

Torrubia B<sup>1</sup>, Alonso I<sup>1</sup>, López-Ramiro E<sup>1</sup>, Mahillo I<sup>2</sup>, De la Piedra C<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Bioquímica

<sup>2</sup> Servicio de Epidemiología

Fundación Jiménez Díaz - Madrid (España)

# Comparación entre dos inmunoensayos automatizados por quimioluminiscencia para la cuantificación de 25(OH) vitamina D

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2016000200004>

Correspondencia: Concha de la Piedra - Laboratorio de Bioquímica - Fundación Jiménez Díaz - Avda. Reyes Católicos, 2 - 28040 Madrid (España)

Correo electrónico: cpiedra@fjd.es

Fecha de recepción: 23/12/2015

Fecha de aceptación: 16/03/2016

*Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM recibida para asistir al 34º Congreso de la ASBMR (Minneapolis, 2013).*

## Resumen

**Introducción:** La cuantificación de 25(OH) vitamina D total en sangre es el marcador más preciso del estado de vitamina D en un individuo. La técnica patrón-oro para su medición es la cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), aunque actualmente los laboratorios clínicos utilizan de rutina técnicas de quimioluminiscencia. El objetivo del estudio fue comparar las concentraciones de 25(OH) vitamina D obtenidas mediante dos métodos automatizados comerciales y estudiar la correlación de dichos métodos con la técnica de referencia LC-MS/MS.

**Material y método:** Se cuantificaron los niveles de 25(OH) vitamina D en 1.000 muestras de suero del laboratorio de Bioquímica de la Fundación Jiménez Díaz mediante 2 métodos automatizados comerciales por detección de quimioluminiscencia: ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) y LUMIPULSE® G1200 (FUJIREBIO). Entre todas las muestras analizadas, las 50 más discordantes entre sí se enviaron para ser evaluadas por la técnica de referencia LC-MS/MS.

**Resultados:** Los resultados obtenidos indican que existe una buena correlación entre los dos métodos: CCI=0,923 (0,914-0,932), siendo los valores de LUMIPULSE® G1200 un 10% superiores a los de CENTAURO®. Con respecto a las 50 muestras seleccionadas, podemos observar que existe una buena correlación entre los dos inmunoensayos con la técnica LC-MS/MS, aunque ambos métodos infraestiman considerablemente los resultados de 25(OH) vitamina D con respecto al patrón-oro.

**Discusión:** Aunque ambas técnicas son adecuadas para su utilización, habría que plantearse si la "epidemia" mundial de hipovitaminosis D se debe a la metodología de análisis utilizada. Esta variabilidad entre inmunoensayos se solucionaría estandarizando las diferentes técnicas comerciales con los materiales de referencia elaborados por el NIST.

**Palabras clave:** 25(OH) vitamina D, FUJIREBIO, SIEMENS, comparación técnica, LC-MS/MS.

## Comparison between two automated chemiluminescence immunoassays for quantifying 25 (OH) vitamin D

### Summary

**Introduction:** Quantifying total blood 25 (OH) vitamin D is the most accurate marker of an individual's vitamin D status. The gold standard technique for measurement is liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), although currently clinical laboratories tend to use chemiluminescence techniques. The objective of this study was to compare 25 (OH) vitamin D concentrations obtained by two commercially-produced automated methods and study the correlation of these methods with the LC-MS/MS reference technique.

**Material and methods:** The 25(OH) vitamin D levels were quantified in 1,000 serum samples from the Jimenez Diaz Biochemistry Foundation Laboratory using 2 automated methods for chemiluminescence detection: ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) and LUMIPULSE® G1200 (Fujirebio). Among all the samples tested, the 50 most discordant to each other were sent to be evaluated by LC-MS/MS reference technique.

**Results:** The results indicate that there is good correlation between the two methods: CCI=0.923 (0.914-0.932), with the G1200 LUMIPULSE® values 10% being higher than CENTAURO®. Regarding the 50 samples selected, we can see that there is a good correlation between the two immunoassays with LC-MS/MS, although both methods significantly underestimate 25 (OH) vitamin D results with respect to the gold standard.

**Discussion:** Although both techniques are suitable for use, it is worth considering whether the worldwide vitamin D deficiency epidemic is due to the analysis methodology used. This variability between immunoassays could be solved by standardizing the different commercial techniques in line with NIST-produced reference materials.

