

## ORIGINAL

# Influencia del inmunoensayo empleado en la determinación de vitamina D sérica

Silvia Górriz Pintado\* y Pedro Luis Estela Burriel

Área de Diagnóstico Biológico, Hospital Universitario de la Ribera, Alzira, Valencia, España

Recibido el 7 de enero de 2013; aceptado el 29 de abril de 2013

Disponible en Internet el 31 de diciembre de 2013

### PALABRAS CLAVE

Vitamina D;  
Roche;  
Siemens;  
Comparación de  
métodos

### KEYWORDS

Vitamin D;  
Roche;  
Siemens;  
Methods comparison

### Resumen

**Introducción:** La determinación en suero de 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] es el mejor indicador del nivel de vitamina D en el organismo. El principal problema en su determinación es la precisión, reproducibilidad y la falta de estandarización de los métodos disponibles. Nuestro objetivo es comparar los resultados de 25(OH)D medidos por Elecsys Vitamin D Total (Roche) y ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens).

**Material y métodos:** Se analizaron las concentraciones de 25(OH)D en 166 pacientes por ambos métodos. Tras el estudio del total de los pacientes, se consideraron 2 grupos: el grupo suplementado formado por los pacientes que recibían suplementos de vitamina D y el grupo sin tratamiento formado por el resto de pacientes.

**Resultados:** El valor medio de 25(OH)D en el grupo general medido por Roche y por Siemens fue  $33,6 \pm 16,0$  y  $19,8 \pm 12,4$  ng/ml, respectivamente. El 54,2% de los pacientes recibían suplementos de vitamina D. En este grupo el valor medio de 25(OH)D medido por Roche y por Siemens fue  $40,6 \pm 14,5$  y  $25,4 \pm 13,1$  ng/ml; y en el grupo de pacientes sin tratamiento fue  $24,9 \pm 13,2$  y  $12,8 \pm 6,6$  ng/ml, respectivamente. La prevalencia de la insuficiencia de vitamina D (concentraciones séricas de 25(OH)D inferiores a 20 ng/ml) fue más alta para las muestras medidas por Siemens (60,2%) que para las medidas por Roche (23,5%).

**Conclusión:** Los ensayos evaluados no son comparables entre sí. Los especialistas del laboratorio deben informar a los clínicos de las características del método empleado en la determinación de 25(OH)D ya que tendrá consecuencias directas en la interpretación y decisión médica.

© 2013 SEEN. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

### Influence of the immunoassay used in measurement of serum vitamin D levels

### Abstract

**Introduction:** Serum 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] levels are the best indicator of vitamin D levels in the body. Precision, reproducibility, and lack of standardization are the main problems

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [silgopin@hotmail.com](mailto:silgopin@hotmail.com) (S. Górriz Pintado).

in such measurements. The aim of this study was to compare the 25(OH)D levels measured using Elecsys Vitamin D Total (Roche) and ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens).

**Material and methods:** 25(OH)D levels were tested in 166 patients using both methods. Patients were subsequently divided into two groups: a «supplemented group» consisting of patients receiving vitamin D supplements, and an «untreated group» consisting of the rest of patients.

**Results:** 25(OH)D mean levels measured by the Roche and Siemens methods in the overall group were  $33.6 \pm 16.0$  and  $19.8 \pm 12.4$  ng/mL respectively. 54.2% of patients were receiving vitamin D supplements. In this group, mean 25(OH)D levels measured by the Roche and Siemens methods were  $40.6 \pm 14.5$  and  $25.4 \pm 13.1$  ng/mL respectively. In the untreated group, the respective values were  $24.9 \pm 13.2$  and  $12.8 \pm 6.6$  ng/mL. Prevalence of vitamin D deficiency (serum 25(OH)D levels less than 20 ng/mL) was higher in samples analyzed using the Siemens method (60.2%) as compared to those tested using the Roche method (23.5%).

**Conclusion:** The assays evaluated are not comparable to each other. Laboratory specialists should inform clinicians of the features of the method used for measuring 25(OH)D because this will have a direct impact on interpretation of the results and medical decisions.

© 2013 SEEN. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

El interés por la vitamina D ha experimentado un aumento en los últimos años con el avance del conocimiento de sus efectos tanto a nivel óseo como extraóseo, que podrían tener implicaciones fisiológicas y patológicas significativas en distintas enfermedades inmunitarias, cáncer y enfermedad cardiovascular<sup>1-4</sup>.

