

Elżbieta Karczarewicz, Edyta Kryśkiewicz, Ewa Skorupa, *Paweł Płudowski

Porównanie automatycznych metod oznaczania 25(OH)D – doświadczenia laboratorium szpitala pediatrycznego uczestniczącego w międzynarodowym systemie kontroli jakości DEQAS

Comparison of two automated serum 25(OH)D assays – experience of pediatric hospital laboratory participating in DEQAS proficiency testing

Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa
Kierownik Zakładu: dr med. Paweł Płudowski

Streszczenie

Wstęp. Niedobór witaminy D w organizmie w ramach jej pleiotropowego działania wiąże się ze wzrostem ryzyka wystąpienia i rozwoju chorób nowotworowych, autoimmunologicznych, układu sercowo-naczyniowego, cukrzycy. Stężenie 25(OH)D w surowicy krwi stanowi wskaźnik zaopatrzenia organizmu w witaminę D, który jest coraz szerzej używany w praktyce klinicznej.

Cel pracy. Porównanie dwóch automatycznych metod (LIAISON i ELECSYS) równoczesnego oznaczania 25(OH)D₂ oraz 25(OH)D₃ [25(OH)D Total] w materiale pediatrycznym oraz materiale kontrolnym DEQAS (*The International External Quality Assessment Scheme for Vitamin D Metabolites*).

Materiał i metody. Określono powtarzalność i odtwarzalność automatycznych metod oznaczania 25(OH)D Total na analizatorze LIAISON oraz ELECSYS w materiale pediatrycznym. W ramach porównania obu metod wykonano oznaczenia 25(OH)D Total w losowo wybranych 114 surowicach pediatrycznych. Dokładność metod oceniano na podstawie porównania ze „złotym standardem” (HPLC i LC-MS) wyników oznaczeń 25(OH)D Total w materiale kontrolnym DEQAS.

Wyniki. Obie metody oznaczania 25(OH)D Total charakteryzowały się wysoką precyzją (CV < 10%) oraz dużą zgodnością ($R^2 = 0,8272$). Jednocześnie odnotowano odchylenie wyników oznaczeń (bias) na analizatorze LIAISON w porównaniu do analizatora ELECSYS wynoszące średnio -22,5%. Wykazano dużą zgodność wyników oznaczeń 25(OH)D Total w materiale kontrolnym DEQAS dla obu analizatorów w porównaniu ze „złotym standardem” (HPLC i LC-MS) ($R^2 > 0,81$; odchylenie nie większe niż -11,6% dla LIAISON oraz $R^2 > 0,83$; odchylenie nie większe niż -3,1% dla ELECSYS), co świadczy o wysokiej dokładności obu metod.

Wnioski. Wysoka precyzja oraz porównywalność oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorach LIAISON oraz ELECSYS wraz z dużą zgodnością wyników ze „złotym standardem” wskazują na aplikacyjność obu metod w identyfikacji niedoborów witaminy D u dzieci i młodzieży.

Słowa kluczowe: 25-hydroksywitamina D, elektrochemiluminescencja, porównanie metod, LC-MS, HPLC

Summary

Introduction. Vitamin D insufficiency coincides with increased risk/progression of several diseases, including cancer, autoimmune diseases, cardiovascular disease and diabetes. The serum 25(OH)D concentration is a reliable biomarker of vitamin D status that due to pleiotropic action of vitamin D recently is more frequently used in everyday clinical practice.

Aim. The performance of two recently developed automated 25(OH)D Total assays (LIAISON and ELECSYS) was compared using pediatrician samples and results of DEQAS (*The International External Quality Assessment Scheme for Vitamin D Metabolites*).

Material and methods. Within-run and between-run imprecision were evaluated by measurements of pediatric samples replicates. Aliquots of 114 randomly selected patients' samples were measured on LIAISON and ELECSYS platforms to compare the methods. Accuracy was evaluated using DEQAS control samples with DEQAS HPLC and LC-MS data as gold standard.

Results. Automated 25(OH)D Total assays, LIAISON and ELECSYS demonstrated good intra- and inter-assay precision, with CV < 10%. LIAISON assay showed a performance comparable to ELECSYS with $R^2 = 0.8272$ and a mean bias -22.5%. Both methods showed good accuracy according to HPLC and LC-MS in DEQAS system, with bias less than -11.6% for LIAISON system and less than -3.1% for ELECSYS system.

Conclusions. Precision of automated 25(OH)D Total assays by LIAISON and ELECSYS are very high and comparable and both have required accuracy to identify vitamin deficiency in pediatric samples.

