Can We Believe the Evidence from Observational Studies? *Clinical Chemistry* 59:5, 726-728 (2013)
- Shoaib Afzal, Stig E. Bojesen, and Børge G. Nordestgaard Low 25-Hydroxyvitamin D and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Cohort Study and Metaanalysis. *Clinical Chemistry* 59:2, 381-391 (2013).
- Cayetana Moyano Peregrin , Francisca López Rodríguez y Maria del Mar Castilla Castellano. Vitamina D e hipertensión arterial. *Med Clin (Barc)*. 2012;138(9):397-401
- Peter F. Schnatz and JoAnn E. Manson. Vitamin D and Cardiovascular Disease: An Appraisal of the Evidence. *Clinical Chemistry* 60:4, 600-609 (2014)
- Aloia JF. The 2011 Report on Dietary Reference Intake for Vitamin D: Where Do We Go From Here? *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96 (10): 2987-96
- Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, Murad MH, Kovacs CS. The nonskeletal effects of vitamin D: an endocrine society scientific statement. *Endocr Rev*. 2012,33(3):456-92
- González-Padilla E, Soria López A, González-Rodríguez E, García-Santana S, Mirallave-Pescador A, Groba Marco M, et al. Elevada prevalencia de hipovitaminosis D en los estudiantes de medicina de Gran Canaria, Islas Canarias (España). *Endocrinol Nutr*. 2011, 58(6):267-73.
- Vaqueiro M, Baré M, Anton A, Andreu E, Moya A, Sampere R, et al. Hipovitaminosis D asociada a exposición solar insuficiente en la población mayor de 64 años. *Med Clin (Barc)*. 2007;129(8):287-91.
- Durá-Travé T, Gallinas-Victoriano F, Chueca Guindulain MJ y Berrade-Zubiri S. Deficiencia de vitamina D en escolares y adolescentes con un estado nutricional normal. *Nutr Hosp*. 2015;32(3):1061-1066
- Tom D. Thacher, MD, and Bart L. Clarke, MD. Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clin Proc*. 2011;86(1):50-60

- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrri HA, Gordon CM, Heaney RP, Murand H; Weaver CM; Endocrine Society. Evaluation, Treatment and Prevention of Vitamin D Deficiency: and Endocrine Society Clinical practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011; 96(7):1911-30
- Córdoba C. and Granado F. Vitamina D: Una perspectiva actual. *SEQC 2013*
- Rapport D`Evaluation technologique: Utilité clinique du dosage de la vitamine D. Octobre 2013
- Holick MF, Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266-81.
- Tom D. Thacher, MD, and Bart L. Clarke, MD. Vitamin D Insufficiency. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(1):50-60
- Moon HW, Cho JH, Hur M, Song J, Oh GY, Park CM, Yun YM, Kim JQ. Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem* 2012;45:326-330.
- Farrel CJL, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem* 2012;58:531-41
- Binkley N, Krueger DC, Morgan S, Wiebe D. Current status of clinical 25-hydroxyvitamin D measurement: an assessment of between-laboratory agreement. *Clin Chim Acta* 2010;411:1976-82.
- LM. Thienpont, HCM. Stepmán and HW.Vesper. Standardization of measurements of 25-Hydroxyvitamin D3 y D2. *Scandinavian Journal of Clinica and Laboratory Investigation*, 2012; 72(Suppl 243): 41-49
- AC. Heijboer, MA. Blankenstein, IP. Kema, and MM. Buijs. Accuracy of 6 Routine 25-Hydroxyvitamin D Assays: Influence of Vitamin D Binding Protein Concentration. *Clinical Chemistry* 58:3. 543-548 (2010).

9. Grado de evidencia sobre la eficacia y efectividad: beneficios potenciales (Aportar referencias bibliográficas).

X Para los pacientes

X Para la organización

La utilización de recursos sanitarios, como sería en este caso la utilización racional de una prueba de laboratorio como la vitamina D, produce un ahorro

directo de recursos económicos tanto en el capítulo de reactivos como en el capítulo 1 de personal de laboratorio. Un rendimiento eficiente de las pruebas produce un beneficio para los pacientes al mejorar la disponibilidad de recursos diagnósticos.

