

A doença renal crônica é um importante fator de confusão para a dosagem de 25-hidroxivitamina D

Chronic kidney disease is a main confounding factor for 25-vitamin D measurement

Autores

Hanna Karla Andrade
Guapyassú Machado¹
Carolina Steller Wagner Martins¹
Vanda Jorgetti^{1,2}
Rosilene Motta Elias^{1,3}
Rosa Maria Affonso Moysés^{1,3}

¹ Universidade de São Paulo, Divisão de Nefrologia, São Paulo, SP, Brasil.

² Hospital Samaritano, São Paulo, SP, Brasil.

³ Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP, Brasil.

RESUMO

Antecedentes: As diretrizes atuais recomendam a avaliação do estado da 25-hidroxivitamina D em pacientes com doença renal crônica (DRC). Embora significativas diferenças entre os ensaios tenham sido descritas, o impacto da nesta variabilidade DRC nunca foi testado. **Métodos:** Testamos a variabilidade entre dois ensaios de 25-hidroxivitamina D em pacientes com DRC (TFGe < 60 mL/min/1,73 m²) que realizaram medidas consecutivas de 25-hidroxivitamina D em 2015 (Ensaio 1 - Diasorin LIASON 25 TOTAL - D assay[®]) e 2016 (Ensaio 2 - Beckman Coulter Unicel XI 800[®]). A coorte consistiu de 791 pacientes adultos (122 com função renal normal e 669 com DRC - 33, 30 e 37% nos estágios 3, 4 e 5 em diálise, respectivamente). **Resultados:** Os níveis de 25-hidroxivitamina D foram menores e a prevalência de hipovitaminose D foi maior utilizando o ensaio 1 do que com o ensaio 2 em pacientes com DRC, independentemente dos níveis similares de cálcio, fosfato e paratormônio. Quando a função renal diminuiu, a porcentagem de discordância entre os ensaios aumentou. **Conclusão:** Existe uma notável variabilidade entre os ensaios em pacientes com DRC, de modo a modificar o diagnóstico de hipovitaminose D. O mecanismo por trás desse resultado ainda não está claro e pode ser devido a uma possível interferência no processo analítico. Entretanto, o significado clínico é inquestionável, pois a suplementação de vitamina D pode ser erroneamente prescrita a esses pacientes.

Palavras-chave: Vitamina D; Imunoensaio; Distúrbio Mineral e Ósseo na Doença Renal Crônica; Insuficiência Renal Crônica.

ABSTRACT

Background: Current guidelines recommend assessment of 25-vitamin D status in patients with chronic kidney disease (CKD). Although significant differences among assays have been described, the impact of CKD on this variability has never been tested. **Methods:** We tested the variability between two 25-vitamin D assays in patients with CKD (eGFR < 60 mL/min/1.73m²) who had consecutive 25-vitamin D measurements in 2015 (Assay 1 - Diasorin LIASON 25 TOTAL - D assay[®]) and 2016 (Assay 2 - Beckman Coulter Unicel XI 800[®]). The cohort consisted of 791 adult patients (122 with normal renal function and 669 with CKD - 33, 30, and 37% in stages 3, 4, and 5 on dialysis, respectively). **Results:** Levels of 25-vitamin D were lower and the prevalence of hypovitaminosis D using assay 1 was higher than using assay 2 in patients with CKD, regardless of similar levels of calcium, phosphate, and parathyroid hormone. As kidney function decreased, the percentage of disagreement between the assays increased. **Conclusion:** There is a noteworthy variability between assays in patients with CKD such that the diagnosis of hypovitaminosis D is modified. The mechanism behind this result is still unclear and might be due to a possible interference in the analytical process. However, the clinical significance is unquestionable, as the supplementation of vitamin D can be erroneously prescribed to these patients.

Keywords: Vitamin D; Immunoassay; Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder; Renal Insufficiency, Chronic.