Key words: 25-hydroxyvitamin D, electrochemiluminescence, method comparison, LC-MS, HPLC

WPROWADZENIE

Właściwe zaopatrzenie organizmu w witaminę D odgrywa fundamentalną rolę nie tylko w regulacji gospodarki Ca-P, ale także zapewnia prawidłowe funkcjonowanie niemal wszystkich tkanek i narządów. Wykazano, że niedobory i deficyty witaminy D są czynnikiem ryzyka wystąpienia i rozwoju chorób nowotworowych, autoimmunologicznych, sercowo-naczyniowych oraz cukrzycy (1, 2). Udokumentowano, że pozanerkowa synteza aktywnego metabolitu witaminy D, czyli 1,25(OH)₂D ma kluczowe znaczenie dla funkcji układu immunologicznego i wewnątrzwydzielniczego, a także dla równowagi między proliferacją, różnicowaniem się i apoptozą komórkową (3-8). 25(OH)D, ze względu na długi okres półtrwania (około 3 tygodni) jest głównym parametrem oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D (9). Pomiar stężenia 25(OH)D w surowicy informuje o ilości substratu dostępnego dla syntezy aktywnego hormonalnie 1,25(OH)₂D. Oznaczanie 25(OH)D w surowicy jest procedurą trudną z trzech podstawowych przyczyn: 1) dużej hydrofobowości 25(OH)D, co wiąże się z zagrożeniem interferencji licznych składników surowicy (tak zwany „efekt matrix”); 2) występowaniem w surowicy zarówno pochodnych witaminy D₂, jak i D₃; 3) występowaniem w surowicy stereoisomeru 3-epi-25(OH)D₃ (10, 11). Notowane ostatnio znaczące zwiększenie zapotrzebowania na ocenę zaopatrzenia w witaminę D pacjentów z bardzo wielu grup ryzyka spowodowało konieczność opracowania nowych i łatwo dostępnych metod oznaczania 25(OH)D w surowicy. Zgodnie z aktualnymi zaleceniami (1, 2), automatyczne platformy LIAISON i ELECSYS wprowadziły procedury równoczesnego oznaczania 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃ [25(OH)D Total] w surowicy, które wykorzystujemy do badań w materiale pediatrycznym IPCZD. Badania te podlegają międzynarodowej kontroli jakości oznaczeń metabolitów witaminy D w systemie certyfikującym DEQAS (*The International External Quality Assessment Scheme for Vitamin D Metabolites*) (12-14).

CEL PRACY

Celem pracy była analiza precyzji i dokładności oznaczeń 25(OH)D Total w surowicy metodami automatycznymi na analizatorach ELECSYS i LIAISON z wykorzystaniem materiału pediatrycznego IPCZD oraz próbek kontrolnych systemu DEQAS.

MATERIAŁ I METODY

Protokół badania

Do badań precyzji oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorach LIAISON i ELECSYS wykorzystano mieszaninę surowic (surowica zlewkowa) pozostałych po rutynowych oznaczeniach 25(OH)D u pacjentów Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD). Do badań powtarzalności surowicę zlewkową dzielono na porcje odpowiadające jednemu badaniu. Badania powtarzalności wykonywano w trakcie jednego dnia prowadzenia oznaczeń. Do badań odtwarzalności próbkę surowicy zlewkowej także dzielono na porcje odpowiadające jednemu badaniu, przy czym oznaczenia prowadzono w odrębnych cyklach uruchamiania aparatów. **114 próbek surowicy pochodzącej od pacjentów IPCZD wykorzystano do oceny zgodności wyników oznaczeń 25(OH)D Total wykonanych na analizatorze LIAISON względem ELECSYS.** Analizy przeprowadzone na posiadanym materiale zostały wykonane w ramach badań statutowych poszerzonej kontroli jakości w Zakładzie Biochemii i Medycyny Doświadczalnej (ZBiMD) IPCZD. Badania nie wymagały zgody komisji etycznej. Badacze nie mieli dostępu do danych osobowych pacjentów.

Do analizy dokładności oznaczeń wykonywanych w ZBiMD wykorzystano wyniki badań próbek kontrolnych otrzymanych w ramach międzynarodowego systemu kontroli jakości DEQAS. Kontrola DEQAS prowadzona jest w ZBiMD od 2009 roku na analizatorze LIAISON (certyfikat DEQAS) i od 2011 roku na analizatorze ELECSYS (uzyskanie certyfikatu planowane na rok 2012). Wyniki badań metodą HPLC i LC-MS/MS pochodzą z informacji dostarczanych uczestnikom systemu kontroli jakości DEQAS. Do analizy zgodności metod oznaczania 25(OH)D Total na LIAISON i ELECSYS z HPLC i LC-MS użyto próbek kontrolnych nr 351-405 otrzymanych w ramach systemu DEQAS. Wartości stężeń 25(OH)D oznaczone metodą HPLC i LC-MS stanowią wartość średnią z badań wykonanych przez uczestników systemu DEQAS. Wyniki badań metodą HPLC stanowią średnią wyników z 23-26 ośrodków (w zależności od numeru próbki) uczestniczących w systemie DEQAS. Wyniki badań metodą LC-MS stanowią wartość średnią wyników z 52-104 ośrodków (w zależności od numeru próbki) uczestniczących w

systemie DEQAS. Na wykorzystanie w pracy wyników z systemu DEQAS wyraził zgodę dr Graham D. Carter.