Existen 2 formas de vitamina D, la vitamina D<sub>3</sub> o colecalciferol que es fisiológica para el ser humano (la mayoritaria en la circulación) y la vitamina D<sub>2</sub> o ergocalciferol que obtenemos en la dieta tras ingerir alimentos de origen vegetal. Ambas formas están disponibles en suplementos farmacológicos o en alimentos fortificados.

El calcidiol o 25-hidroxivitamina D [25(OH)D] es el principal precursor del calcitriol, metabolito biológicamente activo del sistema hormonal de la vitamina D. Su semivida y su elevada concentración sérica lo han convertido en el mejor indicador del nivel de vitamina D.

La determinación de 25(OH)D presenta algunos retos, como la elevada lipofilia de la molécula, la unión a la proteína de transporte, la existencia de 2 formas estructurales similares de diferente origen (endógeno o exógeno) con múltiples metabolitos<sup>5</sup> así como la precisión y reproducibilidad de los métodos disponibles<sup>6</sup>.

En 2010 Tai et al.<sup>7</sup> desarrollaron un método de cromatografía líquida en tándem con espectrómetro de masas (LC-MS/MS) que más tarde el *Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine* ha reconocido como el método de referencia para la medición de 25(OH)D. Su complejidad y la necesidad de personal muy especializado en su manejo lo convierten en un método poco útil en la práctica diaria.

La reciente disponibilidad de inmunoanálisis automatizado permite asumir desde el punto de vista asistencial el aumento en la demanda de la determinación de este parámetro.

Nuestro objetivo es comparar los valores de 25(OH)D obtenidos mediante 2 de los inmunoanálisis actualmente disponibles en el mercado y comprobar la repercusión en la

clasificación de los pacientes según niveles de suficiencia, deficiencia o insuficiencia.

## Material y métodos

### Ámbito de estudio

Estudio observacional descriptivo transversal realizado en el Área de Diagnóstico Biológico del Hospital Universitario La Ribera (Alzira). Este hospital atiende a una población de 260.000 habitantes y se encuentra en la Comunidad Valenciana (5.111.706 habitantes).

### Pacientes

Se analizaron las muestras de suero de 166 pacientes (57,2% mujeres y 42,8% hombres; edad media:  $64,7 \pm 15,5$  años) que acudieron al Hospital Universitario La Ribera o a su centro de salud de atención primaria para efectuarse un análisis rutinario de sangre en el que se les solicitaba la determinación de vitamina D sérica, durante los meses de mayo y junio de 2012. La muestra estudiada está constituida por pacientes con enfermedad renal crónica, enfermedad paratiroidea, osteoporosis, fracturas, enfermedades endocrinas o autoinmunes con afectación renal, raquitismo u osteomalacia.

Del total de pacientes, 92 (52,4%) estaban recibiendo suplementos de vitamina D.

Las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Se analizaron en lotes, con una alícuota recién descongelada utilizada para cada proceso analítico.

### Comparación de métodos

Se compararon los resultados de 25(OH)D medidos por el ensayo Elecsys Vitamin D Total en un Cobas e411 (Roche) y por el ensayo ADVIA Centaur Vitamin D Total en un Advia

Centauro XP (Siemens). Los 2 métodos se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

### **Elecsys Vitamin D Total (Roche, Mannheim, Alemania)**

Elecsys Vitamin D Total (Roche) es un inmunoensayo de unión competitiva a la proteína de fijación con detección por electroquimioluminiscencia (ECLIA). En concreto, hemos utilizado la última versión de este ensayo que la casa comercial ha lanzado al mercado tras su modificación.

Emplea ditiotreitol e hidróxido sódico para liberar la 25(OH)D de su proteína plasmática de fijación. Tras este paso, las muestras se incuban con proteína de fijación de la vitamina D marcada con rutenio. Se adiciona 25(OH)D biotinilada que ocupará los sitios libres de la proteína de fijación. Al aplicar una corriente eléctrica en la célula de lectura se produce la reacción quimioluminiscente.

La sensibilidad funcional del ensayo es de 4,0 ng/ml (10,0 nmol/l). La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos es de 98% para 25(OH)D<sub>3</sub>, 81% para 25(OH)D<sub>2</sub> y 93% epímero C3 de 25(OH)D<sub>3</sub>.