Data de submissão: 10/04/2019.

Data de aprovação: 16/07/2019.

Correspondência para:

Rosa Maria Affonso Moysés.
E-mail: rosa.moyses@uol.com.br

DOI: 10.1590/2175-8239-JBN-2019-0053



INTRODUÇÃO

Vários estudos sugeriram que os efeitos da vitamina D não se limitam a ossos e músculos, proporcionando benefícios clínicos adicionais. [1] Os pacientes que são triados para deficiência de vitamina D geralmente recebem suplementação de ergocalciferol (D2) ou colecalciferol (D3).¹

Recomendações clínicas para a triagem e tratamento da deficiência de vitamina D são altamente variáveis e controversas. No entanto, há consenso de que pacientes com doença renal crônica (DRC) devem receber suplementação, pois apresentam risco aumentado de hipovitaminose D e hiperparatireoidismo secundário.^{1,2}

A variabilidade inter-ensaio é um fator de confusão que desafia a precisão da medida da 25-hidroxivitamina D. Como o método padrão-ouro (cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC) é considerado um ensaio complicado, outras opções são usadas^{3,4}. Normalmente, a validação de novos ensaios para 25-hidroxivitamina D é feita através da comparação com os resultados da HPLC.⁵⁻⁷ No entanto, a população com DRC não é bem representada, ou é excluída desses estudos.^{2,4,8-10}

Neste estudo, investigamos o impacto de vários estágios da DRC na variabilidade entre dois ensaios de quimiluminescência para 25-hidroxivitamina D.

PACIENTES E MÉTODOS

POPULAÇÃO DE ORIGEM E COLETA DE DADOS

Este foi um estudo retrospectivo para comparar duas medições de ensaios de 25-hidroxivitamina D com pacientes de um ambulatório de nefrologia localizado no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, Brasil.

Os dados foram obtidos a partir de prontuários eletrônicos. Nós selecionamos um total de 991 pacientes que tiveram duas medições consecutivas de 25-hidroxivitamina D, uma em 2015 (período 1) e uma em 2016 (período 2). Em 2015, a 25-hidroxivitamina D sérica foi medida utilizando o Diasorin LIASON 25 TOTAL-D assay® (Ensaio 1) e, em 2016, foi medida com o Beckman Coulter Unicel XI 800® (Ensaio 2). Excluímos receptores de transplante renal (n = 121) e pacientes com dados faltantes sobre variáveis de interesse (n = 79), que incluíam cálcio, fosfato, PTH e taxa estimada de filtração glomerular (TFGe). Os restantes 791 pacientes foram divididos de acordo

com a função renal, com base na TFGe calculada pela equação CKD-EPI. Os pacientes foram classificados por estágio de DRC e os resultados do ensaio 1 e ensaio 2 foram comparados. A figura S1 resume este fluxograma.

Os dados coletados incluíram idade, gênero, cálcio sérico (Ca; intervalo de referência [IR] = 4,6-5,3 mg/dL), fosfatase alcalina sérica (AP; IR = 32-129 U/L), fosfato sérico (P; IR = 2,7 - 4,5 mg/dL), hormônio intacto da paratireóide (PTH; IR 15-65 pg/mL) e 25-hidroxivitamina D sérica obtida com os ensaios 1 e 2 - pelo método de quimiluminescência. Também coletamos dados sobre a suplementação de colecalciferol (UI/semana). Os níveis normais de 25-hidroxivitamina D foram definidos como iguais ou superiores a 30 ng/mL, enquanto a hipovitaminose foi considerada quando os níveis séricos estavam abaixo de 30 ng/mL.

O Comitê de Ética em Pesquisa local aprovou este estudo (CAPESQ # 45163715.4.0000.0068).