**Key words:** 25(OH) vitamin D, Fujirebio, SIEMENS, technical comparison, LC-MS/MS.

### Introducción

La vitamina D es una vitamina liposoluble implicada en el metabolismo fosfocálcico cuyo papel es fundamental en la formación y mineralización ósea. Actualmente, se han demostrado además sus acciones inmunomoduladoras, antiproliferativas y estimuladoras de la diferenciación celular que la relacionan con importantes patologías como enfermedades cardiovasculares, diabetes y cáncer<sup>1,2</sup>.

La cuantificación de 25(OH) vitamina D total en sangre es el marcador más preciso del estado de vitamina D en un individuo, aunque su metabolito activo es la 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D<sup>3,4</sup>.

La técnica patrón-oro para su medición es la cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), pero actualmente los laboratorios clínicos utilizan de rutina inmunoensayos por quimioluminiscencia<sup>5</sup>.

Los principales problemas de dichos inmunoensayos se deben a la naturaleza hidrofóbica del analito, la alta concentración en la que se encuentra la proteína ligadora de vitamina D (VDPB) en el suero, y la existencia de reacciones cruzadas de los múltiples metabolitos de vitamina D con los anticuerpos utilizados en la técnica. Por ello, un correcto inmunoensayo requiere un pretratamiento para inactivar la VDPB, una selección cuidadosa del anticuerpo utilizado y la estandarización de la técnica frente a los valores arrojados por el analizador LC-MS/MS. Las diferentes técnicas comerciales para el análisis de vitamina D difieren en la manera de separar la proteína ligadora, en el porcentaje de reacciones cruzadas con otros metabolitos de nuestro analito, así como en la especificidad del anticuerpo utilizado<sup>6,6</sup>.

Actualmente, como resultado del conocimiento general sobre la severa deficiencia de vitamina D en

la población mundial, ha surgido la necesidad de medir los niveles de vitamina D en diferentes poblaciones, cohortes de investigación y pacientes individuales<sup>7</sup>. Diversos estudios han mostrado variaciones considerables entre los diversos métodos analíticos basados en inmunoquímica, cromatografía líquida/UV y LC-MS/MS. Se ha llegado a afirmar que un paciente concreto puede ser clasificado con niveles de suficiencia o insuficiencia de vitamina D dependiendo del laboratorio donde se haya realizado el análisis<sup>7,8</sup>.

Para solucionar este problema se ha establecido la necesidad de la estandarización de los niveles de 25(OH) vitamina D por parte de numerosas organizaciones científicas. En 2011, la Oficina de Suplementos Dietéticos (ODS) del Instituto Nacional de Salud de EE.UU. (NIH) en colaboración con el *National Institute of Standards and Technology* (NIST) creó el programa de estandarización de la vitamina D (VDSP). El NIST ha desarrollado 4 materiales de referencia basados en suero con diferentes concentraciones conocidas de vitamina D que permiten estandarizar las diversas técnicas comerciales<sup>7,9</sup>. A pesar de ello, no todos los métodos actuales empleados para cuantificar 25(OH) vitamina D están ya calibrados frente a estos estándares<sup>10</sup>.

El objetivo de este estudio fue comparar las concentraciones de 25(OH) vitamina D obtenidas mediante dos métodos automatizados comerciales y estudiar la correlación de dichos métodos con la técnica LC-MS/MS.

### Material y métodos

Para ello hemos utilizado 1.000 muestras de suero elegidas al azar entre las analizadas en el laboratorio de Análisis Clínicos de la Fundación Jiménez Díaz. Las muestras pertenecían a pacientes con una edad

comprendida entre 1 y 92 años ( $59 \pm 18$ , media  $\pm$  DE) con un 37% de mujeres y un 63% de hombres. Se cuantificaron los niveles de 25(OH) vitamina D en el analizador ADVIA CENTAURO XP® (SIEMENS) y en el LUMIPULSE G1200 (FUJIREBIO).

En todos los casos las muestras se han manejado de modo anónimo, por lo que no ha sido necesaria la obtención del consentimiento informado de los pacientes.