### **ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens, Frimley Camberley, Reino Unido)**

ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens) es un inmunoensayo competitivo de un solo paso. Emplea un agente liberador en tampón salino con azida sódica, un anticuerpo monoclonal murino antifuoresceína unido covalentemente a partículas paramagnéticas, un anticuerpo monoclonal murino anti-25(OH)D marcado con éster de acridinio, y un análogo de vitamina D marcado con fluoresceína.

La sensibilidad funcional del ensayo es de 3,3 ng/ml (8,3 nmol/l). La especificidad analítica reflejada a través del porcentaje de reactividad cruzada con otros metabolitos es de 97,4% para 25(OH)D<sub>3</sub>, 106,2% para 25(OH)D<sub>2</sub> y 1% epímero C3 de 25(OH)D<sub>3</sub>.

### **Análisis estadístico**

Los resultados de las 166 muestras se analizaron mediante análisis de Bland-Altman, regresión de Passing-Bablok, coeficiente de correlación de concordancia (CCC), kappa (k). La distribución de los datos se analizó mediante diagramas de cajas. Los valores de 25(OH)D se expresaron en ng/ml (1 ng/ml equivale a 2,5 nmol/l). El análisis estadístico se realizó mediante el software Medcalc versión 12.3.0. Valores de  $p < 0,005$  se consideraron estadísticamente significativos.

Tras el estudio del total de las muestras se consideraron 2 grupos: el grupo suplementado formado por las 92 muestras de los pacientes que recibían suplementos de vitamina D<sub>3</sub>, y el grupo sin tratamiento formado por las 74 muestras de los pacientes que no recibían suplementos de vitamina D<sub>3</sub>. Ningún paciente estaba en tratamiento con suplementos de vitamina D<sub>2</sub>. La distribución de los pacientes en grupos se realizó tras la revisión bibliográfica del tema en la que se ponía de manifiesto la posibilidad de que algunos ensayos para la determinación de la 25(OH)D no fueran capaces

de reconocer la fracción exógena de la misma, es decir, la administrada con suplementos farmacológicos o con la dieta<sup>8</sup>.

### **Análisis de Bland-Altman**

El análisis de Bland-Altman<sup>9,10</sup> es un método gráfico para comparar 2 técnicas de medición. En este método las diferencias (o proporciones) entre las 2 técnicas se representan frente a los promedios de ambas. Los límites de concordancia se definen como la diferencia de la media  $\pm 1,96$  veces la desviación estándar de las diferencias. Si estos límites no son clínicamente importantes, los 2 métodos se pueden usar indistintamente.

### **Regresión de Passing-Bablok**

La regresión de Passing-Bablok<sup>11</sup> es un procedimiento de regresión lineal que calcula una ecuación de regresión incluyendo el intervalo de confianza (IC) del 95% de la ordenada en el origen (A) y de la pendiente (B). Este procedimiento requiere que las variables sean continuas y que exista una relación lineal entre los 2 métodos.

A es una medida de las diferencias sistemáticas constantes entre los 2 métodos. El IC del 95% de A puede ser utilizado para probar la hipótesis de que  $A = 0$ . Si la hipótesis es rechazada, existen diferencias sistemáticas constantes entre ambos métodos.

B es una medida de las diferencias sistemáticas proporcionales entre los 2 métodos. El IC del 95% de B puede ser utilizado para probar la hipótesis de que  $B = 1$ . Si la hipótesis es rechazada, existen diferencias sistemáticas proporcionales entre los métodos.

La desviación estándar residual (RSD) es una medida de las diferencias aleatorias entre los 2 métodos. El 95% de las diferencias aleatorias se espera que se encuentren en el intervalo de  $\pm 1,96$  veces RSD. Si este intervalo es amplio, los 2 métodos pueden no ser comparables.

La hipótesis de linealidad se comprueba mediante la prueba de suma de linealidad acumulativa (CUSUM test). Un valor de  $p < 0,05$  indica una desviación significativa de la linealidad.

### **Coeficiente de correlación de concordancia**

El coeficiente de correlación de concordancia (CCC)<sup>12,13</sup> evalúa el grado en que los pares de determinaciones caen en la línea que atraviesa el origen en un ángulo de 45°. Es el resultado del producto entre el coeficiente de correlación de Pearson (medida de precisión) y el factor de corrección del sesgo (medida de exactitud). Resultados superiores a 0,99 indican excelente concordancia; entre 0,99 y 0,95, concordancia sustancial; entre 0,90 y 0,94, moderada concordancia;  $< 0,9$ , escasa concordancia<sup>14</sup>.