Test Vitamin D Total (ELECSYS, Roche Diagnostics)

„Vitamin D Total” (ELECSYS Roche Diagnostics) jest kompetycyjnym testem wykorzystującym zjawisko elektrochemiluminescencji, gdzie do identyfikacji 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃ zastosowano białko wiążące witaminę D (ang. *vitamin D binding protein* – DBP) znakowane rutenem. We wstępnej fazie oznaczenia, przy użyciu odczynnika zawierającego ditiotritol (1 g/l) oraz NaOH (55 g/l) następuje uwolnienie zawartej w próbce 25(OH)D z DBP. Kolejnym etapem jest inkubacja badanej próbki z DBP znakowanym rutenem, w czasie której 25(OH)D obecne w próbce wiąże się z kompleksem DBP-ruten. Następnie do mieszaniny dodawane są paramagnetyczne cząstki opłaszczone streptawidyną oraz 25(OH)D znakowana biotyną, która wiąże się z kompleksem DBP-ruten w pozostałych wolnych miejscach. Dzięki oddziaływaniom 25(OH)D z DBP oraz biotyny ze streptawidyną powstaje wielowarstwowy kompleks kanapkowy (ang. *sandwich complex*). Po inkubacji mieszanina reakcyjna zostaje przeniesiona do komory pomiarowej, gdzie jest wychwytywana przez elektrodę na zasadzie magnetycznych oddziaływań pomiędzy elektrodą a cząstkami paramagnetycznymi. Następuje elektryczna inicjacja reakcji z udziałem rutenu, której produkt stanowią fotony światła zliczane przez fotopowielacz. Ich liczba jest odwrotnie proporcjonalna do ilości oznaczanej 25(OH)D, a jej stężenie zostaje odczytane z krzywej kalibracyjnej.

Test 25OH Vit D Total (LIAISON, Biomedica Gruppe)

„Liaison 25OH Vit D Total” (LIAISON, Biomedica Gruppe) jest kompetycyjnym testem wykorzystującym zjawisko elektrochemiluminescencji, gdzie do identyfikacji 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃ zastosowano specyficzne przeciwciało. W trakcie pierwszej inkubacji odczynnik zawierający 10% etanolu oraz detergent powoduje uwolnienie 25(OH)D zawartej w próbce badanej z DBP. Wolna 25(OH)D ulega wiązaniu z przeciwciałem opłasz-

czającym cząstki paramagnetyczne. W następnym etapie dodawana jest znakowana izoluminolem witamina D, która współzawodniczy z 25(OH)D zawartą w próbce badanej o wiązanie z przeciwciałem. Po inkubacji materiał niezwiązany usuwany jest w trakcie płukania. W końcowej fazie oznaczenia dodawany jest odczynnik inicjujący reakcję, której produktem są fotony świetlne zliczane za pomocą fotopowielacza. Ich ilość jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia 25(OH)D w próbce badanej, odczytywanego z krzywej kalibracyjnej.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica 8.0 PL (Statsoft, USA) oraz 15-dniowej wersji testowej programu Medcal 9.3 (Mariekerke, Belgia). Korelacje oceniono testem Pearsona, a współczynnik determinacji obliczono metodą regresji liniowej opartej o dopasowanie krzywej regresji metodą najmniejszych kwadratów. Kierunki różnic między poszczególnymi metodami określono za pomocą analizy Blanda-Altmana. Za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0,05$ (15-18).

WYNIKI

Powtarzalność i odtwarzalność oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorach LIAISON i ELECSYS w materiale pediatrycznym

