

Aktualizace poznatků o stavu měření 25-hydroxyvitaminu D v séru/plasmě. Minireview 2015 - 2016.

Friedecký B., Vávrová J.

ÚKBD Fakultní nemocnice, Hradec Králové

SOUHRN

Cíl: Aktualizace problémů měřením 25-hydroxyvitaminu D v séru

Metoda: Informace z webových stránek a dokumentů mezinárodního programu standardizace vitamínu D (VDSP) a přehled recentních prací, týkajících se tématu.

Výsledky: Prozatímní pozitivní efekt výsledků standardizace vitamínu D v programu VDSP není po cca jednom roce výrazný ani v preciznosti, ani v hodnotách bias měření. Vcelku podle očekávání mají větší problémy s analytickou kvalitou imunochemické metody než separační. Proces standardizace pokračuje v roce 2016 testováním komutability kontrolních materiálů CAP USA a DEQAS UK, které jsou plánovány jako nástroje verifikace standardizačního procesu v rutinních klinických laboratořích. Velké úsilí je věnováno negativním vlivům na kvalitu a ovlivnění imunochemických metod, kterých je celá řada. Tyto vlivy jsou o to složitější, že jsou velmi rozdílné u různých imunochemických metod. Patří sem různá úroveň křížových reakcí u 25-hydroxyvitaminu D₂, interference 24, 25-dihydroxyvitaminu D, vliv vazebného proteinu pro vitamin D (VDBP) a rozdílná reaktivita imunochemických metod pro 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃.

Diskuse: Diference hodnot bias způsobují významné diference v počtech jedinců při klasifikaci deficiencie vitamínu D, vliv 3-epi-25-OH D₃ může dělat problémy při měření a klasifikaci u dětí a ovlivnění výsledků VDBP problematizuje používání imunochemických metod u dialyzovaných pacientů.

Klíčová slova: VDSP, VDBP, 25-hydroxyvitamin D, 25-hydroxyvitamin D₂, 24, 25-dihydroxyvitamin D, 3-epi hydroxyvitamin D₃

SUMMARY

Friedecký B., Vávrová J.: Actualization of knowledge about the state of measurement of 25-hydroxyvitamin D in serum. A mini-review 2015 – 2016.

Objective: Actualization of statement in 25-hydroxyvitamin D measurement

Method: Information from websites and other documents of international vitamin D standardization program VDSP and from recent publications deals with 25-hydroxyvitamin D measurements in human serum

Results: After 1 year we can see that effect of international standardization program VDSP is negligible both in precision and bias values. Significantly higher problems with analytical quality show immunochemical methods than separate measurements. Standardization process VDSP continues in 2015-2016 by study of the commutability experiments. Their target is to create highly commutable control materials for CAP and DEQAS programs, assured reliable verification of standardization level in routine and research clinical laboratories. Many recent publications are devoted to assessment of components, negatively influenced the results of 25-hydroxyvitamin D measurements in serum samples. Objects of interest are namely 25-hydroxyvitamin D₂ and its level of cross immunoreaction, influence on bias level by 24, 25-dihydroxyvitamin D content, problems with 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃, and also with vitamin D bound protein (VDBP). These influences, resulted to elevated bias values are much more frequented in immunochemical methods than in separate methods and are in different immunochemical methods very different.

Discussion: Risk of increased bias values namely in immunochemical methods can decreased reliability of classification of deficiency by vitamin D in individual patients. It also can be the source of problems in analysis of children due to high concentration of 3-epi-25-hydroxyvitamin D₃ and in analysis of dialyzed patients due to problems with VDBP.

Keywords: VDSP; VDBP; 25-hydroxyvitamine D; 25-hydroxyvitamine D₂; 24, 25-dihydroxyvitamine D; 3-epi hydroxyvitamin D₃.

Mezinárodní standardizační program VDSP/VDSCP (Vitamin D standardization program/vitamin D standardization certification program)

Poznatky o mezinárodním standardizačním procesu při měření vitamínu D jsou k nalezení na volně přístupném a obsahově aktualizovaném webu <https://ods.nih.gov>.

Z obsahu stránek vyjímáme pro naše sdělení některá data.

Reference

Systém VDSP používá dvou referenčních metod. Metody NIST [1] a metody GHENT [2]. Metoda Ghent dosahuje

preciznosti 1 - 2,5% a kombinované nejistoty 3 - 4%, metoda NIST uvádí preciznost v intervalu CV= < 1 – 2%. Metody stanovují souběžně 25-hydroxyvitamin D₃ a 25-hydroxyvitamin D₂. Certifikovanými referenčními materiály, na kterých je založena kalibrace referenčních metod systému VDSP jsou SRM 972a NIST a SRM 2972 NIST.

