

*Marek Wójcik, Edyta Czekuć-Kryśkiewicz, Barbara Parafiniuk, Ewa Skorupa, Alina Kępka, Paweł Płudowski

Porównanie komercyjnych automatycznych i manualnych metod oznaczania stężenia 25(OH)D oraz 1,25(OH)₂D – doświadczenia laboratorium szpitala pediatrycznego uczestniczącego w międzynarodowym systemie kontroli jakości DEQAS

Comparison of commercially available automated and manual 25(OH)D and 1,25(OH)₂D assays – experience of pediatric hospital laboratory participating in DEQAS proficiency testing

Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Warszawa
Kierownik Zakładu: prof. dr hab. med. Roman Janas

Słowa kluczowe

25-hydroksywitamina D,
1,25-dihydroksywitamina D,
chemiluminescencja, porównanie metod

Keywords

25-hydroxyvitamin D,
1,25-dihydroxyvitamin D,
chemiluminescence, methods comparison

Konflikt interesów Conflict of interest

Brak konfliktu interesów
None

Adres/address:

*Marek Wójcik
Zakład Biochemii, Radioimmunologii
i Medycyny Doświadczalnej
Instytut „Pomnik – Centrum
Zdrowia Dziecka”
Al. Dzieci Polskich 20, 04-730 Warszawa
tel. +48 (22) 815-17-08
fax +48 (22) 815-13-13
m.wojcik@czd.pl

Streszczenie

Wstęp. Niedobór organizmu w witaminę D wiąże się ze wzrostem ryzyka rozwoju wielu chorób, w tym autoimmunologicznych, układu sercowo-naczyniowego, nowotworów, cukrzycy. Stężenie 25(OH)D w surowicy krwi stanowi wskaźnik zaopatrzenia organizmu w witaminę D. Biologicznie czynny metabolit witaminy D – 1,25(OH)₂D, jest jednym z głównych czynników regulujących metabolizm wapnia i fosforu.

Cel pracy. Porównanie metod oznaczania stężenia 25(OH)D (automatycznych CLIA na analizatorach IDS-iSYS i LIAISON) oraz 1,25(OH)₂D (półautomatycznej CLIA na analizatorze IDS-iSYS i manualnej RIA) w surowicy krwi w materiale pediatrycznym oraz kontroli jakości DEQAS.

Materiał i metody. Określono: 1. powtarzalność i odtwarzalność metody CLIA oznaczania stężeń 25(OH)D i 1,25(OH)₂D na analizatorze IDS-iSYS w materiale pediatrycznym, 2. dokładność metody CLIA oznaczeń stężeń 25(OH)D na analizatorze IDS-iSYS w materiale kontroli jakości DEQAS w odniesieniu do metod HPLC i LC-MS/MS, 3. porównano metodę CLIA pomiaru stężeń 25(OH)D i 1,25(OH)₂D na analizatorze IDS-iSYS z metodami odpowiednio: automatyczną CLIA na analizator LIAISON oraz manualną RIA.

Wyniki. Metody CLIA pomiaru stężenia 25(OH)D i 1,25(OH)₂D na analizatorze IDS-iSYS charakteryzowały się wysoką powtarzalnością (odpowiednio 2,6 i 6,4%) i odtwarzalnością (odpowiednio 9,1 i 9,6%) oznaczeń. Odnotowana różnica pomiędzy oznaczeniami stężenia 25(OH)D wykonywanymi w systemach LIAISON i IDS-iSYS w materiale pediatrycznym (bias 25,7%) oraz materiale kontrolnym DEQAS (bias 49,4%) może wynikać z różnic w specyficzności testów względem metabolitów witaminy D. Porównanie metod pomiaru stężeń 1,25(OH)₂D wykazało ich dobrą zgodność w materiale pediatrycznym (bias 11,0%).

Wnioski. Uzyskane wyniki wskazują na wysoką precyzję oznaczeń metabolitów witaminy D przy użyciu analizatora IDS-iSYS. Jednocześnie odnotowana zgodność tych metod z metodami rutynowo stosowanymi w Zakładzie Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej sugeruje możliwość ich zastosowania w klinicznej praktyce szpitala pediatrycznego z zachowaniem najwyższych standardów diagnostyki laboratoryjnej.

Summary

Introduction. Vitamin D insufficiency coincides with increased risk of several diseases, including cancer, diabetes, autoimmune and cardiovascular disorders. Serum 25(OH)D is a reliable biomarker of vitamin D status that is used in everyday clinical practice. 1,25(OH)₂D is hormonal active vitamin D metabolite stimulating intestinal absorption of both calcium and phosphorus. It also encourages bone resorption and mineralization.

Aim. Comparison of the methods for serum determination of 25(OH)D (automatic CLIA on IDS-iSYS and LIAISON analyzers) and 1,25(OH)₂D (semi-automatic CLIA on IDS-iSYS analyzer and manual RIA) in pediatric and DEQAS samples.

Material and methods. The intra- and intervariability of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements on the IDS-iSYS platform in pediatric samples were calculated. The accuracy of the CLIA method of 25(OH)D quantification on the IDS-iSYS was evaluated using

DEQAS HPLC and LC-MS/MS data. The comparison of the CLIA method of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D determinations on IDS-iSYS platform with the CLIA method on LIAISON machine and manual RIA method, respectively, was performed.

Results. The CLIA methods of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D determinations on the IDS-iSYS platform were characterized by high repeatability (2.6 and 6.4%, respectively) and reproducibility (9.1 and 9.6%, respectively). The disagreement noted between methods in 25(OH)D results in pediatric and DEQAS samples (the bias 25.7 and 49.4%, respectively) may be due to differences in the cross-reactivity with the vitamin D metabolites. The comparison of methods of 1,25(OH)₂D determination showed their good compatibility in pediatric samples (the bias of 11.0%).

Conclusions. The study indicate high precision of serum 25(OH)D and 1,25(OH)₂D determinations using CLIA methods on the IDS-iSYS platform. The comparison of these methods with the methods routinely used in the Department of Biochemistry, Radioimmunology and Experimental Medicine made the possibility of their use in the clinical practice of pediatric hospital with maintenance of the highest diagnostic standards.

WPROWADZENIE

Właściwe zaopatrzenie organizmu w witaminę D odgrywa fundamentalną rolę nie tylko w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej, 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-dihydroksywitaminy D [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-hydroksywitamina D (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 nerkowej syntezy aktywnego hormonalnie 1,25(OH)₂D.