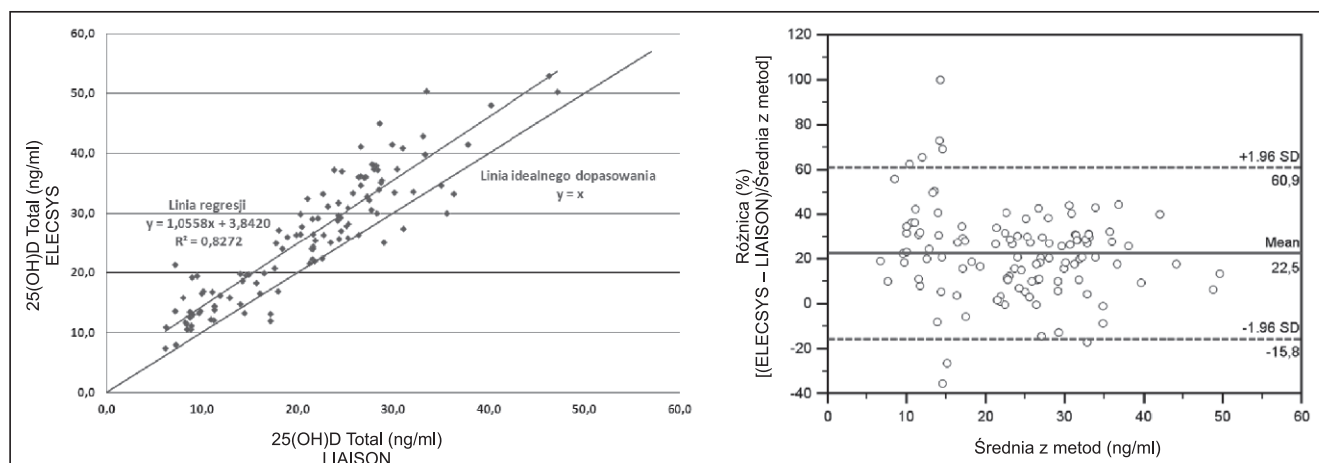
Metody oznaczania 25(OH)D Total na analizatorach ELECSYS i LIAISON wykazują wysoką i porównywalną precyzję wewnątrzoznaczeniową (powtarzalność), jak i międzyoznaczeniową (odtworzalność) w materiale pediatrycznym (tab. 1). Wykazano, że wartości błędów powtarzalności i odtwarzalności w materiale pediatrycznym nie różniły się od danych producenta wykonanych z użyciem surowic pobranych od pacjentów dorosłych (tab. 1).

Zgodność oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorach LIAISON i ELECSYS w materiale pediatrycznym – ocena metodą regresji liniowej oraz metodą Blanda-Altmana

Wyniki badania zgodności wyników 25(OH)D Total w 114 surowicach pediatrycznych poddanych

Tabela 1. Powtarzalność i odtwarzalność oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorze LIAISON oraz ELECSYS w materiale pediatrycznym.

		Powtarzalność		Odtwarzalność	
		ZBiMD IPCZD	Dane producenta	ZBiMD IPCZD	Dane producenta
LIAISON	Liczba oznaczeń	11	80	14	80
	Średnia (ng/ml)	24,68	21,7	26,27	21,7
	Zakres (ng/ml)	22,90-26,70	brak danych	24,30-30,70	brak danych
	Odchylenie standardowe	1,15	0,86	2,12	1,72
	Współczynnik zmienności (%)	4,64	4,0	8,08	7,9
ELECSYS	Liczba oznaczeń	10	84	13	84
	Średnia (ng/ml)	17,05	15,6	20,19	15,6
	Zakres (ng/ml)	16,39-18,20	brak danych	18,20-22,13	brak danych
	Odchylenie standardowe	0,63	0,779	1,23	1,37
	Współczynnik zmienności (%)	3,70	5,0	6,09	8,8



Ryc. 1. Krzywa regresji oraz analiza Blanda-Altmana przedstawiająca procentowe różnice wyników oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorze LIAISON względem ELECSYS w materiale pediatrycznym (n = 114).