### **Valoración de la concordancia de las concentraciones de 25(OH)D**

Se utilizó como guía el documento de posición sobre las necesidades y las concentraciones óptimas de vitamina D

**Tabla 1** Características demográficas y parámetros estadísticos, de los grupos de pacientes estudiados, por ambos ensayos de 25(OH)D

|                                     | Grupo general |           | Grupo sin tratamiento |           | Grupo con tratamiento |           |
|-------------------------------------|---------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| <i>Características demográficas</i> |               |           |                       |           |                       |           |
| Total                               | 166           |           | 74                    |           | 92                    |           |
| Hombres                             | 71 (42,8%)    |           | 33 (44,6%)            |           | 38 (41,3%)            |           |
| Mujeres                             | 95 (57,2%)    |           | 41 (55,4%)            |           | 54 (58,7%)            |           |
| Edad                                | 64,7 (15,5)*  |           | 65,6 (16,2)*          |           | 64,1 (15,0)*          |           |
|                                     | Roche         | Siemens   | Roche                 | Siemens   | Roche                 | Siemens   |
| <i>Resumen estadístico</i>          |               |           |                       |           |                       |           |
| Media (ng/ml)                       | 33,6          | 19,8      | 24,9                  | 12,8      | 40,6                  | 25,4      |
| IC 95%                              | 31,2-36,0     | 17,9-21,7 | 21,8-27,9             | 11,3-14,3 | 37,6-43,6             | 22,7-28,1 |
| Varianza                            | 254,5         | 153,4     | 174,4                 | 43,0      | 210,2                 | 172,3     |
| Desviación estándar                 | 16,0          | 12,4      | 13,2                  | 6,6       | 14,5                  | 13,1      |
| Mediana (ng/ml)                     | 32,2          | 16,2      | 22,5                  | 11,1      | 39,9                  | 22,7      |
| IC 95%                              | 29,6-35,1     | 14,0-18,8 | 18,1-26,8             | 9,8-12,2  | 35,8-45,1             | 19,9-26,4 |
| Mínimo (ng/ml)                      | 5,0           | 4,5       | 5,0                   | 4,5       | 9,9                   | 7,3       |
| Máximo (ng/ml)                      | 68,5          | 63,3      | 68,1                  | 38,7      | 68,5                  | 63,3      |
| Distribución normal                 | 0,0005        | < 0,0001  | 0,0108                | < 0,0001  | 0,1088                | 0,0051    |

IC: intervalo de confianza.

\* Los valores con cifras entre paréntesis indican media y desviación estándar (DE).

elaborado por la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM) junto con sociedades afines<sup>15</sup>. La suficiencia de vitamina D se definió como las concentraciones séricas de 25(OH)D superiores a 30 ng/ml (> 75 nmol/l), la insuficiencia de vitamina D se definió como las concentraciones séricas de 25(OH)D entre 20-30 ng/ml (50-75 nmol/l) y la deficiencia de vitamina D como las concentraciones séricas de 25(OH)D inferiores a 20 ng/ml (< 50 nmol/l).

La concordancia en la evaluación del estado de la vitamina D entre los ensayos se evaluó mediante  $k^{16,17}$ , valores de  $k$  inferiores a 0,4 indican escasa concordancia; valores entre 0,4-0,75, de regular a buena; valores superiores a 0,75, excelente.

## Resultados

### Comparación entre ensayos

Los resultados de 25(OH)D medidos por Elecsys Vitamin D Total (Roche) y ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens), así como las características de los grupos se resumen en la [tabla 1](#). La distribución individual de los datos en el grupo general ilustra las diferencias significativas entre los ensayos para estas muestras ([fig. 1](#)).