1,25(OH)₂D jest jednym z głównych czynników regulujących metabolizm wapnia i fosforu, oddziałującym przez stymulację wchłaniania wapnia w jelitach i zwiększenie resorpcji kości. Jednocześnie hamuje produkcję parathormonu zarówno przez bezpośrednie oddziaływanie na gruczoły przytarczycowe, jak i pośrednio, podnosząc poziom wapnia we krwi. Wytwarzanie 1,25(OH)₂D jest stymulowane przez parathormon, co skutkuje powstaniem efektywnej pętli sprzężenia zwrotnego (10). Wytwarzany przez kości czynnik FGF23 hamuje natomiast syntezę 1,25(OH)₂D (11).

Oznaczanie stężenia 25(OH)D oraz 1,25(OH)₂D w surowicy jest procedurą trudną z kilku podstawowych przyczyn: (1) dużej hydrofobowości 25(OH)D oraz 1,25(OH)₂D, co wiąże się z zagrożeniem interferencji licznych składników surowicy (tzw. efekt matrix); (2) występowania w surowicy pochodnych witaminy zarówno D₂, jak i D₃; (3) występowania w surowicy stereoizomeru 3-epi-25(OH)D₃; (4) stężenia 1,25(OH)₂D w surowicy na poziomie pg/ml (12, 13). Notowane ostatnio znaczące zwiększenie zapotrzebowania na ocenę zaopatrzenia w witaminę D u pacjentów z wielu grup ryzyka spowodowało konieczność opracowania nowych i łatwo dostępnych metod oznaczania stężenia 25(OH)D w surowicy.

Zgodnie z aktualnymi zaleceniami (1, 2) automatyczne platformy IDS-iSYS i LIAISON wprowadziły procedury równoczesnego oznaczania 25(OH)D₂ i 25(OH)D₃ (25(OH)D total) w surowicy, które wykorzystujemy do badań w materiale pediatrycznym Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” (IPCZD). W systemie IDS-iSYS możliwe jest również oznaczanie 1,25(OH)₂D metodą półautomatyczną. Oba badania podlegają międzynarodowej kontroli jakości oznaczeń metabolitów witaminy D w systemie certyfikującym DEQAS (The International External Quality Assessment Scheme for Vitamin D Metabolites) (14-16).

CEL PRACY

Celem pracy była analiza precyzji i dokładności oraz porównanie metod oznaczeń stężeń metabolitów witaminy D w surowicy krwi: automatycznej chemiluminescencyjnej (CLIA) metody pomiaru stężenia 25(OH)D na analizatorze IDS-iSYS względem metody automatycznej CLIA na analizatorze LIAISON oraz półautomatycznej metody CLIA pomiaru stężeń 1,25(OH)₂D na analizatorze IDS-iSYS względem metody manualnej radioimmunologicznej (RIA) z wykorzystaniem materiału pediatrycznego IPCZD oraz próbek kontrolnych systemu DEQAS.

MATERIAŁ I METODY

Protokół badania

Do badań precyzji oznaczeń stężeń 25(OH)D total (25(OH)D₂ + 25(OH)D₃) oraz 1,25(OH)₂D wykorzystano mieszaninę surowic (surowica zlewkowa) pozostałych po rutynowych oznaczeniach 25(OH)D oraz 1,25(OH)₂D u pacjentów IPCZD. Do badań powtarzalności oraz odtwarzalności surowicę zlewkową dzielono na porcje odpowiadające jednemu badaniu. Badania powtarzalności wykonywano w trakcie jednego dnia prowadzenia oznaczeń, natomiast oznaczenia pozwalające ocenić odtwarzalność prowadzono w odrębnych cyklach uruchamiania analizatora. Do oceny zgodności wyników oznaczeń 25(OH)D total wykonanych automatyczną metodą CLIA na analizatorze IDS-iSYS względem automatycznej metody CLIA na analizatorze LIAISON wykorzystano 100 próbek surowicy pochodzącej od pacjentów IPCZD. Do oceny zgodności wyników oznaczeń 1,25(OH)₂D wykonanych metodą półautomatyczną CLIA na analizatorze IDS-iSYS względem

metody manualnej RIA wykorzystano 70 próbek surowicy pochodzącej od pacjentów IPCZD.

Do analizy dokładności automatycznej metody CLIA oznaczeń stężeń 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS wykorzystano 40 próbek kontrolnych systemu kontroli jakości DEQAS (numery 411-450) i porównano z wynikami oznaczeń wykonanymi metodami wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oraz tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczą (LC-MS/MS) stanowiącymi „złoty standard” oznaczeń stężeń 25(OH)D. Te same próbki kontrolne posłużyły dodatkowo do oceny zgodności metod oznaczania stężeń 25(OH)D na analizatorze IDS-iSYS względem LIAISON. Wartości stężeń 25(OH)D mierzonych metodami HPLC i LC-MS/MS stanowią wartość średnią wyników oznaczeń wykonanych przez uczestników kontroli jakości DEQAS i pochodzą z informacji dostarczanych ośrodkom biorącym udział w tej kontroli. Międzynarodowa kontrola jakości DEQAS prowadzona jest w Zakładzie Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej (ZBRiMD) IPCZD od 2009 roku (certyfikat DEQAS) dla metod rutynowo stosowanych do pomiaru stężeń metabolitów witaminy D, to jest metody automatycznej CLIA oznaczeń stężeń 25(OH)D na analizatorze LIAISON oraz metody manualnej RIA oznaczeń stężeń 1,25(OH)₂D.

Analizy przeprowadzone na posiadanym materiale zostały wykonane w ramach badań statutowych poszerzonej kontroli jakości w ZBRiMD IPCZD. Badania nie wymagały zgody Komisji Bioetycznej. Badacze nie mieli dostępu do danych osobowych pacjentów.