ENSAIOS PARA MEDIÇÕES DE 25-HIDROXIVITAMINA D

O ensaio 1, utilizado no primeiro período de avaliação, é um imunoenensaio com quimiluminescência que quantifica a 25-hidroxivitamina D e outros metabólitos hidroxilados da vitamina D no soro humano. É um imunoenensaio quimiluminescente competitivo direto (CLIA). A unidade de medida é ng/mL e sua faixa de medição é de 4-150 ng/mL. O ensaio 2, utilizado no segundo período de avaliação, é um ensaio imunoenzimático de ligação competitiva de dois passos que utiliza um conjugado análogo de 25-hidroxivitamina D - fosfatase alcalina - que é adicionado e compete pela ligação à anti-25-hidroxivitamina D monoclonal imobilizada.¹¹ Os resultados variam de 7,0 a 120 ng/mL. A quantidade de analito na amostra é determinada a partir de uma curva de calibração multiponto armazenada.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são relatados como média ± DP ou mediana e percentis 25 e 75 para as variáveis com distribuição normal e não-normal, respectivamente. Comparações entre grupos de acordo com a função renal foram feitas por ANOVA ou Kruskal-Wallis, segundo a distribuição dos dados. Utilizou-se o teste-t de Student ou o teste de Mann-Whitney para comparar as variáveis entre os ensaios 1 e 2. Para comparar as variáveis categóricas, utilizou-se o teste do qui-quadrado ou

teste de Fisher, conforme apropriado. As comparações entre os dois ensaios para medição de 25-hidroxivitamina D foram realizadas utilizando a abordagem de Bland-Altman. Utilizamos o SPSS 21.0 (SPSS Inc., Chicago IL) e o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) para análises estatísticas.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra as características dos pacientes, classificados de acordo com a TFG_e. Pacientes com TFG_e > 90 mL/min/1,73m² eram mais jovens e tinham níveis mais baixos de PTH, enquanto aqueles em diálise apresentavam Ca sérico mais baixo, com altos P e PTH. Suplementação e doses de vitamina D3 foram semelhantes entre os grupos e entre os ensaios 1 e 2. No entanto, os níveis de 25-hidroxivitamina D detectados pelo ensaio 2 foram superiores aos do ensaio 1, sem diferenças nos níveis de P, Ca e PTH entre os dois períodos. Essa diferença foi significativa apenas para pacientes com TFG_e abaixo de 60 mL/min/1,73 m².

A prevalência de hipovitaminose D foi maior usando o ensaio 1 em pacientes com TFG_e menor que 60mL/min/1,73m² e DRT em diálise (Figura S2). A porcentagem de pacientes classificados com níveis normais ou baixos de 25-hidroxivitamina D usando os ensaios 1 e 2 está na Tabela S1. De nota, à medida que a TFG_e diminui, a porcentagem de desacordo entre os ensaios aumenta. Gráficos de Bland-Altman mostrando concordância entre os ensaios 1 e 2 estão mostrados na Figura 1. Os limites de concordância foram mais estreitos em pacientes com TFG_e > 90 mL/min/1,73 m².

DISCUSSÃO

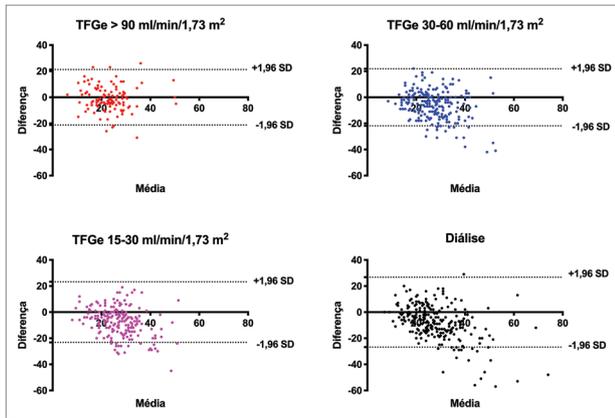
Os resultados deste estudo mostram uma discordância entre os dois ensaios para medição de 25-hidroxivitamina D em pacientes com DRC, indicando que uma proporção relativamente significativa de pacientes foi classificada erroneamente como tendo hipovitaminose D ou em estado normal de 25-hidroxivitamina D. O menor viés foi obtido em pacientes com função renal normal (TFG_e > 90 mL/min/1,73 m²), sugerindo a