Cíle VDSP

- Tvorba referenčního měřicího systému
- Kalibrace komerčních kitů pomocí referenčního měřicího systému
- Verifikace standardizace v laboratořích pomocí systémů EQA/PT CAP a DEQAS (na oba uvedené systémy EQA/PT by měly navázat i ostatní národní systémy a být s nimi kompatibilní)

Hlavní organizátoři

- NIH ODS (National Institutes for Health-Office for Dietary Supplements)
- NIST
- CDC (Centers for Diabetes Control and Prevention)
- DEQAS
- AACC
- IFCC
- a další

Organizátoři představují velmi autoritativní mezinárodní instituce a jejich závěry by měly být brány s odpovídající pozorností.

Komutabilita-Studie 2

Cílem studie je získání komutabilních kontrolních materiálů programů EHK, jmenovitě programů EQA/PT CAP US a DEQAS UK. Výsledky studie mají být podle plánu zveřejněny v září-říjnu 2016 na webech NIST (<http://www.nist.gov>) a NIH-ODS (<https://www.ods.nih.gov>). Provedení studie je podrobně popsáno na <https://federalregister.gov> a v práci [3].

VDSCP (Vitamin D standardizační certifikační program)

Kritéria certifikace jsou převzata z práce [4]. Požadovaná hodnota bias $b\% \leq 5,0$ (od referenčních metod NIST a GHENT), hodnota preciznosti $CV\% \leq 10,0$. Nižší uvedené údaje se zdají být v praxi rutinních laboratoří momentálně nedosažitelné. V současné době byly vydány kromě řady měření metodami LC-MS/MS také

certifikáty pro imunochemické automatizované metody Abbott Architect, DiaSorin Liaison, Siemens Advia Centaur, Roche, IDL iSYS (Abbott pro koncentrace nad 32,5 nmol/l).

Platnost certifikátů imunochemických metod končí v únoru 2016. Je vhodné zmínit se, že certifikace se nevztahuje na změnu šarží reagensií. Integrita výsledků při změně je věcí laboratoře a dále se nevztahuje na koncentrace mimo rozmezí 22,5 - 275 nmol/l. Není tedy udělení certifikátu automatickou zárukou kvality výsledků laboratoře, která certifikovanou metodu používá.

Vliv VDSP na výsledky v programu DEQAS u metod s certifikátem VDSCP

Preciznost 2015

Uvedené hodnoty preciznosti jsou převzaty z programů EHK RfB Německo a SEKK Česká republika. Výsledky SEKK prezentují preciznost ve skupinách $CV = 10 - 28\%$. Vše nad 10%. Preciznost u programu DEQAS v říjnu 2015 (tedy již po zahájení certifikačního procesu VDSCP) byla po vyhodnocení 5 vzorků, 7 skupin metod (z toho 6 automatizovaných imunochemických) $CV\% > 10$. U programu RfB 2015 v roce 2015 byla celková preciznost (mezilaboratorní reprodukovatelnost cca $CV\% = 20$, hodnoty $CV\%$ jednotlivých skupin metod byly vždy $> 10\%$ (včetně LC-MS/MS).

Pravdivost 2014 - 2015

Hodnoty bias před zahájením činnosti VDSP jsou uvedeny v Tabulce 1, v období první certifikační periody (2014 - 2015) v Tabulce 2.

Table 1. Bias (%) 2012 - 2014 (before the participation of manufacturers on the VDSP)

	Surveys with groups differences	
	Maximal	Minimal
Roche	-28/32	-10/0
iDS iSYS	-17/35	0/12
DiaSorin	-2/-30	-6/-17
Siemens	-12/35	-12/2
LC-MS/MS	-5/15	1/6
ALTM	-7.2/11	Not introduced

Table 2. Bias (%) in October 2015 after certification of manufacturers in VDSP (DEQAS results)

	Samples 481 - 484	Sample 485 (spiking by endogenic D2+D3)
Abbott	2.8/13	-24.9
Beckman Unicel	-10.4/0.5	-19.9
DiaSorin	-8.1/3.6	-31.2
iSYS	-1.1/6.9	-17.3
Roche	-18.5/25.7	-19.4
Siemens Advia	-2.3/-11.1	-20.3
LC-MS/MS	2.8/6.4	-8.8
ALTM	-3.1/3.3	-20.8

Změny hodnot bias v období 2012-2015 nejsou navzdory probíhajícímu VDSP výrazné.