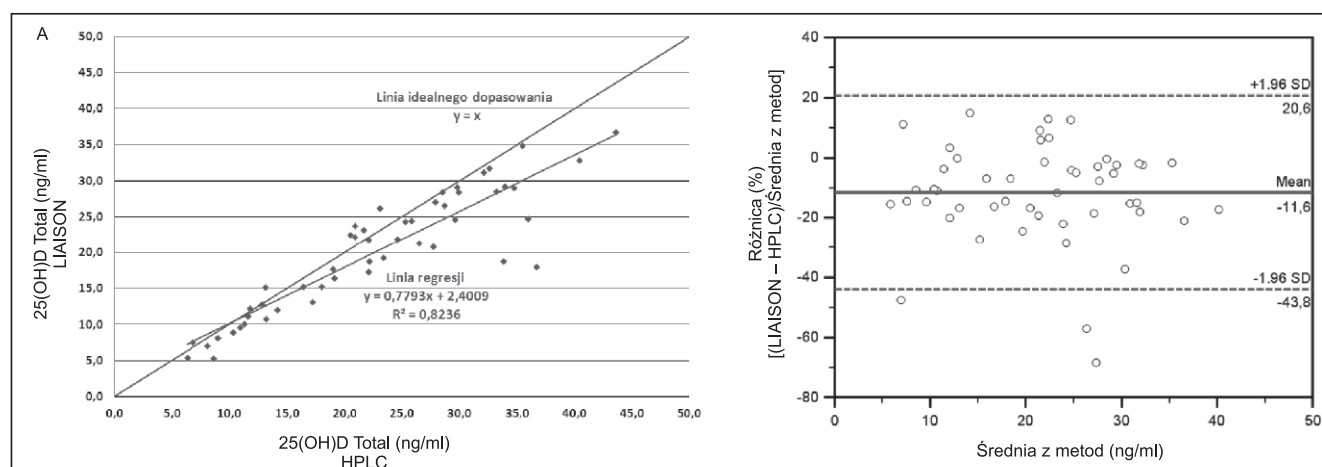
oznaczeniom na analizatorach LIAISON i ELECSYS prezentuje rycina 1. Analiza regresji liniowej ujawniła wysoką zgodność wyników oznaczeń tych samych próbek wyżej podanymi metodami ($R^2 = 0,8272$). Według najnowszych zaleceń dotyczących oceny zaopatrzenia organizmu w witaminę D obie porównywane metody automatyczne oznaczają równocześnie 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃. Jednak do identyfikacji tych metabolitów używają różnych technik: system LIAISON wykorzystuje oddziaływanie ze specyficznym przeciwciałem, a system ELECSYS – z DBP. Dlatego też, pomimo wysokiej zgodności w badaniu metodą regresji (ryc. 1), różnice w specyficzności dwóch metod ujawniła analiza Blanda-Altmana. Jak wynika z ryciny 1, wykazano 22,5-procentową różnicę w zgodności wyników stężenie 25(OH)D oznaczanego obiema metodami.

Porównanie zgodności oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorach LIAISON i ELECSYS w materiale kontrolnym DEQAS względem HPLC i LC-MS

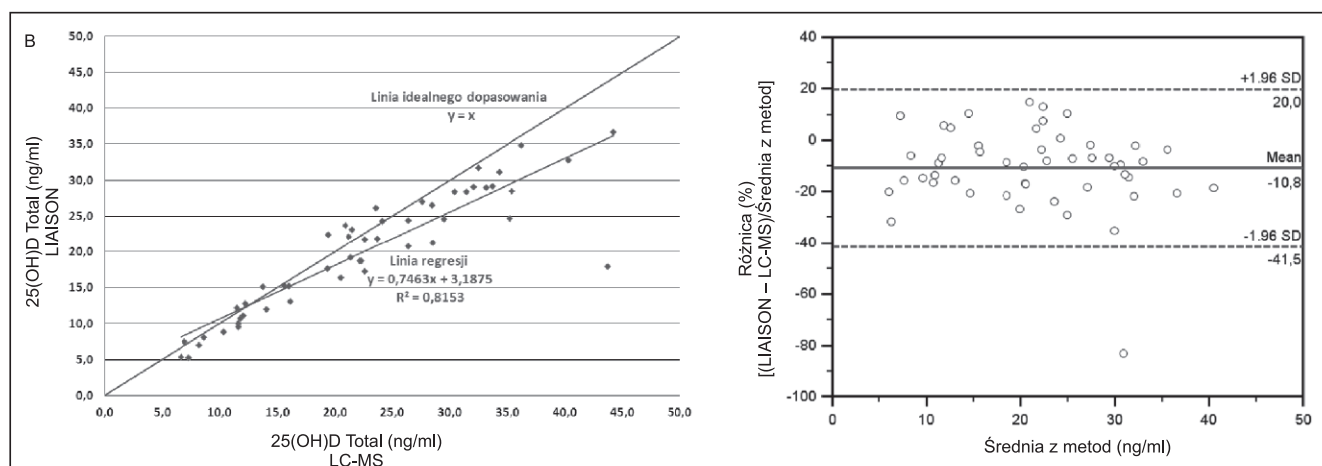
– analiza metodą regresji liniowej oraz metodą Blanda-Altmana

Aby ocenić dokładność oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorze LIAISON przeprowadzono analizę zgodności wyników otrzymanych powyższą metodą z wynikami oznaczeń dwoma metodami bezpośrednimi, fizykalnymi, uznawanymi za „złote standardy” w oznaczeniach 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃: wysokosprawną chromatografią ciekłą (HPLC) i spektrometrią masową sprzężoną z chromatografią ciekłą (LC-MS). Metoda wykorzystywana w systemie LIAISON wykazała wysoką zgodność wyników zarówno z metodą HPLC ($R^2 = 0,8236$, ryc. 2A), jak i z metodą LC-MS ($R^2 = 0,8153$) w analizie regresji (ryc. 2B). Jednak analiza Blanda-Altmana ujawniła, że oznaczenia wykonane na analizatorze LIAISON są o 11,6% niższe względem metody HPLC i o 10,8% niższe względem LC-MS.