TABELA 1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES SEGUNDO A TAXA ESTIMADA DE FILTRAÇÃO GLOMERULAR (TFG_e) USANDO OS ENSAIOS 1 E 2 PARA MEDIR A 25-HIDROXIVITAMINA D

TFG _e , mL/min/1,73m ²	TODOS N = 791	> 90 N = 122	30-60 N = 221	15-30 N = 198	DRT em diálise N = 250
Idade (anos)	57 ± 19	39 ± 14 ^a	62 ± 16	66 ± 15	53 ± 18
Masculino (%)	49,5	33,0 ^a	56,0	52,0	50,0
Ensaio 1					
Ca (mg/dL)	9,3 ± 0,6	9,2 ± 0,6	9,4 ± 0,5 ^b	9,4 ± 0,4	9,2 ± 0,7 ^b
P (mg/dL)	3,5 ± 0,6	3,5 ± 0,6	3,4 ± 0,6	3,6 ± 0,6	3,9 ± 0,7 ^a
PTH (pg/mL)	75 (46; 121)	30 (23; 43) ^a	58 (44; 79) ^a	99 (67; 151) ^a	125 (98; 191) ^a
25 Hidvit D (ng/dL)	23,9 ± 8,9	23,3 ± 10,2	24,0 ± 8,4	23,9 ± 8,5	24,0 ± 9,1
Vit. D3 suplementação					
Uso (%)	52,3	57,4	44,8	54,0	55,2
Doses (1,000 UI/semana)	12,5 (10,0; 20,0)	13,3 (10,0; 20,0)	12,0 (10,0; 15,0)	12,5 (10,0; 20,0)	12,5 (10,0; 20,0)
Ensaio 2					
Ca (mg/dL)	9,3 ± 0,6	9,3 ± 0,6 ^c	9,6 ± 0,6 ^a	9,3 ± 0,5	9,0 ± 0,6 ^a
P (mg/dL)	3,6 ± 0,7 ^c	3,5 ± 0,6	3,4 ± 0,6	3,6 ± 0,6	4,3 ± 0,8 ^a
PTH (pg/mL)	82 (53; 134)	33 (24; 41) ^a	61 (48; 84) ^a	104 (80; 142) ^a	177 (119; 252) ^a
25 Hidvit D (ng/dL)	30,0 ± 12,3 ^c	23,9 ± 9,0 ^a	30,2 ± 10,9 ^c	30,9 ± 11,1 ^c	32,0 ± 14,8 ^c
Vit.D3 suplementação					
Uso (%)	54,5	65,6	48,9	59,1	50,4
Doses (1,000 UI/semana)	12,5 (8,0; 20,0)	12,5 (10,0; 20,0)	12,5 (10,0; 20,0)	12,0 (7,0; 20,0)	14,0 (10,0; 25,0)

a, p < 0,05 vs. todos os outros grupos; b, p < 0.05 vs. > 90 e 30-60; c, p < 0.05 vs. a mesma variável usando o Ensaio 1.

Figura 1. Gráfico de concordância de Bland Altman entre a 25-hidroxivitamina D medida pelos ensaios 1 e 2. As linhas pontilhadas horizontais representam limites de concordância (por exemplo, diferença de 1,96 nos desvios-padrão de intermodalidade). Vieses foram $-0,6 \pm 10,6$; $-6,1 \pm 10,9$; $-7,0 \pm 11,6$; e $-7,9 \pm 13,4$ em grupos com TFGe > 90 ; 30-60; 15-30 mL/min/1,73m²; e DRT em diálise, respectivamente. Os limites de concordância foram $-21,4$ a $-20,2$; $-27,6$ a $-15,3$; $-29,8$ a $-15,7$; e $-34,2$ a $-18,3$ em grupos com TFGe > 90 ; 30-60; 15-30 mL/min/1,73m² e DRT em diálise, respectivamente.



presença de alguma interferência não identificada na população com DRC que poderia impactar os resultados dos ensaios.