Imunochemické metody a difference mezi nimi

K dosavadním již zavedeným imunochemickým metodám přibýly dvě nové: VIDAS BioMérieux a Fujirebo. Výsledky testování byly nedávno publikovány. Metoda VIDAS v práci [5], metoda Fujirebo v práci [6]. Testování dvou nových imunochemických metod měření poskytla příležitost k posouzení úrovně srovnatelnosti mezi rutinními metodami a k potvrzení existence řady problémů analytických a z nich plynoucích problémů interpretačních. Diference jednotlivých imunochemických metod Fujirebo, Roche, Abbott a Beckman od metody LC-MS/MS v době prováděných experimentů programu VDSP jsou stále velmi významné. Číselně v intervalu -16 až 10 % u sér pacientů a -14 až 4 % u kontrolních materiálů. Výsledků pod 50 nmol/l (deficitní hodnoty) bylo podle metody v intervalu 11 - 21 %. Při testování VIDAS metody se korelační koeficienty imunochemických metod s LC-MS/MS metodou pohybovaly v intervalu 0,85 - 0,95 a směrnice kalibračních funkcí v intervalu 0,90 - 1,01.

Diference mezi rutinními metodami se závažnými klinickými důsledky jsou v rutinních laboratořích pozorovány i mezi imunochemickými a separačními metodami. V práci [7] je vyhodnoceno, že hodnoty bias mezi rutinní metodou LC-MS/MS (12,8 mmol/l) a imunochemickou metodou DiaSorin (-10,6 mmol/l), vypočtené jako difference od referenční ID-LC-MS/MS metody změnilы hodnotu frekvence deficeience vitaminu D z 12 % (rutinní LC-MS/MS) na 41 % (DiaSorin)

Zdroje systematických diferencí

24,25-dihydroxyvitamin D3

Přídavek 24,25-dihydroxyvitaminu D působí pozitivní bias při měření 25-hydroxyvitaminu D. Jeho hodnota je u jednotlivých imunochemických metod velmi odlišná. U separačních metod není tento vliv pozorován. V programu DEQAS (vzorek 465 z října 2014) byla hodnota celkového bias po spikování vzorku 24,25 dihydroxyvitaminu D o 48 % vyšší, než u vzorků bez spikování (obr. 1). Graf však ukazuje, nakolik byl vliv tohoto přídavku rozdílný u různých metod. Vliv vyjádřen růzností hodnot bias. Poměr 24,25-dihydroxyvitamin D / 25-hydroxyvitamin D má být údajně cenným ukazatelem stavu nedostatku vitaminu D při sledování jeho suplementace [8]. Samotné stanovení 24,25-dihydroxyvitaminu dosahuje zatím podle údaje z programu DEQAS (duben 2015, říjen 2015) nedostatečné úrovně preciznosti (CV% = 25 - 55 v dubnu 2015 a 27 - 33 v říjnu 2015).

3-epi-25-OH D3

3-epi-25-hydroxyvitamin D3 je známým interferentem stanovení 25-hydroxyvitaminu D. Z výsledků DEQAS v období 2014 - 2015, kdy byly koncentrace 3-epi-hydroxyvitaminu D3 ve vzorcích známé, lze usoudit, že do cca hodnot 6 nmol/l není vliv na bias

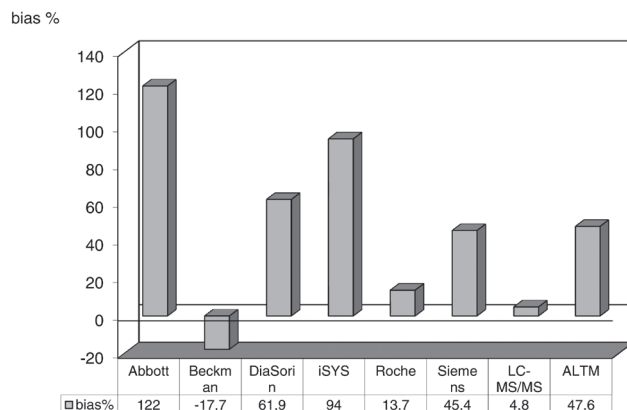


Fig. 1. Influence of spiking the samples by 24,25-dihydroxyvitamin D on different methods

měření 25-hydroxyvitaminu D významný. Problémem mohou být materiály dětí s typicky vyššími hodnotami 3-epi, dosahujícími někdy až 50 % hodnoty celkového 25-hydroxyvitaminu D. Imunochemické metody prakticky na přídavek 3-epi-25-OH D3 nereagují, pro separační metody není přítomnost 3-epi problémem, lze je vyřešit uspořádáním separace. Například způsobem, popsaným v referenční metodě Ghent [2].

25-hydroxyvitamin D2 vs 25-hydroxyvitamin D3

Přídavek směsi endogenního 25-hydroxyvitaminu D2 a 25-hydroxyvitaminu D3 ve vzorcích DEQAS způsobil zvýšení hodnoty bias celkem až na 48 % (diference průměru všech měření proti hodnotě referenční metody), ovšem s obrovskou variabilitou u různých metod a i u vzorků. Výsledky u vzorku z října 2015 jsou uvedeny v grafu (obr. 2) (-9 až -31 %). Výsledky u vzorku z října 2014 dokonce ukázaly interval bias -17 až 123 %: metody LC-MS/MS na tento přídavek významně nereagují. Protože různé imunochemické metody mají velmi různou úroveň křížových imunoreakcí u vitaminu D2, lze předpokládat poměr vitaminů D2/D3 za další významný faktor hodnoty bias u imunochemických metod.