Test IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D

IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D (IDS-iSYS, Immunodiagnostic Systems) jest testem kompetycyjnym wykorzystującym zjawisko chemiluminescencji. We wstępnej fazie oznaczenia, przy użyciu odczynnika zawierającego NaOH, następuje uwolnienie zawartej w próbce 25(OH)D z białka wiążącego witaminę D (DBP). Kolejnym etapem jest inkubacja badanej próbki ze swoistymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko 25(OH)D wyznakowanymi akrydyną. Następnie do mieszaniny dodawane są cząstki magnetyczne związane z 25(OH)D, które wiążą się z kompleksem przeciwciało-25(OH)D powstałym w czasie pierwszej inkubacji w pozostałych wolnych miejscach. Po inkubacji mieszanina reakcyjna zostaje przeniesiona do komory pomiarowej, gdzie, na zasadzie oddziaływań magnetycznych pomiędzy elektrodą a cząstkami magnetycznymi, cały kompleks jest wychwytywany przez elektrodę. Następuje inicjacja reakcji z udziałem akrydyny, której produkt stanowią fotony światła zliczane przez fotopowielacz we względnych jednostkach luminescencji (ang. *relative light unit* – RLU). Ich ilość jest odwrotnie proporcjonalna do ilości 25(OH)D znajdującej się w próbce badanej. Stężenie 25(OH)D odczytywane jest z krzywej kalibracyjnej.

Test 1,25-Dihydroxy Vitamin D

Test IDS-iSYS 1,25-Dihydroxy Vitamin D (IDS-iSYS, Immunodiagnostic Systems) to kompletny półautomatyczny system umożliwiający oznaczenie stężenia 1,25(OH)₂D

w surowicy. Pierwszy etap oznaczenia wykonywany jest manualnie i polega na immunologicznym oczyszczeniu badanej próbki z użyciem kapsułki z żelą związanym z monoklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko 1,25(OH)₂D. Przed naniesieniem na żel, badaną próbkę poddaje się delipidacji siarczanem dekstranu i chlorkiem magnezu. Niezwiązane z żelą substancje usuwane są przy użyciu metanolu, natomiast wymywanie zabsorbowanego 1,25(OH)₂D odbywa się przy pomocy etanolu. Eluaty poddaje się następnie odparowaniu w atmosferze azotu w temperaturze 40°C. Kolejne etapy oznaczenia wykonywane są automatycznie przez analizator IDS-iSYS, poczynawszy od inkubacji oczyszczonej próbki z biotynylowanym przeciwciałem owczym skierowanym przeciwko 1,25(OH)₂D. W następnym etapie dodawana jest 1,25(OH)₂D znakowana akrydyną, która współzawodniczy o miejsca wiązania przeciwciała. W końcowej fazie oznaczenia pokryte streptawidyną magnetyczne cząstki wiążą, na zasadzie oddziaływań z biotyną, powstały kompleks, który po odpłukaniu z niezwiązanego materiału wydobywany jest przez elektrodę. Dodanie odczynników wyzwalających inicjuje reakcję chemiluminescencyjną. Mierzony przez fotopowielacz w jednostkach RLU sygnał świetlny jest odwrotnie proporcjonalny do ilości 1,25(OH)₂D zawartego w próbkach badanych. Stężenie 1,25(OH)₂D odczytywane jest z krzywej kalibracyjnej.

Test 25(OH) Vitamin D Total

Liaison 25(OH) Vitamin D Total (LIAISON, Biomedica Gruppe) jest kompetycyjnym testem wykorzystującym zjawisko chemiluminescencji, gdzie do identyfikacji 25(OH)D zastosowano specyficzne przeciwciało. W trakcie pierwszej inkubacji odczynnik zawierający etanol oraz detergent powoduje uwolnienie 25(OH)D zawartej w próbce badanej z DBP. Wolna 25(OH)D ulega wiązaniu z przeciwciałem opłaszczającym cząstki paramagnetyczne. W następnym etapie dodawana jest znakowana izoluminolem 25(OH)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 w jednostkach RLU. Ich ilość jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia 25(OH)D w próbce badanej odczytywanego z krzywej kalibracyjnej.

Test 1,25(OH)₂-Vitamin D-RIA-CT

Test 1,25(OH)₂-Vitamin D-RIA-CT (DIASource) jest manualnym testem RIA. Zasadą metody jest współzawodnictwo stałej ilości 1,25(OH)₂D znakowanej radioaktywnym I¹²⁵ ze zmienną ilością 1,25(OH)₂D pochodzącą z próbki badanej o stałą ilość miejsc wiążących na specyficznych przeciwciałach opłaszczających wewnętrzną powierzchnię probówek. Próbkę surowicy badanej są wstępnie ekstrahowane i wieloetapowo czyszczone przy użyciu rozpuszczalników organicznych (eter dwuizopropylowy, cykloheksan, octan etylu, etanol bezwodny, dwuchlorometan). Stężenia

1,25(OH)₂D odczytywane są z krzywej kalibracyjnej wykonywanej równocześnie przy każdej serii oznaczeń.

Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono przy pomocy programu Statistica 8.0 PL (Statsoft, USA) oraz 30-dniowej wersji testowej programu XLSTAT 2016 (Addinsoft, USA). Korelacje oceniono testem Pearsona, a współczynnik determinacji obliczono metodą regresji liniowej opartej o dopasowanie krzywej regresji metodą najmniejszych kwadratów. Liniowość zależności badano przy użyciu analizy Passing-Bablok. Kierunki różnic między poszczególnymi metodami określono przy pomocy wykresu Blanda-Altmana. Za poziom istotności przyjęto wartość $p < 0,05$ (17-20).

WYNIKI

Oznaczenia stężenia 25(OH)D total w surowicy krwi metodą automatyczną CLIA na analizatorze IDS-iSYS

Powtarzalność i odtwarzalność oznaczeń w materiale pediatrycznym przedstawiono w tabeli 1. Automatyczna metoda CLIA oznaczeń stężeń 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS wykazuje wysoką powtarzalność w materiale pediatrycznym. Zmienność wewnątrzoznaczeniowa była około dwukrotnie niższa w porównaniu z danymi producenta dla osób dorosłych. Odtwarzalność oznaczeń w materiale pediatrycznym była również wysoka i zbliżona z danymi producenta u osób dorosłych. W porównaniu z automatyczną metodą CLIA oznaczeń stężeń 25(OH)D total na analizatorze LIAISON (dane producenta) wyznaczony dla analizatora IDS-iSYS współczynnik zmienności wewnątrzoznaczeniowej nie różnił się, natomiast międzyoznaczeniowej był około 1,4-krotnie wyższy.