Este estudo foi motivado pela observação geral de níveis mais altos de 25-hidroxivitamina D no serviço de Nefrologia, apesar de não haver mudanças tanto na suplementação rotineira de colecalciferol quanto nos níveis de cálcio, fosfato e PTH. Com isso em mente, fomos informados sobre o novo ensaio que estava sendo usado. Além disso, se os níveis de 25-hidroxivitamina D fossem realmente maiores, como o segundo ensaio mostrou, por que o PTH não diminuiu?¹

A pergunta associada a essa comparação é se qualquer um dos dois ensaios poderia ser usado para medir os níveis de 25-hidroxivitamina D uniformemente. Para responder a isso, a 25-hidroxivitamina D deve ser medida ao mesmo tempo com amostragem simultânea. As medições com os ensaios testados feitos com apenas meses de intervalo são certamente uma limitação do nosso estudo. No entanto, uma vez que os níveis de cálcio, fosfato, PTH e a suplementação de vitamina D permaneceram inalterados entre as duas medições, sugere-se que os níveis de 25-hidroxivitamina D também devem ser semelhantes.

No entanto, parte da diferença entre as medidas da 25-hidroxivitamina D pode ser explicada pela estação do ano (verão versus inverno). No entanto, é improvável que isso tenha ocorrido em nosso estudo, uma vez que o segundo ensaio foi realizado durante o

inverno (menos exposição ao sol) e níveis ainda mais altos de 25-vitamina D foram encontrados.

Portanto, nossa hipótese principal dependia do processo analítico. Como mencionado anteriormente, a população com DRC é geralmente excluída dos estudos, e estudos comparando ensaios usando HPLC nessa população são inexistentes. Nossos achados destacaram que a discordância foi principalmente em pacientes com TFGe < 60 mL/min/1,73m². Nossa hipótese é que: 1. Fragmentos não ativos, como a uréia ou outros metabólitos retidos, presentes nessa população podem ser reconhecidos como 25-hidroxivitamina D intacta e afetar o desempenho do ensaio^{3,8,12-14}; 2. Como o ensaio 2 utiliza conjugado análogo de fosfatase alcalina, que compete pela ligação ao anti-25-hidroxivitamina D monoclonal antes de ser lido pelo luminômetro e os pacientes com DRC usualmente apresentam fosfatase alcalina endógena mais alta, isso funciona como uma interferência e pode causar valor falso positivo¹⁵; 3. O ensaio 2 não deve ser usado em pacientes em uso de paricalcitol, que também é muito comum nessa população. No entanto, em nossa amostra, nenhum dos pacientes estava usando essa droga.

Em suma, encontramos um desacordo entre os dois ensaios para medições de 25-hidroxivitamina D, o que é de importância clínica em pacientes com DRC. Nesta população, devemos nos esforçar para desenvolver a padronização do ensaio. Não está claro por que existe tal discordância entre os ensaios. No entanto, os médicos devem estar atentos às limitações dos imunoenaios e interpretar os resultados com cautela para evitar erros de interpretação e prescrição errônea da suplementação de vitamina D.

AGRADECIMENTOS

A VJ e a RMAM têm bolsa do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (ver os números 303684 / 2013-5 e 304249 / 2013-0, respectivamente). Esse apoio financeiro não teve papel no desenho do estudo; coleta, análise e interpretação de dados; elaboração do relatório e decisão de submeter o relatório para publicação.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Hanna Karla Andrade Guapyassú Machado, Carolina Steller Wagner Martins, Vanda Jorgetti, Rosilene Motta Elias, Rosa Maria Affonso Moysés contribuíram substancialmente para a concepção ou desenho

do estudo; coleta, análise ou interpretação de dados; redação ou revisão crítica do manuscrito; e aprovação final da versão a ser publicada.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não terem conflito de interesse relacionado à publicação deste manuscrito.