En la [figura 2](#) se expone, mediante análisis de Bland-Altman, la concordancia entre los resultados obtenidos en el ensayo Elecsys Vitamin D Total (Roche) y ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens). El valor medio del sesgo fue mayor para el grupo en tratamiento (15,2 ng/ml [38,0 nmol/l]) que para el grupo sin tratamiento (12,1 ng/ml [30,3 nmol/l]). Gráficamente se observó una mayor concordancia entre ambos ensayos cuando se excluyen los pacientes que reciben suplementos de vitamina D. La dispersión de los resultados obtenidos (tendencia positiva en ambos

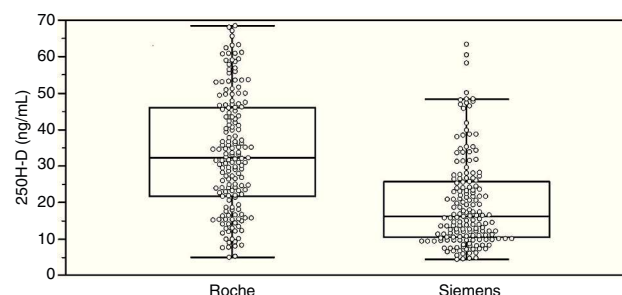
grupos) indicó que el grado de concordancia disminuye cuanto mayor es el valor de 25(OH)D medida.

Los resultados de la regresión de Passing-Bablok así como del análisis del CCC se muestran en la [tabla 2](#).

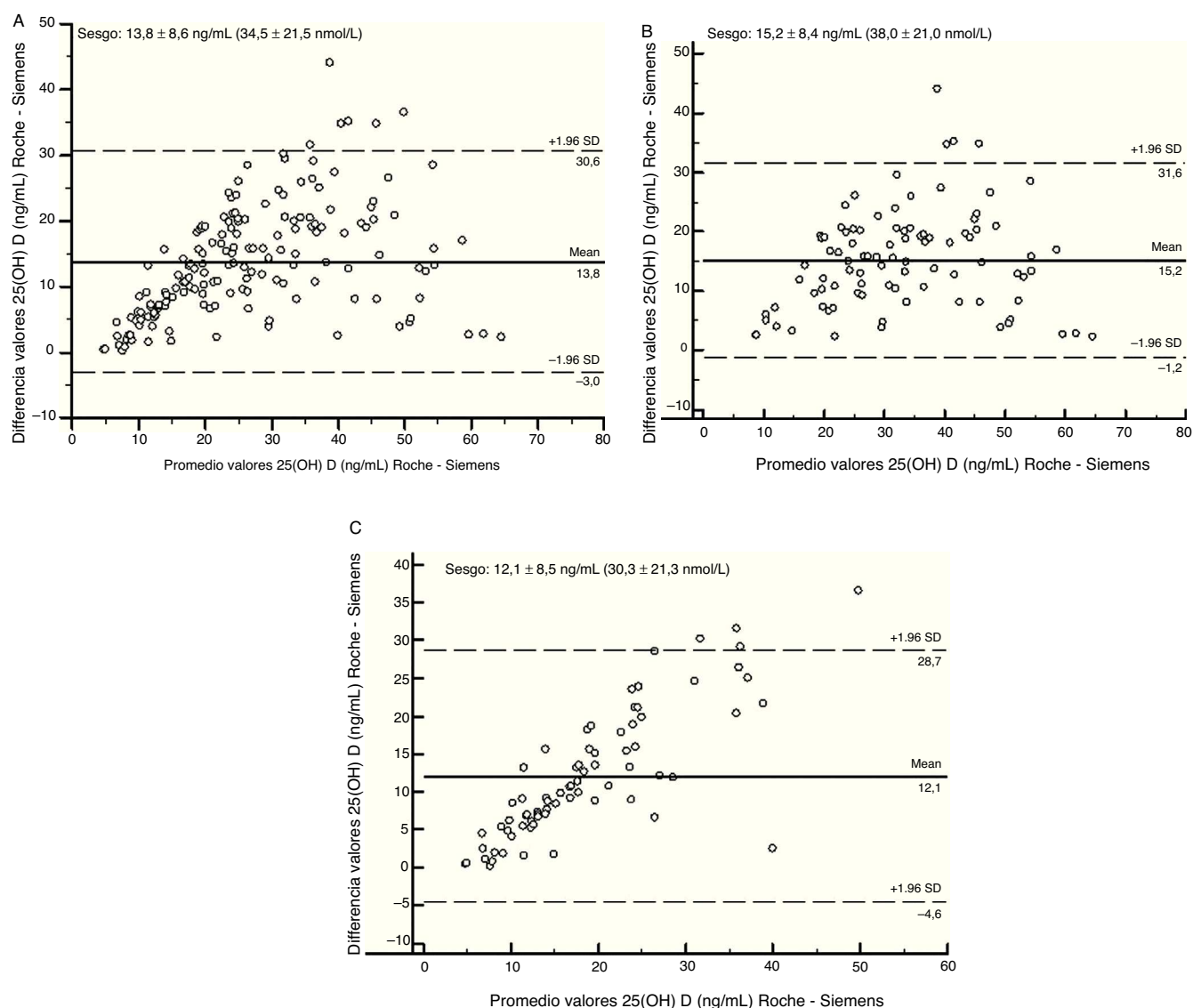
### Concordancia en la evaluación del estado de la vitamina D

Comparamos la proporción de muestras que se clasificaban en los diferentes estados de vitamina D en función de las concentraciones séricas de 25(OH)D obtenidas por ambos métodos.