Rycina 1 przedstawia porównanie oznaczeń stężenia 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS względem LIAISON w materiale pediatrycznym, a w materiale kontroli jakości DEQAS – na rycinie 2. Porównanie oznaczeń stężeń 25(OH)D total metodami automatycznymi CLIA na analizatorach IDS-iSYS i LIAISON wykonano na podstawie oznaczeń w materiale pediatrycznym oraz materiale kontroli jakości DEQAS. Analiza regresji liniowej Pearsona wykazała wysoką korelację wyników

oznaczeń wymienionymi metodami w materiale pediatrycznym ($r = 0,911$; $p = 0,000$; $y = 1,09x + 4,55$) oraz w materiale kontroli jakości DEQAS ($r = 0,962$; $p = 0,000$; $y = 1,51x + 2,59$). Analiza wykresu Blanda-Altmana ujawniła natomiast średni bias między metodami wynoszący w materiale pediatrycznym 25,7% (95% CI: 21,8-29,5%) oraz w materiale DEQAS 49,4% (95% CI: 46,4-52,4%). Przeprowadzona analiza regresji Passing-Bablok wykazała zależność $y = 1,26x + 0,66$ w materiale pediatrycznym. Nie stwierdzono znaczącego odchylenia od liniowości ($p = 0,711$). Podobnie w materiale kontrolnym DEQAS nie stwierdzono odchylenia od liniowości ($p = 0,526$), natomiast zależność między metodami kształtowała się następująco: $y = 1,63x + 0,42$.

Na rycinach 3 i 4 przedstawiono: porównanie oznaczeń stężenia 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS względem metody HPLC (ryc. 3) oraz metody LC-MS/MS (ryc. 4) w materiale kontroli jakości DEQAS – dokładność oznaczeń. Porównanie oznaczeń stężenia 25(OH)D total automatyczną metodą CLIA na analizatorze IDS-iSYS względem metod HPLC i LC-MS/MS uważanych za „złoty standard” w materiale kontroli jakości DEQAS potraktowano jako ocenę dokładności tejże metody. Wykazano na podstawie analizy regresji liniowej Pearsona wysoką korelację między wynikami oznaczeń stężenia 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS a wynikami oznaczeń otrzymanych metodami HPLC ($r = 0,972$; $p = 0,000$; $y = 1,20x + 2,94$) oraz LC-MS/MS ($r = 0,972$; $p = 0,000$; $y = 1,25x + 2,82$). Analiza regresji Passing-Bablok wskazała na liniowość zależności wyników oznaczeń względem metody HPLC ($p = 0,526$; $y = 1,25x + 1,94$) oraz LC-MS/MS ($p = 0,972$; $y = 1,29x + 2,32$). Jednocześnie wykres Blanda-Altmana ujawnił dodatnie procentowe odchylenie wyników oznaczeń 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS wynoszące średnio 29,4% (95% CI: 26,0-32,7%) względem metody HPLC oraz 33,1% (95% CI: 29,6-36,6%) względem metody LC-MS/MS.

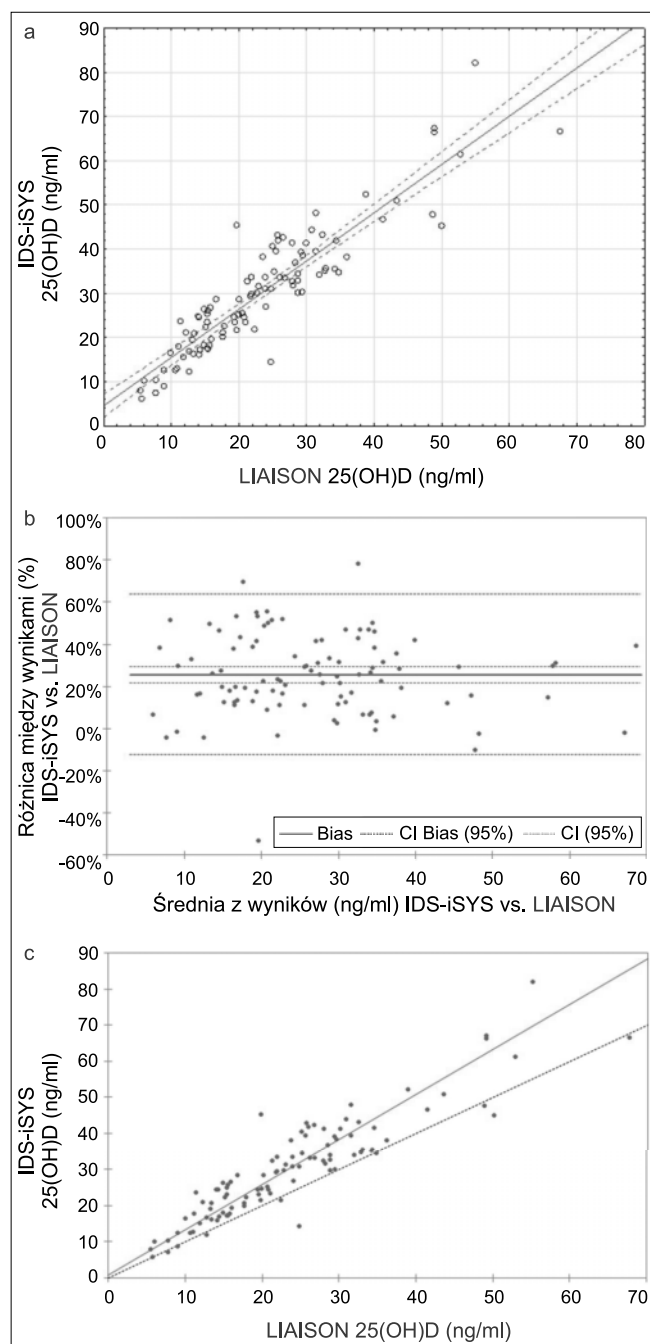
Oznaczenia stężenia 1,25(OH)₂D w surowicy krwi metodą półautomatyczną CLIA na analizatorze IDS-iSYS

Powtarzalność i odtwarzalność oznaczeń w materiale pediatrycznym zaprezentowano w tabeli 2.