MATERIAL SUPLEMENTAR

O seguinte material on-line está disponível para este artigo:

Figura S1 - Fluxograma dos pacientes incluídos no estudo.

Figura S2 - Prevalência de hipovitaminose D de acordo com a função renal (TFGe > 90 ou <60 ml/min/1,73m²).

Tabela S1 - Comparação entre a prevalência normal e baixa de 25-vitamina D sérica entre os ensaios 1 e 2

REFERÊNCIAS

- Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009;19:73-8. DOI: 10.1016/J.ANNEPIDEM.2007.12.001
- Yadav AK, Kumar V, Kumar V, Banerjee D, Gupta KL, Jha V. The Effect of Vitamin D Supplementation on Bone Metabolic Markers in Chronic Kidney Disease. *J Bone Miner Res* 2018;33:404-9. DOI: 10.1002/JBMR.3314
- Carter GD. 25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte. *Clin Chem* 2012;58:486-8. DOI: 10.1373/CLINCHEM.2011.180562
- Hollis BW. Assessment and interpretation of circulating 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D in the clinical environment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39:271-86. DOI: 10.1016/J.ECL.2010.02.012
- Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, Thamm M, Tian L, Merkel JM, et al. Vitamin D measurement standardization: The way out of the chaos. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017;173:117-21. DOI: 10.1016/J.JSBMB.2016.12.002
- Carter GD, Jones JC, Berry JL. The anomalous behaviour of exogenous 25-hydroxyvitamin D in competitive binding assays. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007;103:480-2. DOI: 10.1016/J.JSBMB.2006.11.007
- Lucas RM, Gorman S, Black L, Neale RE. Clinical, Research, and Public Health Implications of Poor Measurement of Vitamin D Status. *J AOAC Int* 2017;100:1225-9. DOI: 10.5740/JAOACINT.17-0082
- Depreter B, Heijboer AC, Langlois MR. Accuracy of three automated 25-hydroxyvitamin D assays in hemodialysis patients. *Clin Chim Acta.* 2013;415:255-60. DOI: 10.1016/J.CCA.2012.10.056
- Jones G. Interpreting vitamin D assay results: proceed with caution. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:331-4. DOI: 10.2215/CJN.05490614
- Malmstroem S, Rejnmark L, Imboden JB, Shoback DM, Bikle DD. Current Assays to Determine Free 25-Hydroxyvitamin D in Serum. *J AOAC Int* 2017;100:1323-7. DOI: 10.5740/JAOACINT.17-0085
- Ozcan N, Ucar F, Arzuhal AE, Bulut E, Ozturk A, Taslipinar Yavuz M, et al. Evaluation of the analytical performance of Unicel DXI 800 for the Total 25 (OH) Vitamin D measurements. *Clin Biochem* 2016;49:486-91. DOI: 10.1016/J.CLINBIOCHEM.2015.11.022
- Couchman L, Moniz CF. Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2017;9:97-104. DOI: 10.1177/1759720X17692500
- Heureux N, Lindhout E, Swinkels L. A Direct Assay for Measuring Free 25-Hydroxyvitamin D. *J AOAC Int* 2017;100:1318-22. DOI: 10.5740/JAOACINT.17-0084
- Wootton AM. Improving the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem Rev* 2005;26:33-6.
- Lingwood D, Ballantyne JS. Alkaline phosphatase-immunoglobulin conjugate binds to lipids in vitro, independent of antibody selectivity. *J Immunol Methods* 2006;311:174-7. DOI: 10.1016/J.JIM.2006.02.002