10. Grado de evidencia sobre seguridad: Riesgos potenciales (Aportar referencias bibliográficas).

No procede

Para los pacientes

Para la organización

11. Cuantificación de los beneficios (Estancias, ingresos, demoras,.....)

Según el estudio realizado sobre las peticiones de vitamina D en el año 2013, tras la revisión de los diagnósticos de petición y las historias clínicas de las 3907 peticiones realizadas; solo 2629 seguían algún criterio de petición mencionado en el apartado 8, por lo que 1268 eran peticiones injustificadas. Si la determinación de vitamina D tiene un coste de 6,1 euros coste directo (solo la prueba individual, sin contar gasto de controles, calibradores y coste indirecto de personal) se produjo un gasto de 7900euros en peticiones injustificadas. (Solo en el área de Badajoz). Si se aplica a todas las áreas el beneficio estimado sería 120.000 euros por año.

12. Indicar posible impacto ético, social o legal que supone la adquisición y/o implantación de la tecnología.

Limitación en la prescripción facultativa

13. En su caso, ¿Cómo se introduce la nueva tecnología en el historial del paciente? (historia electrónica, historia en documento físico, imagen, ...).

No procede

14. Nivel de evidencia científica alcanzado con la tecnología solicitada. (Adjuntar bibliografía, informes de evaluación sanitaria, opiniones de expertos e información de casas comerciales).

Se adjunta bibliografía en párrafos anteriores.

15. ¿Se dispone de la tecnología en las zonas sanitarias de nuestro entorno? Indique cuales.

No, no hay ningún protocolo implantado. Se podría extrapolar al resto de las áreas de salud de la comunidad con el consiguiente beneficio para los recursos del SES y por tanto para todos los pacientes

16. ¿La implantación de la tecnología requiere cambios? (Organizativos, de personal, estructurales, de formación,....).

Requiere control preanalítico para ajustar las solicitudes a los protocolos propuestos por las sociedades científicas.

17. Evaluación económica coste total estimado de la adquisición (La evaluación económica debe incluir. Costes de adaptación, requisitos técnicos que deben contemplar las diferentes ofertas, necesidades de mantenimiento del equipamiento, necesidades de fungibles y modelaje,....).

No conlleva coste económico, sino respaldo del protocolo de petición de vitamina D por parte de la Dirección del Hospital

SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
COMPLEJO HOSPITALARIO UNIVERSITARIO DE BADAJOZ

PROTOCOLO DE ADECUACIÓN DE LA DEMANDA ANALÍTICA DE 25(OH) VITAMINA D

Ante el incremento casi exponencial producido en los últimos 8 años en el número de determinaciones de vitamina D en el Área de Salud de Badajoz, se ha realizado un estudio retrospectivo sobre la correcta adecuación de las solicitudes de vitamina D. El 33% de las solicitudes no se adecuaban a los criterios de petición establecidos en las guías clínicas: Guía de la Sociedad de Endocrinología Americana, Consenso de la Alta Autoridad Sanitaria Francesa y Guía de la Sociedad Española de Química Clínica (SEQC).

Debido a ello se hace necesaria la implantación de un protocolo de petición de Vitamina D en nuestra Área de Salud, adaptado a los criterios de las citadas guías clínicas. Dicho protocolo ha sido aprobado por la Comisión de Tecnología y Adecuación de Medios Diagnósticos (CTAMD) el 15 de Abril de 2016.

Las indicaciones diagnosticas establecidas como criterios de petición de Vitamina D son:

• Raquitismo
• Osteomalacia
• Osteoporosis
• Caídas repetidas
• Insuficiencia renal crónica, estadios terminales 3-5
• TX renal
• Hiperparatiroidismo
• Insuficiencia hepatocelular
• Síndrome malabsorción (Celiaquía/Crohn/Pancreatitis/Fibrosis Quística)
• Cirugía Bariátrica
• Ciertos fármacos (glucocorticoides, antiepilépticos, antiretrovirales, algunos antifúngicos, colestiramina)
• Ciertos linfomas
• Enfermedades granulomatosas (sarcoidosis, tuberculosis, histoplasmosis, coccidiomycosis, beriliosis)