Tab. 1. Powtarzalność i odtwarzalność oznaczeń stężeń 25(OH)D total metodą automatyczną CLIA na analizatorze IDS-iSYS w materiale pediatrycznym

		IDS-iSYS		LIAISON
		ZBRiMD IPCZD	Dane producenta	Dane producenta
Powtarzalność	Liczba oznaczeń	10	80	80
	Średnia (ng/ml)	35,3	36,2	35,0
	Odchylenie standardowe	0,9	2,0	1,0
	Współczynnik zmienności (%)	2,6	5,5	2,9
Odtwarzalność	Liczba oznaczeń	10	80	80
	Średnia (ng/ml)	39,4	36,2	35,0
	Odchylenie standardowe	3,6	3,3	2,2
	Współczynnik zmienności (%)	9,1	9,2	6,3

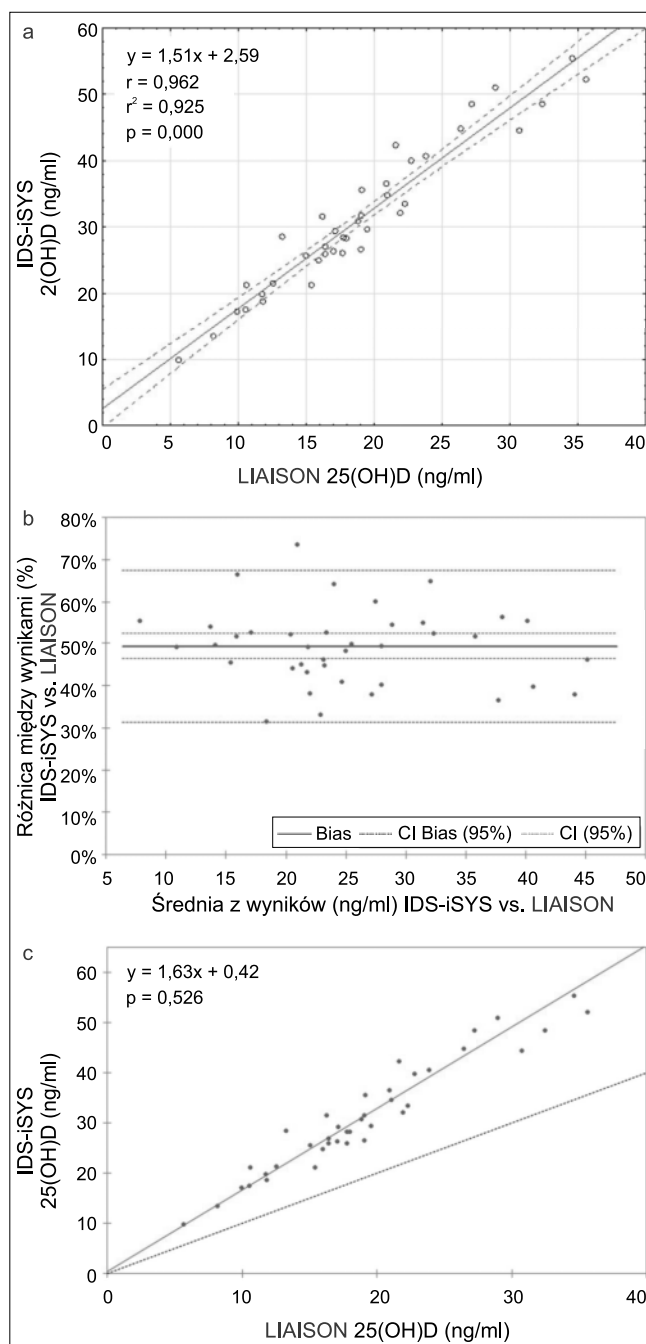
ZBRiMD IPCZD – Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”



Ryc. 1. Porównanie oznaczeń stężenia 25(OH)D total automatycznymi metodami IDS-iSYS względem LIAISON w materiale pediatrycznym: a) krzywa regresji liniowej, b) wykres Blanda-Altmana, c) krzywa regresji Passing-Bablok

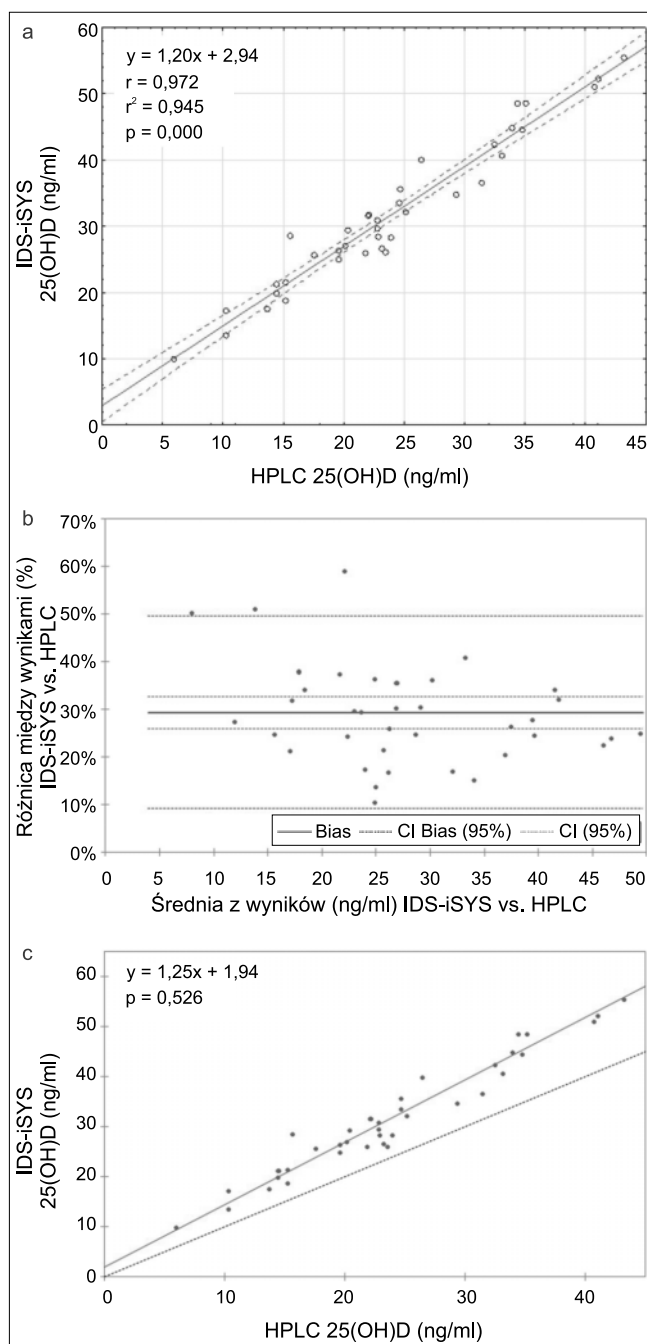
Półautomatyczna metoda CLIA oznaczania stężenia 1,25(OH)₂D na analizatorze IDS-iSYS wykazuje zarówno wysoką precyzję wewnątrzoznaczeniową, jak i międzyoznaczeniową w materiale pediatrycznym. Jednocześnie wyznaczony dla metody CLIA błąd odtwarzalności w materiale pediatrycznym nie różnił się znacząco od danych producenta dla osób dorosłych. W porównaniu z danymi producenta dla metody manualnej RIA precyzja oznaczeń stężenia 1,25(OH)₂D na analizatorze IDS-iSYS była większa, szczególnie wewnątrzoznaczeniowa.