Si contemplamos los 3 posibles estados de vitamina D propuestos por la SEIOMM, obtuvimos valores similares para  $k$  tanto en general como en el grupo con tratamiento y en el grupo sin tratamiento ( $k = 0,2$ ;  $k = 0,1$ ;  $k = 0,1$ , respectivamente). Si solo utilizábamos el valor de 20 ng/ml (50 nmol/l) como punto de corte, al ser considerados los valores inferiores a este punto claramente patológicos, encontramos



**Figura 1** Diagrama de cajas que muestra la distribución de los resultados de 25(OH)D (ng/ml) obtenidos por el ensayo Elecsys Vitamin D Total (Roche) y el ensayo ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens).



**Figura 2** Comparación de métodos mediante gráficos de Bland-Altman. Los gráficos muestran el sesgo en ng/ml (1 ng/ml equivale a 2,5 nmol/l). A: todos los pacientes; B: grupo suplementado; C: grupo sin suplementos.

igualmente valores similares de  $k$  tanto en general como en el grupo con tratamiento y en el grupo sin tratamiento ( $k=0,3$ ;  $k=0,2$ ;  $k=0,2$ , respectivamente).

Siemens propone valores de corte diferentes para su ensayo ADVIA Centaur Vitamin D Total (10631296.ES Rev.C, 2011-01). La deficiencia de vitamina D la definió como las concentraciones séricas de 25(OH)D inferiores a 10 ng/ml ( $< 25$  nmol/l). Al aplicar este punto de corte para clasificar los resultados obtenidos en este ensayo, obtuvimos valores de  $k$  similares tanto en general, como en el grupo con tratamiento y en el grupo sin tratamiento ( $k=0,8$ ;  $k=0,7$ ;  $k=0,8$ , respectivamente).

## Discusión

En este estudio hemos observado que obtenemos concentraciones más bajas de 25(OH)D (valor medio = 19,8 ng/ml

[49,5 nmol/l]) en el ensayo ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens) respecto al ensayo Elecsys Vitamin D Total (Roche) (valor medio = 33,6 ng/ml [84,0 nmol/l]).

Encontramos diferencias significativas en todas las pruebas estadísticas que hemos realizado. En el análisis de Bland-Altman observamos un mayor sesgo o error sistemático en el grupo de pacientes que reciben tratamiento con suplementos (fig. 2). A pesar de que hemos hallado valores de coeficiente de correlación de Pearson (tabla 2) aceptables, los resultados de CCC inferiores a 0,9 hallados en todos los grupos nos indican la escasa concordancia entre estos 2 métodos. En cuanto a la regresión de Passing-Bablok, encontramos errores proporcionales y constantes de manera simultánea en los grupos estudiados (tabla 2).

El hallazgo de todas estas diferencias entre ambos métodos podría estar causado por el propio diseño de los ensayos. Si analizamos más detenidamente la especificidad según el

**Tabla 2** Análisis Passing-Bablok y concordancia de correlación entre el ensayo Elecsys Vitamin D Total (Roche) y el ensayo ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens) en todos los grupos de pacientes

| Grupo           | Análisis Passing-Bablok |                |      |      |      | Análisis Concordancia de Correlación |            |      |             |
|-----------------|-------------------------|----------------|------|------|------|--------------------------------------|------------|------|-------------|
|                 | A                       | IC 95%         | B    | B    | RSD  | ± 1,96 RSD                           | Cusum test | CCC  | IC 95%      |
| General         | -1,41                   | -3,51 a -0,19  | 0,64 | 0,64 | 5,58 | -10,94 a 10,94                       | p < 0,01   | 0,56 | 0,49 a 0,62 |
| Con tratamiento | -8,75                   | -14,35 a -4,31 | 0,85 | 0,85 | 5,87 | -11,51 a 11,51                       | p = 0,13   | 0,51 | 0,41 a 0,60 |
| Sin tratamiento | 2,59                    | 1,52 a 3,75    | 0,40 | 0,40 | 3,62 | -7,09 a 7,09                         | p = 0,88   | 0,40 | 0,30 a 0,49 |