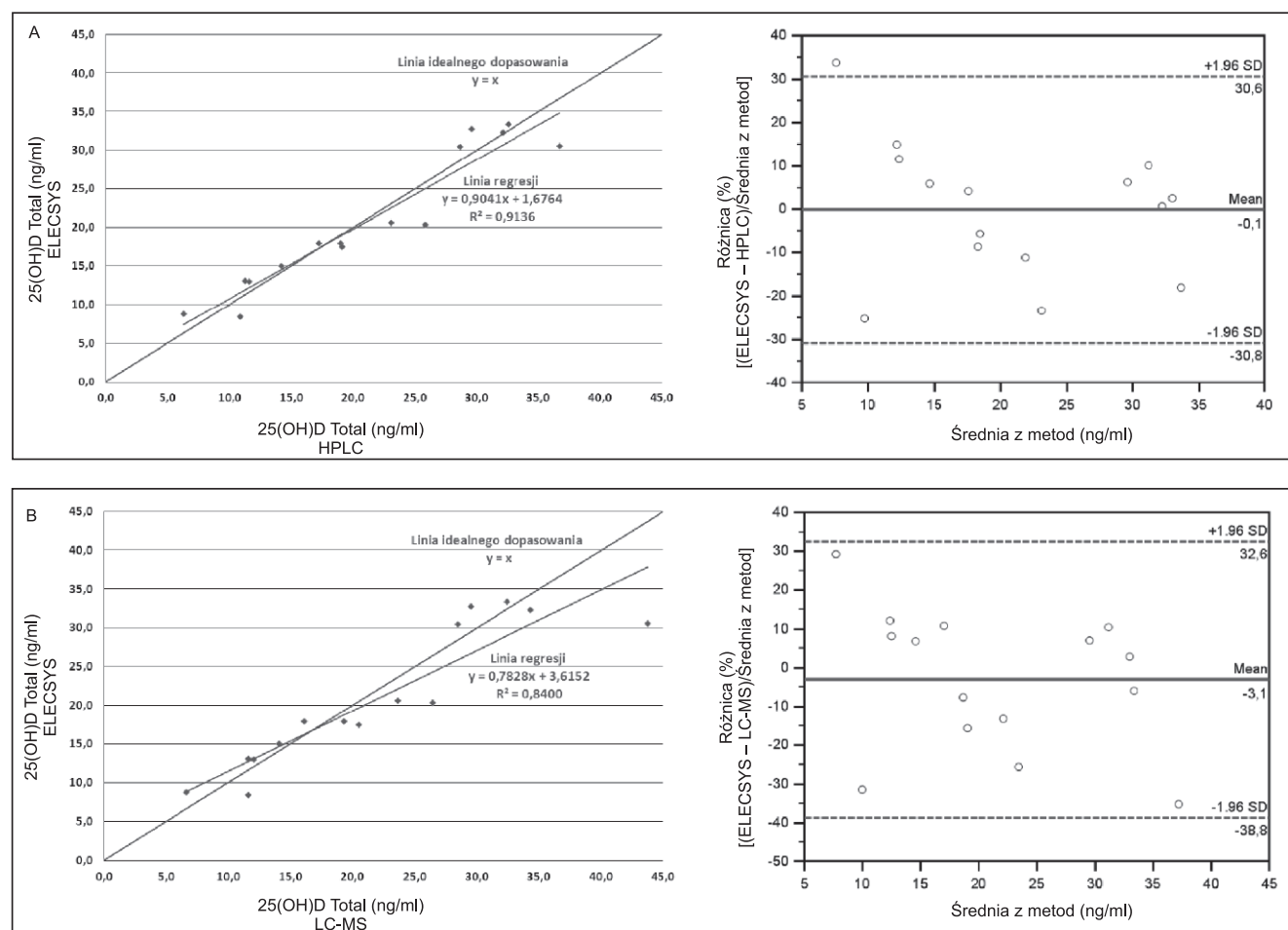
Podobnie ocena systemu ELECSYS wykazała, że metoda ta jest w stopniu wysokim zgodna zarówno z metodą HPLC ($R^2 = 0,9136$, ryc. 3A), jak i z metodą LC-MS ($R^2 = 0,8400$) w analizach regresji liniowej (ryc. 3B).



Ryc. 2. Krzywa regresji oraz analiza Blanda-Altmana przedstawiająca procentowe różnice wyników oznaczeń 25(OH)D Total w materiale kontrolnym DEQAS (351-405) na analizatorze LIAISON względem oznaczeń metodą manualną z użyciem HPLC (ryc. 2A) oraz LC-MS (ryc. 2B).