Porównanie oznaczeń stężenia 1,25(OH)₂D na analizatorze IDS-iSYS względem metody manualnej



Ryc. 2. Porównanie oznaczeń stężenia 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS względem LIAISON w materiale kontroli jakości DEQAS: a) krzywa regresji liniowej, b) wykres Blanda-Altmana, c) krzywa regresji Passing-Bablok

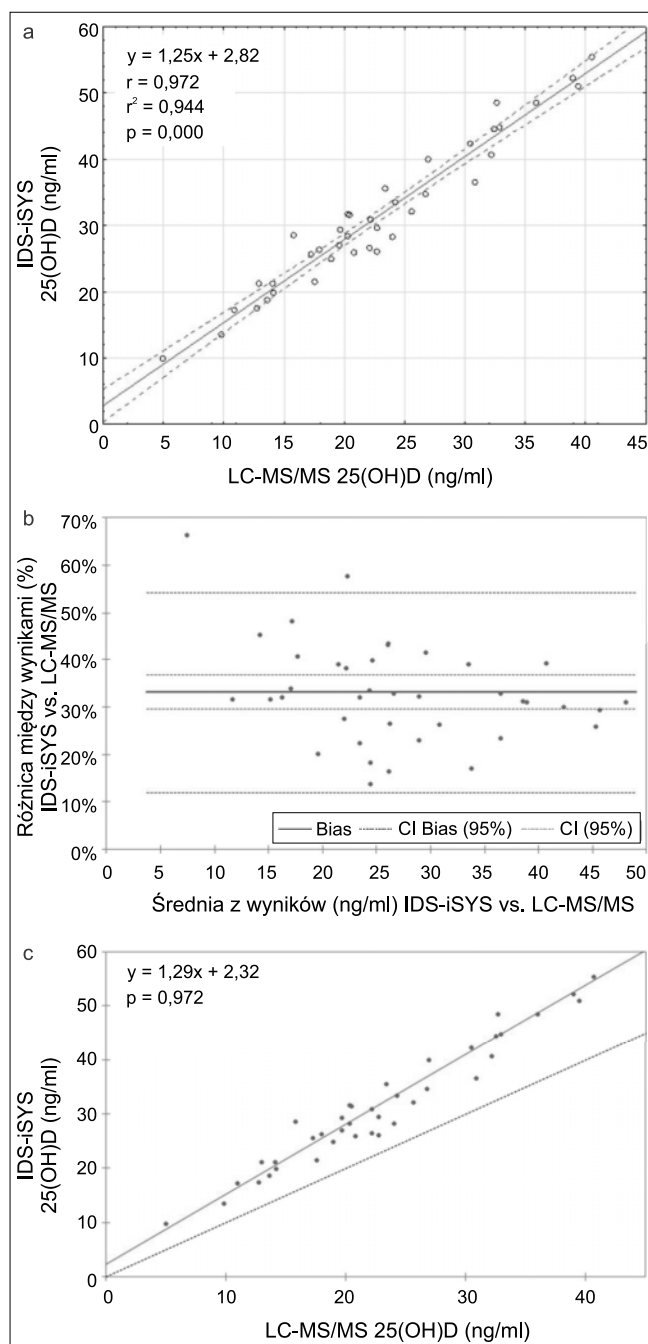
RIA w materiale pediatrycznym pokazuje rycina 5. Wykazano satysfakcjonującą korelację w materiale pediatrycznym między wynikami oznaczeń stężenia 1,25(OH)₂D otrzymanych półautomatyczną metodą CLIA oraz metodą manualną RIA ($r = 0,878$; $p = 0,000$; $y = 0,85x + 14,22$). Średnie odchylenie między metodami oceniane na podstawie analizy wykresu Blanda-Altmana wyniosło 11,0% (95% CI: 5,8-16,2%). Analiza regresji Passing-Bablok ujawniła zależność $y = 0,99x + 6,74$ między metodami. Jednocześnie nie stwierdzono odchylenia od liniowości tejże zależności ($p = 0,999$).



Ryc. 3. Porównanie oznaczeń stężenia 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS względem metody HPLC w materiale kontroli jakości DEQAS: a) krzywa regresji liniowej, b) wykres Blanda-Altmana, c) krzywa regresji Passing-Bablok

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że metody CLIA oznaczania stężenia 25(OH)D total oraz 1,25(OH)₂D w surowicy krwi przeznaczone na platformę analityczną IDS-iSYS charakteryzują się wysoką precyzją oznaczeń w materiale pediatrycznym. Udokumentowana wysoka powtarzalność i odtwarzalność metody CLIA, automatycznej w przypadku 25(OH)D total i półautomatycznej w przypadku 1,25(OH)₂D, przełamuje problem niskiej wiarygodności oznaczeń metabolitów witaminy D metodami manualnymi, gdzie błąd metody wynosił 20-30% (21). Rozpowszechnienie metod



Ryc. 4. Porównanie oznaczeń stężenia 25(OH)D total na analizatorze IDS-iSYS względem metody LC-MS/MS w materiale kontroli jakości DEQAS: a) krzywa regresji liniowej, b) wykres Blanda-Altmana, c) krzywa regresji Passing-Bablok

automatycznych spowodowało poprawę precyzji oznaczeń odnotowaną w systemie DEQAS (15). Zmienność analityczna obu metod w użytym w badaniu materiale pediatrycznym jest porównywalna lub nawet lepsza od wyników otrzymanych dla osób dorosłych (22-24).