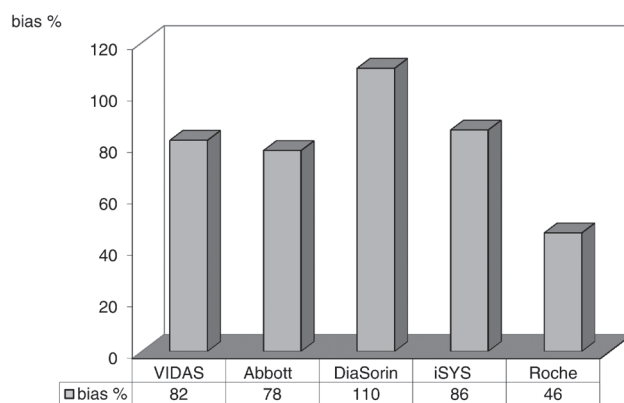


Fig. 2. Cross immunoreactivity of vitamin D2 in different immunochemistry methods

VDPB

Další pozorovanou a potvrzenou příčinou diferencí bias imunochemických metod vůči referenční LC-MS/MS metodě je vazebný protein VDSP, jak jeho koncentrace, různá u různých pacientů, tak i efektivita uvolňování vitaminu D z této vazby!

Imunochemické metody vykazují vlivem VDBP [9] velmi významné diference u dialyzovaných pacientů ve srovnání s ostatními [10]. Autoři pozorovali nárůst bias u Abbottu v průměru o 49%. Nárůsty u iSYS a Roche byly nižší, ale rovněž významné.

Závěr

- Program standardizace VDSP probíhá a pokračuje.
- Vliv standardizace je zatím nedostatečný.
- Je řada faktorů nepříznivě ovlivňujících analytickou kvalitu imunochemických metod.
- Imunochemické metody mohou zkreslovat klinické závěry, např. při klasifikaci nedostatku u dětí, nebo u dialyzovaných pacientů.
- Separáčnické metody vykazují podstatně vyšší analytickou robustnost.

Literatura

1. **Tai, S. S., Bedner, M., Phiney, K. W.** 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, p. 1942-8.
2. **Stepman, H. C. M., Vanderroost, A., Uytendaele, K. V., Thienpont, L. M.** 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, p. 441-8.
3. **Camara, J., Hoofnagle, A., Carter, G., Sempos, CH.** Take Two: Gearing Up for the Next Vitamin D Commutability Study. *Clin. Lab. News*, Feb 2015
4. **Stockl, D., Sluss, P. M., Thienpont, L. M.** Specification for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin. Chim. Acta*, 2009, p. 4088-13.

5. **Moreau, E., Bächer, S., Mery, S., Le Goff, C., Piga, N., Vogeser, H. et al.** Performance characteristic of the VIDAS 25-OH vitamin D assay-comparison with four immunoassays and two liquid chromatography-tandem mass spectrometry method in a multicentric study. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, 54, p. 45-53
6. **Saleh, L., Mueller, D., von Eckardstein, A.** Analytical and clinical performance of the new Fujirebo 25-OH vitamin D assay: a comparison with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and three other automated assays. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2015, DOI 10.1515/cclm-2015-0427
7. **Black, L. J., Anderson, D., Clarke, H. W., Poisonby, A. L., Lucas, R. M.** Analytical bias in the measurement of serum 25-hydroxyvitamin D concentration impairs assessment of vitamin D status in clinical and research settings. *Plos One*, 2015, 10, DOI: 10.1371/journal.pone.0135478
8. **Cashman, K. D., Hayes, A., Galvin, K., Merkel, J., Jones, G., Kaufmann, H. et al.** Significance of serum 24, 25-dihydroxyvitamin D in the assessment of vitamin D status: a double-edged sword. *Clin. Chem.*, 2015, 61, p. 636-645
9. **Heijboer, A. C., Blankenstein, M. A., Kema, I. P., Buijs, M. M.** Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein. *Clin. Chem.*, 20012, 58, p. 543-548.
10. **Depreter, B., Heijboer, A. C., Langlois, M. S.** Accuracy of three automated 25-hydroxyvitamin D assays in hemodialysed patients. *Clin. Chim. Acta*, 2013, 415, p. 255-260.

Podpořeno MZ ČR - RVO (FNHK, 00179906)

Do redakce došlo 19. 1. 2016

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.
ÚKBD FN Hradec Králové
Sokolská 581
500 05 Hradec Králové