Ryc. 2. Krzywa regresji oraz analiza Blanda-Altmana przedstawiająca procentowe różnice wyników oznaczeń 25(OH)D Total w materiale kontrolnym DEQAS (351-405) na analizatorze LIAISON względem oznaczeń metodą manualną z użyciem HPLC (ryc. 2A) oraz LC-MS (ryc. 2B).



Ryc. 3. Krzywa regresji liniowej oraz analiza Blanda-Altmana przedstawiająca procentowe różnice wyników oznaczeń 25(OH)D Total w materiale kontrolnym DEQAS (391-405) na analizatorze ELECSYS względem oznaczeń metodą manualną z użyciem HPLC (ryc. 3A) oraz LC-MS (ryc. 3B)

W analizie Blanda-Altmana wyniki oznaczeń na analizatorze ELECSYS okazały się wysoce zgodne zarówno z metodą HPLC (różnica: -0.1%, ryc. 3A), jak i z metodą LC-MS (różnica: -3,1%, ryc. 3B). Warto zaznaczyć, że w analizie dotyczącej systemu LIAISON ilość próbek wynosiła 54, natomiast systemu ELECSYS – tylko 14.

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że szeroko dostępne w Polsce dwie metody do oznaczania całkowitej 25(OH)D [25(OH)D₃ i 25(OH)D₂] w surowicy, a więc systemy analityczne LIAISON i ELECSYS, charakteryzują się wysoką precyzją oznaczeń w materiale pediatrycz-

nym (błąd < 8%) oraz udokumentowaną dokładnością względem referencyjnych metod bezpośrednich HPLC i LC-MS uznawanych za „złoty standard”.

Chociaż obie metody równocześnie oznaczają 25(OH)D₂ oraz 25(OH)D₃ spełniając standardy określone w ostatnich zaleceniach (1, 2), to ich specyficzność w stosunku do metabolitów witaminy D obecnych w surowicy jest różna, co manifestuje wykazana 22-procentowa różnica między wynikami oznaczeń w systemie LAISON i ELECSYS. Metoda oznaczeń na analizatorze LAISON wykorzystuje przeciwciało, a jego specyficzność względem 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 1,25(OH)₂D₃, 1,25(OH)₂D₂, witaminy D₃, witaminy D₂ i C3-epimeru-25(OH)D₃ wynosi odpowiednio 100%, 104%, 17%, 40%, <1%, <1% i <1% (dane producenta). Metoda oznaczeń w systemie ELECSYS wykorzystuje białko wiążące witaminę D (DBP), a jego specyficzność względem 25(OH)D₃, 25(OH)D₂, 24,25(OH)₂D₃, 1,25(OH)₂D₃, 1,25(OH)₂D₂, witaminy D₃, witaminy D₂ i C3-epimeru-25(OH)D₃ wynosi odpowiednio 98%, 81%, 121%, 5%, 6%, 5%, 6% i 93% (dane producenta). W efekcie opisanych powyżej różnic metodycznych ujawniona rozbieżność wyników oznaczeń 25(OH)D między systemem LAISON i ELECSYS wynika najprawdopodobniej z 20% różnicy w specyficzności względem 25(OH)D₂ oraz 93% różnicy w specyficzności względem C3-epimeru-25(OH)D₃, który w surowicy ludzkiej występuje w ilości (2-20)% (10, 11, 19, 20).

Udokumentowana w pracy wysoka precyzja badanych metod automatycznych (błąd < 8%) przełamuje problem niskiej wiarygodności oznaczeń witaminy D metodami manualnymi, pośrednimi wykorzystującymi wiązanie 25(OH)D z białkami, takimi jak DBP (metoda CPBA, ang. *competitive protein binding assay*) czy przeciwciałem (metoda RIA, ang. *radioimmunoassay*, i metoda ELISA, ang. *enzyme-linked immunoassay*), gdzie błąd metody wynosił 20-30% (21). Rozpowszechnienie

metod automatycznych spowodowało poprawę precyzji oznaczeń 25(OH)D odnotowaną w systemie DEQAS (13). Zmienność analityczna obu metod w badanym w pracy materiale pediatrycznym jest porównywalna do wyników otrzymanych w badaniach osób dorosłych (22-24).