El analizador LUMIPULSE® G1200 (FUJIREBIO) realiza un inmunoensayo no competitivo tipo sándwich con detección por quimioluminiscencia que emplea dos anticuerpos, un anticuerpo monoclonal de oveja que se une a la 25(OH) vitamina D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>, y un segundo anticuerpo monoclonal que se une exclusivamente al complejo anteriormente formado. La separación de la proteína ligadora de la vitamina D se realiza mediante un agente químico en 1ª reacción.

Según las especificaciones del fabricante, la técnica presenta una imprecisión intraensayo con un coeficiente de variación (CV)  $\leq 6\%$ , y una sensibilidad funcional de 3,491 ng/mL. Su intervalo de medición es de 4-150 ng/mL. La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos es del 100% para la 25(OH) vitamina D<sub>3</sub>, del 100,1% para la 25(OH) vitamina D<sub>2</sub>, y del 19,9% para el epímero C3 de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub>.

El analizador ADVIA CENTAURO® (SIEMENS) consiste en un inmunoensayo competitivo con detección por quimioluminiscencia que utiliza un anticuerpo monoclonal murino anti-fluoresceína unido de forma covalente a partículas paramagnéticas (PMP), un anticuerpo monoclonal murino anti-25(OH) vitamina D marcado con éster de acridinio, y un análogo de vitamina D marcado con fluoresceína. Como medio de separación de la proteína ligadora se utiliza un agente liberador en tampón salino.

Según las especificaciones del fabricante, la técnica presenta una imprecisión intraensayo con un CV del 4,2%-11,9% y una sensibilidad funcional de 4,2 ng/mL. Su intervalo de medición es de 4,2-150 ng/mL. La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos es del 97,4% para la 25(OH) vitamina D<sub>3</sub>, del 106,2% para la 25(OH) vitamina D<sub>2</sub> y del 1% para el epímero C3 de 25(OH) vitamina D<sub>3</sub>.

Entre todas las muestras analizadas, las 50 más discordantes entre sí se enviaron para ser evaluadas por el método LC-MS/MS en el laboratorio del Dr. Etienne Cavalier (Departamento de Química Clínica, Universidad de Lieja, Bélgica); con el fin de comparar los dos inmunoensayos por quimioluminiscencia con respecto a la técnica de referencia LC-MS/MS. La diferencia de resultado entre estas 50 muestras oscilaba entre el 14% y el 133% ( $32 \pm 52\%$ , media  $\pm$  DE) con respecto a la media de los 2 valores obtenidos. En todos los casos este porcentaje era superior a los coeficientes de variación inter-análisis de los 2 métodos: FUJIREBIO, 6%; SIEMENS, 11,9%. Analizamos las muestras más discordantes para ver si correspondían a un grupo determinado de pacientes, como por ejemplo gestantes que presentan niveles anormales de proteína ligadora de la vitamina D. Sin embargo, observamos que dichos pacientes pertenecían mayo-

ritariamente a los servicios de Nefrología, Reumatología y Endocrinología, hecho no significativo, ya que estos servicios son los que más demandan la determinación de vitamina D. Por otra parte, la edad media de estos 50 pacientes era  $63 \pm 16$  años, siendo el 34% hombres y el 66% mujeres, cifras muy similares a las del grupo total de 1.000 muestras (edad  $59 \pm 18$  años con un 37% de mujeres y un 63% de hombres). Se eligieron las muestras más discordantes entre sí para enviar a analizar por gases-masas porque nuestro objetivo era doble: por una parte comprobar su similitud con la técnica de gases-masas y por otra parte aclarar cuál de las dos técnicas se asemejaba más a la técnica de referencia. Este segundo punto no se podía clarificar si enviábamos las muestras cuyos resultados eran similares. Con respecto a la elección de un número de 50 muestras como la adecuada para el estudio, se realizó porque era una cantidad de muestras suficiente para obtener resultados estadísticamente significativos. Debido al elevado coste de la determinación por gases-masas no fue posible enviar un mayor número de muestras.

## Resultados

Evaluamos el grado de concordancia de las medidas de vitamina D proporcionadas por los dos aparatos: ADVIA CENTAURO XP® y LUMIPULSE G1200®. Para ello, calculamos los coeficientes de correlación intraclassa (CCI) junto con sus intervalos de confianza al 95%. Los resultados obtenidos indican que existe una buena correlación entre los dos métodos: CCI=0,923 (0,914-0,932). No existen diferencias significativas en el CCI si se dividen las muestras en los grupos con valores de vitamina D  $\leq 20$  ng/mL y  $> 20$  ng/mL.