Poddając ocenie porównanie metod oznaczania stężenia 25(OH)D total w systemach IDS-iSYS i LIAISON w materiale pediatrycznym, wykazano ich dużą korelację. Pomimo nieznacznych różnic technologicznych analiza Blanda-Altmana ujawniła około 25% odchylenie wyników oznaczeń między metodami. W materiale kontrolnym DEQAS błąd między wynikami otrzymanymi

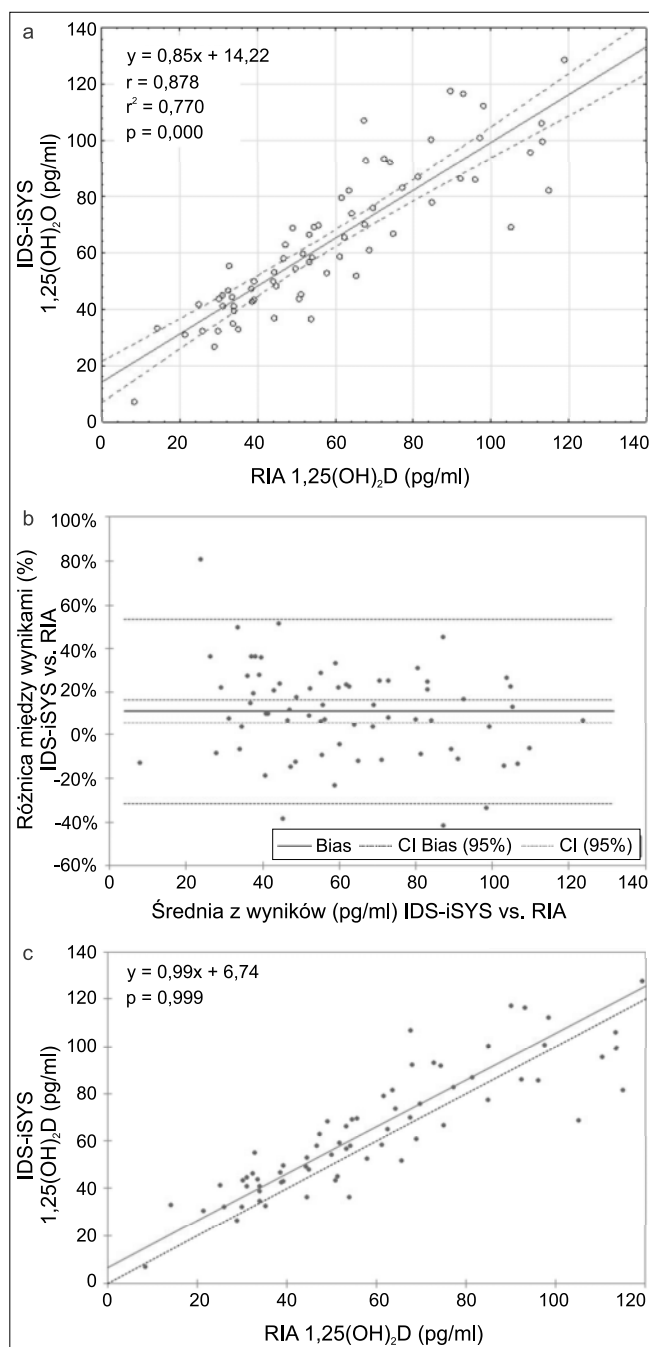
Tab. 2. Powtarzalność i odtwarzalność oznaczeń stężeń 1,25(OH)₂D metodą półautomatyczną CLIA na analizatorze IDS-iSYS w materiale pediatrycznym

		IDS-iSYS		RIA
		ZBRiMD IPCZD	Dane producenta	Dane producenta
Powtarzalność	Liczba oznaczeń	10	80	20
	Średnia (pg/ml)	45,2	64,1	24,5
	Odchylenie standardowe	2,9	4,6	2,3
	Współczynnik zmienności (%)	6,4	7,2	9,3
Odtwarzalność	Liczba oznaczeń	10	80	10
	Średnia (pg/ml)	52,6	64,1	33,4
	Odchylenie standardowe	5,0	5,9	3,6
	Współczynnik zmienności (%)	9,6	9,2	11,3

ZBRiMD IPCZD – Zakład Biochemii, Radioimmunologii i Medycyny Doświadczalnej Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”

tymi metodami wyniósł niespełna 50%, choć analiza regresji wskazywała na ich dobrą zgodność. Obie metody wykorzystują technologię chemiluminescencyjnych testów immunologicznych (CLIA), a sygnał świetlny mierzony w jednostkach RLU jest odwrotnie proporcjonalny do stężenia 25(OH)D w próbce badanej, lecz używają różnych znaczników (IDS-iSYS – przeciwciała znakowane akrydyną, LIAISON – 25(OH)D związana z pochodną izoluminolu). Jak już wcześniej wspomniano, obie metody równocześnie oznaczają 25(OH)D₂ oraz 25(OH)D₃, spełniając standardy określone w ostatnich zaleceniach (1, 2). Metoda oznaczeń na analizatorze LIAISON wykorzystuje przeciwciała, którego specyficzność względem 25(OH)D₃; 25(OH)D₂; witaminy D₃ (cholekalcyferolu); witaminy D₂ (ergokalcyferolu); 1,25(OH)₂D₃; 1,25(OH)₂D₂; 24,25(OH)₂D₃ oraz 3-epi-25(OH)D₃ wynosi odpowiednio: 100%; 104%; < 1%; < 1%; 17%; 40%; brak danych oraz < 1% (dane producenta). Metoda oznaczeń w systemie IDS-iSYS również wykorzystuje przeciwciała, a jego specyficzność wynosi względem 25(OH)D₃; 25(OH)D₂; witaminy D₃ (cholekalcyferolu); witaminy D₂ (ergokalcyferolu); 1,25(OH)₂D₃; 1,25(OH)₂D₂; 24,25(OH)₂D₃ oraz 3-epi-25(OH)D₃ (kolejność jak wyżej) odpowiednio: 97%; 120%; 0%; 0%; -23%; 9%; 124% oraz 1% (dane producenta). W efekcie opisanej powyżej charakterystyki obu metod, wskazującej na ich podobieństwo metodologiczne, oczywista jest ich wysoka zbieżność widoczna w analizie regresji liniowej. Niewielkie różnice w specyficzności względem metabolitów witaminy D mogły zaważyć na zaobserwowanej w analizie wykresu Blanda-Altmana różnicy między wynikami oznaczeń. Na uwagę zasługuje niska specyficzność obu metod względem C3-epimeru-25(OH)D₃, który w surowicy ludzkiej występuje w ilości od 2-20% (12, 13, 21, 23).