Dokładność metod oznaczania 25(OH)D w surowicy oceniono względem referencyjnych metod bezpośrednich uznawanych za „złoty standard”: wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz spektrometrii masowej sprzężonej z chromatografią cieczową (LC-MS). Metody te mają możliwość oceny stężenia osobno 25(OH)D₃ i 25(OH)D₂, ale nie wszystkie umożliwiają rozróżnienie C3-epimeru-25(OH)D₃ od 25(OH)D₃ (25-26). Przyjmuje się, że ich specyficzność względem 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ oraz C3-epimeru-25(OH)D₃ wynosi 100%. Ocena dokładności oznaczeń 25(OH)D Total na analizatorze LAISON wykazała wysoką korelację zarówno z metodą HPLC, jak i z metodą LC-MS. Mimo to system LAISON generował wyniki niższe o około 10% w porównaniu z HPLC i LC-MS. Obserwacja ujawniona w naszym badaniu jest zgodna z danymi opublikowanymi w literaturze (14, 19, 23). Porównanie wyników oznaczeń 25(OH) Total na analizatorze ELECSYS z metodami HPLC i LC-MS wykonane zostało na niewielkiej ilości próbek, ponieważ test ten wprowadzono w maju 2011 roku i kontrola DEQAS objęła jedynie 14 próbek testowych. W przypadku systemu ELECSYS, mimo znacząco mniejszej liczby oznaczeń (n = 14), zaobserwowano wysoką zgodność względem metod referencyjnych (różnica wyniosła -0,1% oraz -3,1%, odpowiednio dla HPLC i LC-MS).

Przeprowadzone analizy wskazują, że badane metody automatyczne zastosowane w analizatorach LAISON i ELECSYS spełniają kryteria dokładności oznaczeń przyjętych w systemie DEQAS, wykazują niski błąd oznaczeń (< 8%) i są rekomendowane do badań pediatrycznych.

PIŚMIENNICTWO

1. Souberbiell JC, Body JJ, Lappe JM et al.: Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: recommendations for clinical practice. *Autoimmunity Review* 2010; 9: 709-715.
2. Holick MF, Binkley NC, Bishoff-Ferrari HA et al.: Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1911-1930.
3. Giovannucci E: Epidemiological evidence for vitamin D colorectal cancer. *J Bone Miner Res* 2007; 22 Suppl 2: V81-5.
4. Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW: 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 2008; 168(11): 1174-1180.
5. Dobnig H, Pilz S, Scharnagal H et al.: Independent association of low serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D levels with all-cause and cardiovascular mortality. *Arch Intern Med* 2008; 168(12): 1340-1349.
6. Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD et al.: Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007; 49(5): 1063-1069.
7. Pilz S, Henry RM, Sinijder MD et al.: 25-hydroxyvitamin D is not associated with carotid intima-media thickness in older men and women. *Calcify Tissue Int* 2009; 84(5): 423-4.
8. Harris SS: Vitamin D in Type 1 diabetes prevention. *J Nutr* 2005; 135: 323-325.
9. Hollis BW: Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 507S-510S.
10. Carter DC: 25-hydroxyvitamin assays: the quest for accuracy. *Clinical Chemistry* 2009; 55(7): 1300-1302.
11. Carter GD: Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets* 2011; 1291: 19-28.
12. Carter GC, Carter R, Jones J et al.: How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the International Vitamin D External Quality. *Clinical Chemistry* 2004; 11: 2195-2197.
13. Carter GD, Berry JL, Gunter E et al.: Proficiency testing of 25-hydroxyvitamin D (25-OHD) assays. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010; 121: 176-179.
14. Carter GD, Jones JC: Use of a common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

- etry methods for serum 25-hydroxyvitamin-D. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 434.
15. Bland JM, Altman DG: Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1(8476): 307-310.
 16. Bland JM, Altman DG: Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard methods is misleading. *Lancet* 1995; 346: 1085-1087.
 17. Westgard JO, Hunt MR: Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. *Clin Chem* 1973; 19: 49-57.
 18. Dallal GA: Comparing two measurement devices. *The Little Handbook of Statistical Practice*, <http://www.tufts.edu/~gdallal/LHSP.HTM>
 19. 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: 1976-1982.
 20. Van den Ouweland JMW, Beijers M, Demacker PNM et al.: Measurement of 25-OH vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *J Chromatogr B* 2010; 878: 1163-1168.
 21. Lips P, Chapuy MC, Dawson-Hughes B et al.: An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements. *Osteoporosis Int* 1999; 9: 394-397.
 22. Wagner D, Heather EC, Hanwell EC, Vieth R: An evaluation of automated methods for measurement of serum 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem* 2009; 42: 1549-1556.
 23. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A et al.: Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 2010; 75(7): 477-488.
 24. Moon HW, Cho JH, Hur M et al.: Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Chem* 2012; ahead of print.
 25. Tai SSC, 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* 2011; 82(5): 1942-1948.
 26. Phinney KW, Bedner M, Tai SSC et al.: Development and certification of a standard reference material for vitamin D metabolites in human serum. *Anal Chem* 2011; ahead of print.

otrzymano/received: 17.02.2012

zaakceptowano/accepted: 15.03.2012

Adres/address:

*Paweł Płudowski

Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej IPCZD

Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa

tel.: +48 (22) 815-17-76

e-mail: p.pludowski@czd.pl