A: ordenada en el origen; B: pendiente; Cb: factor de corrección del sesgo; CCC: coeficiente de correlación de concordancia; IC: intervalo de confianza; r: coeficiente de correlación de Pearson; RSD: desviación estándar residual.

fabricante, llama especialmente la atención la reactividad cruzada frente al epímero C3 de 25(OH)D<sub>3</sub>. En el ensayo de Roche es del 93%, mientras que esta reactividad cruzada para el ensayo de Siemens es del 1%. Actualmente sabemos que la presencia de este epímero en muestras séricas no se restringe a población infantil sino que también es detectable en población adulta. Las concentraciones halladas oscilan entre 0,1 ng/ml y 47,0 ng/ml (0,25-117,5 nmol/l)<sup>18,19</sup> por lo que algunos autores recomiendan que su medición en pacientes adultos es de especial interés cuando presenten valores bajos de 25(OH)D<sup>20</sup>. Además ambas metodologías utilizan etapas de pretratamiento diferentes para la liberación de la 25(OH)D de la proteína de fijación de la vitamina D, lo que generaría un menor nivel de 25(OH)D apta para su medición. También es posible que el diseño de los anticuerpos empleados por el ensayo de Siemens pudiera estar influyendo en las diferencias halladas. El carácter monoclonal de estos anticuerpos podría resultar en el no reconocimiento de algún derivado de vitamina D exógena que no exprese el epitopo frente al cual fueron diseñados.

Nuestro trabajo presenta algunas limitaciones. Una de ellas es el uso de muestras de suero congeladas para la comparación de ambos métodos. Las muestras fueron congeladas a -20 °C y descongeladas a temperatura ambiente una única vez lo que no debería afectar a las concentraciones de 25(OH)D como demuestran estudios previos de muestras sometidas a ciclos múltiples de congelación-descongelación<sup>21</sup>.

Otra limitación es que no hemos realizado la medida con el método de referencia. Esta limitación es común a la mayoría de los trabajos publicados, ya que la disponibilidad a nivel clínico de realizar LC-MS/MS no es asumible tanto por la complejidad del método como por el aumento de la demanda de esta determinación.

En estudios previos, cuando se comparan con LC-MS/MS, ambos métodos presentan buena correlación pero los resultados obtenidos por ADVIA Centaur Vitamin D Total (Siemens) muestran un error sistemático negativo (-4,3%) y los resultados de Elecsys Vitamin D Total (Roche) muestran un error sistemático positivo (17,4%)<sup>22</sup>.

Una última limitación que cabe señalar es que no hemos estudiado todos los ensayos disponibles en nuestro país para la determinación de 25(OH)D al no contar con los medios apropiados para ello.

En cuanto a la clasificación de los pacientes, no encontramos concordancia entre los métodos al aplicar los valores propuestos por la SEIOMM ( $k < 0,4$ ). La prevalencia de la insuficiencia de vitamina D es notablemente diferente entre los análisis estudiados. Encontramos que es mucho más alta para Siemens en todos los grupos de pacientes (60,2; 40,2 y 85,1%, grupo general, con tratamiento y sin tratamiento, respectivamente) que para Roche (23,5; 7,6 y 43,2%, respectivamente). Esto supone que algunos pacientes podrían recibir tratamiento farmacológico sin necesitarlo, si la determinación se realiza con el ensayo de Siemens, o no ser tratados si la determinación se realiza con el ensayo de Roche. La concordancia en la clasificación de los pacientes mejora ( $k = 0,7-0,8$ ) si aplicamos los valores de referencia para el ensayo ADVIA Centaur Vitamin D Total propuestos por el fabricante aunque estos no se ajusten a los propuestos por las sociedades científicas.

Se ha descrito ampliamente que la prevalencia de la deficiencia de vitamina D constituye un problema de salud pública que afecta a más de la mitad de la población general<sup>3</sup>. En población joven española la prevalencia de la deficiencia de vitamina D es aproximadamente del 28%<sup>23</sup> y en población adulta sana esta prevalencia se sitúa en torno al 65%<sup>24</sup>. Este estado de hipovitaminosis generalizada tal vez esté influido en gran parte por la metodología de análisis utilizada en la determinación de las concentraciones de 25(OH)D.