La recta de regresión obtenida entre ambos ensayos fue  $Y=1,221+1,035X$ , donde Y corresponde a los valores de LUMIPULSE G1200 y X a los del CENTAURO®. Se observa que los valores de LUMIPULSE G1200 son un 10% superiores a los de CENTAURO® (Figura 1).

Con respecto al subgrupo de 50 muestras seleccionadas para analizar por LC-MS/MS, se ha obtenido un CCI=0,987 con el analizador LUMIPULSE y un CCI=0,938 con el analizador CENTAURO®. Aunque ambos son satisfactorios, el coeficiente de correlación intraclassa más elevado es el de LUMIPULSE, por tanto, las mediciones de este aparato se parecen más a las exactas (Figuras 2 y 3).

A continuación, con nuestro subgrupo de 50 muestras seleccionadas, realizamos las gráficas de Bland-Altman, donde el eje X corresponde a las medias de cada par de observaciones y el eje Y a las diferencias entre cada par de observaciones. En los gráficos hay dos líneas continuas horizontales. La línea continua gris está trazada a la altura del valor cero; si las medidas dadas por el aparato fueran idénticas a las medidas exactas los puntos debería situarse justo en esta línea. La línea continua azul representa la media de las diferencias. Si esta línea está por debajo de la línea del valor 0 quiere decir que el aparato tiende a dar medidas inferiores al valor exacto, y si está por encima lo contrario.

Como podemos observar en la figura 4, la media de las diferencias entre el analizador LUMIPULSE

Figura 1. Recta de regresión entre LUMIPULSE G1200® (FUJIREBIO) y CENTAURO® (SIEMENS) utilizando 1.000 muestras de suero de pacientes de la Fundación Jiménez Díaz

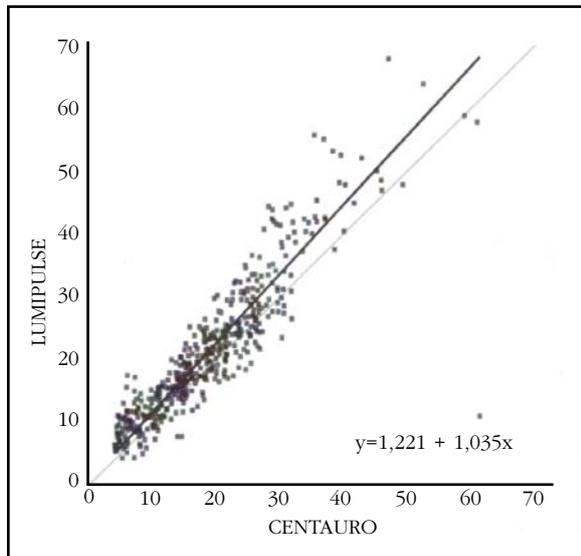
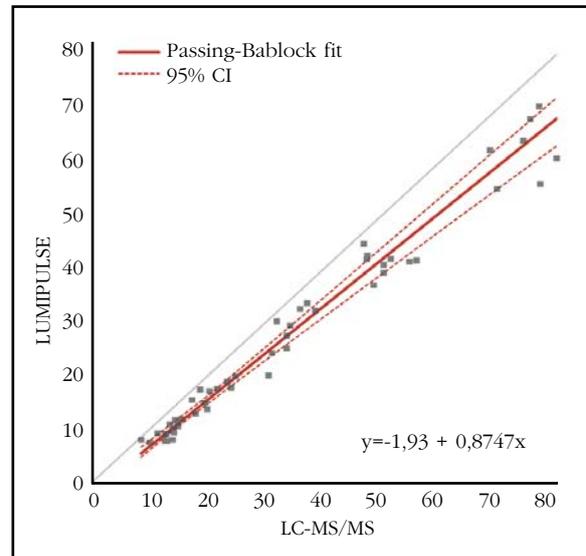


Figura 2. Recta de regresión calculada mediante Passing-Bablok entre LUMIPULSE G1200® (FUJIREBIO) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos)



G1200 y el método de referencia LC-MS/MS es de un 20%; por tanto, dicho inmunoensayo infraestima los valores de 25(OH) vitamina D en un 20% con respecto al patrón-oro. En la figura 5, apreciamos cómo en el caso del analizador CENTAURO® la media de las diferencias es de un 42%, por lo cual los valores que arroja esta técnica son muy inferiores a las del método de referencia. Por otro lado, la técnica LUMIPULSE G1200® presenta una menor dispersión en los resultados.

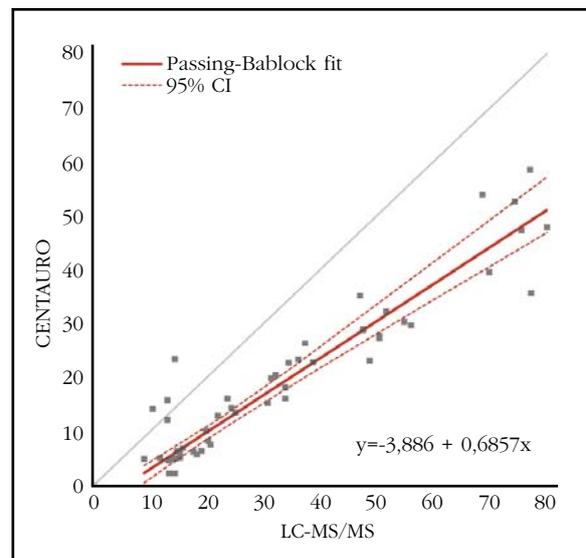
**Discusión**

Ambos métodos presentan una buena correlación entre ellos, siendo los valores obtenidos en el analizador CENTAURO® aproximadamente un 10% inferiores a los obtenidos por el analizador LUMIPULSE G1200®.

La correlación de ambos inmunoensayos con la técnica de referencia LC-MS/MS es buena (aunque más alta para LUMIPULSE que para CENTAURO), lo cual no excluye que los dos métodos infraestimen considerablemente los resultados de 25(OH) vitamina D con respecto al patrón-oro. En esta selección de muestras, que se realizó escogiendo aquéllas donde la discrepancia entre ambos métodos fue mayor, LUMIPULSE G1200 infraestima los valores en un 20%, mientras que CENTAURO® arroja valores de 25(OH) vitamina D un 42% inferiores a los del método de referencia LC-MS/MS. Esta diferencia entre ambos inmunoensayos viene dada por la diferente técnica utilizada (ensayo competitivo en SIEMENS y no competitivo tipo sándwich en FUJIREBIO), el pretratamiento de la muestra para separar la 25(OH) vitamina D de la VDPB y los anticuerpos seleccionados.

En la actualidad, según los estudios realizados, más de la mitad de la población mundial presenta niveles insuficientes o incluso franca deficiencia de vitamina D<sup>11</sup>. Esto puede llegar a considerarse una “epidemia” mundial, pero habría que preguntarse si este estado de hipovitaminosis generalizada está

Figura 3. Recta de regresión calculada mediante Passing-Bablok entre CENTAURO® (SIEMENS) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos)



influido en gran parte por la metodología de análisis utilizada en la determinación de las concentraciones de 25(OH) vitamina D<sup>8,11</sup>.

Esta variabilidad entre inmunoensayos se solucionaría estandarizando las diferentes técnicas comerciales con los materiales de referencia para la medida de 25(OH) vitamina D elaborados por el NIST<sup>12</sup>.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por Laboratorios Fujeribio Europe. Agradecemos de modo especial a Alicia Nadal sus comentarios y su colaboración durante el desarrollo del mismo.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Figura 4. Gráficas de Bland-Altman entre LUMIPULSE G1200® (FUJIREBIO) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos)