Ante estas discrepancias, la estandarización de los inmunoanálisis para la medición de vitamina D con un material de referencia apropiado es una necesidad imperativa ya sugerida por otros grupos<sup>25</sup>. Con el lanzamiento del material de referencia estándar (SRM) 972 por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) de Estados Unidos y la puesta en marcha en 2010 del Programa de Estandarización de la Vitamina D (VDSP) se prevé la armonización en todos los ensayos de vitamina D<sup>26,27</sup>.

En conclusión, los ensayos evaluados en este trabajo no son comparables entre sí, a pesar de su aceptable correlación con el método de referencia demostrada en publicaciones previas, por lo que se debería realizar el control del paciente con la misma metodología a lo largo del tratamiento.

En caso de realizar un cambio en la metodología utilizada para la determinación de este parámetro, el laboratorio debería informar a los clínicos de las características del método en cuestión ya que las diferencias entre los resultados de vitamina D obtenidos por los diferentes ensayos tendrán consecuencias directas en la interpretación y decisión médica.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

- Cantorna MT. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence? *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;223:230–3.
- Giovannucci E, Liu Y, Rimm EB, Hollis BW, Fuchs CS, Stampfer MJ, et al. Prospective study of predictors of vitamin D status and cancer incidence and mortality in men. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:451–9.
- Holick MF. Vitamin D: Importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr*. 2004;79:362–71.
- Wang TJ, Pencina MJ, Booth SL, Jacques PF, Ingelsson E, Lanier K, et al. Vitamin D deficiency and risk of cardiovascular disease. *Circulation*. 2008;117:503–11.
- Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:507S–10S.
- Binkley N, Krueger D, Gemar D, Drezner MK. Correlation among 25-hydroxy-vitamin D assays. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:1804–8.
- 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.
- Dowd JE, Stafford D. *The vitamin D cure*. 1st ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2008.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1:307–10.
- Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*. 1999;8:135–60.
- Passing HB. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry. Part I. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983;21:709–20.
- Lin LI. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*. 1989;45:255–68.
- Liao JJ, Lewis JW. A note on concordance correlation coefficient. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2000;54:23–6.
- McBride GB. A proposal for strength-of-agreement criteria for Lin's Concordance Correlation Coefficient. *NIWA Client Report: HAM 2005-062*.
- Gómez de Tejada MJ, Sosa M, del Pino J, Jodar E, Quesada JM, Cancelo MJ, et al. Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral (SEIOMM) y Sociedades afines, Documento de posición sobre las necesidades y niveles óptimos de vitamina D. *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2011;3:53–64.
- Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas*. 1960;20:37–46.
- Fleiss JL, Levin B, Paik MC. *Statistical methods for rates and proportions*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2003.
- 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;97:163–8.
- Strathmann FG, Sadilkova K, Laha TJ, leSourd SE, Bornhorst JA, Hoofnagle AN, et al. 3-epi-25 hydroxyvitamin D concentrations are not correlated with age in a cohort of infants and adults. *Clin Chim Acta*. 2012;413:203–6.
- Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clin Biochem*. 2012. [consultado 4 Oct 2012]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.037>
- Antonucci DM, Black DM, Sellmeyer DE. Serum 25-hydroxyvitamin D is unaffected by multiple freeze-thaw cycles. *Clin Chem*. 2005;51:258–61.
- 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.
- Calatayud M, Jódar E, Sánchez R, Guadalix S, Hawkins F. Prevalencia de concentraciones deficientes e insuficientes de vitamina D en una población joven y sana. *Endocrinol Nutr*. 2009;56:164–9.
- Mata-Granados JM, Luque de Castro MD, Quesada Gómez JM. Inappropriate serum levels of retinol, alpha-tocopherol, 25 hydroxyvitamin D3 and 24,25dihydroxyvitamin D3 levels in healthy Spanish adults: simultaneous assessment by HPLC. *Clin Biochem*. 2008;41:676–80.
- Binkley N, Krueger D, Cowgill S, Plum L, Hansen E, DeLuca F. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89:3152–7.
- 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;58:531–42.
- Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM. Vitamin D Standardization Program (VDSP). Vitamin D status as an international issue: National surveys and the problem of standardization. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2012;243:32–40.