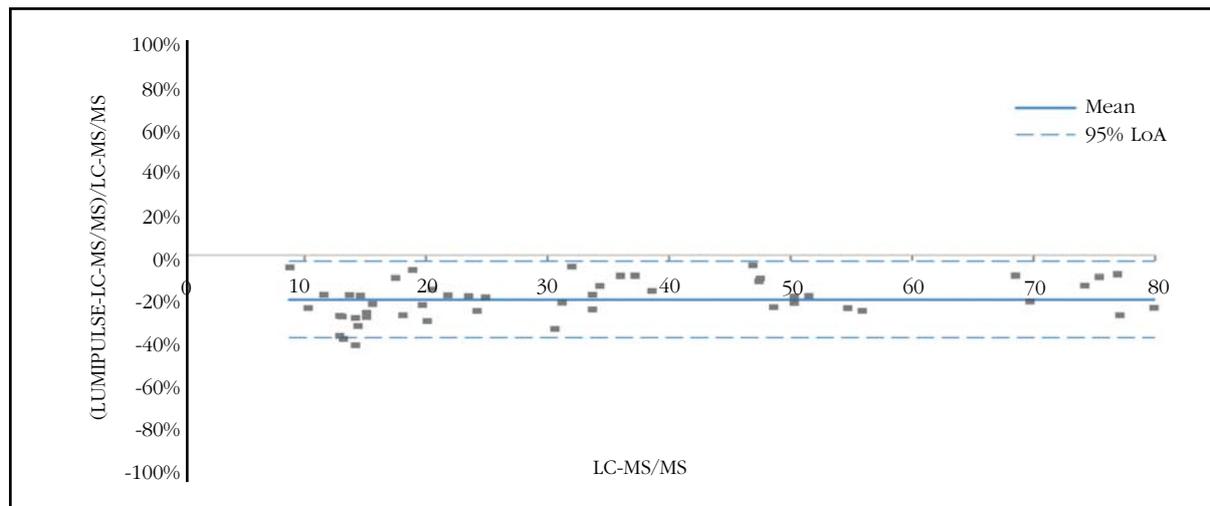
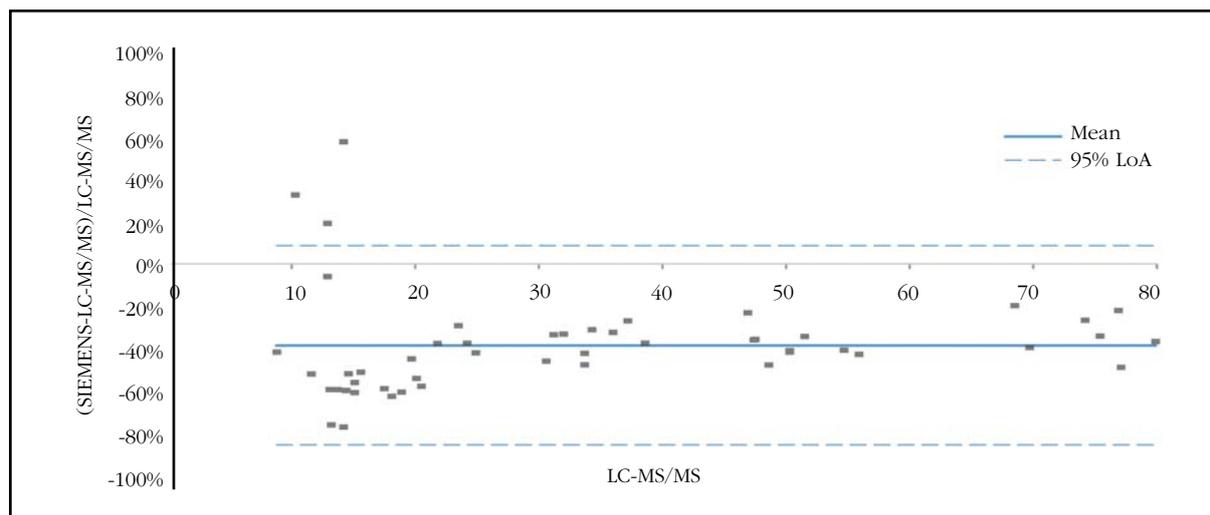


Figura 5. Gráficas de Bland-Altman entre CENTAURO® (SIEMENS) y LC-MS/MS usando 50 muestras seleccionadas (ver Material y Métodos)



## Bibliografía

- Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido E. The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(9):2850-65.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357:266-81.
- 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.
- Ofenloch-Haehnle B. Approaches to measurement of vitamin D concentrations - immunoassays. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012;243:50-3.
- Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytvanghe K, Thienpont LM. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2011;57(3):441-8.
- Kobold U. Approaches to measurement of vitamin D concentrations - mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012;243:54-9.
- 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.
- Ibrahim F, Parmentier C, Boudou P. Divergence in classification of 25-hydroxyvitamin D status with respect to immunoassays. *Clin Chem.* 2007;53(2):363-4.
- Phinney KW. Development of a standard reference material for vitamin D in serum. *Am J Clin Nutr.* 2008;88:511S-2S.
- 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.
- Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. *Mayo Clin Proc.* 2006;81:353-73.
- 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.