Dokładność automatycznej metody CLIA oznaczania stężenia 25(OH)D na analizatorze IDS-iSYS oceniono w materiale kontroli jakości DEQAS względem me-

**Ryc. 5.** Porównanie oznaczeń stężenia 1,25(OH)₂D na analizatorze IDS-iSYS względem metody manualnej RIA w materiale pediatrycznym: a) krzywa regresji liniowej, b) wykres Blanda-Altmana, c) krzywa regresji Passing-Bablok

tod bezpośrednich uznawanych za „złoty standard”, jakimi są metoda HPLC i LC-MS/MS. Mają one 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 (27, 28). Przyjmuje się, że ich specyficzność w stosunku do 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ oraz C3-epimeru-25(OH)D₃ wynosi 100%. Automatyczna metoda CLIA oznaczania stężenia 25(OH)D na analizatorze IDS-iSYS wykazuje satysfakcjonującą dokładność (dodatni bias rzędu 30%) względem metod referencyjnych. Obserwacja ta jest zgodna z danymi opublikowanymi w piśmiennictwie (16, 23, 25).

Do rutynowego oznaczania stężenia 1,25(OH)₂D w ZBRiMD do roku 2014 stosowana była metoda manualna RIA firmy DIASource, gdzie wykorzystywano 1,25(OH)₂D znakowane izotopem I¹²⁵. Metoda ta charakteryzuje się dużą pracochłonnością. Dodatkowym problemem jest narażenie na promieniowanie jonizujące X (izotop I¹²⁵) oraz duże zużycie toksycznych rozpuszczalników organicznych (cykloheksan, dichlometan). Badania powtarzalności oraz odtwarzalności oznaczeń stężenia 1,25(OH)₂D półautomatyczną metodą CLIA na analizatorze IDS-iSYS wykazały jej wysoką precyzję. Użycie tej metody w rutynowej pracy laboratorium pozwoliło na skrócenie czasu oczekiwania na wynik oraz ograniczenie materiału potrzebnego do wykonania oznaczenia, co jest szczególnie istotne w szpitalu pediatrycznym, przy zachowaniu, a nawet polepszeniu standardów diagnostycznych.

Specyficzność metody RIA względem metabolitów witaminy D kształtuje się następująco: 100%; 70%; 0,0004%; brak danych; 0,0027%; 0,007%; brak danych oraz brak danych dla 1,25(OH)₂D₃; 1,25(OH)₂D₂; 25(OH)D₃; 25(OH)D₂; 24,25(OH)₂D₃; 24,25(OH)₂D₂; 1,24,25(OH)₃D₃ oraz 3-epi-25(OH)D₃, odpowiednio (dane producenta). Dla porównania, metoda półautomatyczna na analizatorze IDS-iSYS wykorzystuje swoje przeciwciasto, którego specyficzność względem 1,25(OH)₂D₃; 1,25(OH)₂D₂; 25(OH)D₃; 25(OH)D₂;

24,25(OH)₂D₃; 24,25(OH)₂D₂; 1,24,25(OH)₃D₃ (kolejność jak wyżej) jest następująca: 98%; 57%; 0,0014%; 0,0005%; 0,0005%; 0,041%; 92% oraz 0,0005% (dane producenta). Analiza wykresu Blanda-Altmana wykazała dobrą zgodność porównywanych metod oznaczania stężenia 1,25(OH)₂D. Współczynnik korelacji Pearsona wskazuje jednak na pewne różnice w wynikach oznaczeń. Nie jest to zaskakujące, biorąc pod uwagę odmienne technologie zastosowane w testach RIA i CLIA.

WNIOSKI

W świetle zmiany spojrzenia na witaminę D z żywieniowego na endokrynologiczny wiarygodność oznaczeń metabolitów witaminy D jest niezwykle istotna dla klinicznej oceny pacjenta pediatrycznego. Głównym więc zamysłem przeprowadzonych porównań była dobra wiarygodność oznaczeń 25(OH)D oraz 1,25(OH)₂D dla rutynowych potrzeb szpitala pediatrycznego poprzez wprowadzenie najnowszych standardów metodologicznych. Uzyskane wyniki wskazują na wysoką precyzję i dokładność oznaczeń metabolitów witaminy D przy użyciu analizatora IDS-iSYS. Jednocześnie zgodność z metodami rutynowo stosowanymi w ZBRiMD sugeruje możliwość zastosowania metod CLIA na analizator IDS-iSYS w praktyce klinicznej IPCZD z zachowaniem najwyższych standardów diagnostyki laboratoryjnej.

PIŚMIENNICTWO

- Pludowski P, Holick MF, Pilz S et al.: Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality – a review of recent evidence. *Autoimmun Rev* 2013; 12(10): 976-989.
- Holick MF, Binkley NC, Bischoff-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.
- Giovannucci E: Epidemiological evidence for vitamin D colorectal cancer. *J Bone Miner Res* 2007; 22 (suppl. 2): V81-V85.
- Giovannucci E, Liu Y, Hollis BW: 25-hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. *Arch Intern Med* 2008; 168: 1174-1180.
- Dobnig H, Pilz S, Scharnagel 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: 1340-1349.
- Forman JP, Giovannucci E, Holmes MD et al.: Plasma 25-hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. *Hypertension* 2007; 49: 1063-1069.
- Pitz 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: 423-424.
- Harris SS: Vitamin D in Type 1 diabetes prevention. *J Nutr* 2005; 135: 323-325.
- Hollis BW: Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 507S-510S.
- Hollick MF: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281.
- Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y et al.: FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 429-435.
- Carter GD: 25-hydroxyvitamin D assays: the quest for accuracy. *Clin Chem* 2009; 55: 1300-1302.
- Carter GD: Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets* 2011; 1291: 19-28.
- Carter GD, Carter R, Jones J, Berry J: How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the International Vitamin D External Quality. *Clin Chem* 2004; 50: 2195-2197.
- 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.
- Carter GD, Jones JC: Use of a common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for serum 25-hydroxyvitamin-D. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 79-81.
- Bland JM, Altman DG: Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-310.
- Bland JM, Altman DG: Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard methods is misleading. *Lancet* 1995; 346: 1085-1087.
- Westgard JO, Hunt MR: Use and interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. *Clin Chem* 1973; 19: 49-57.
- Dallal GA: Comparing two measurement devices. *The Little Handbook of Statistical Practice*; <http://www.tufts.edu/~gdallal/LHSP.HTM>.
- Lips P, Chapuy MC, Dawson-Hughes B et al.: An international comparison of serum 25-hydroxyvitamin D measurements. *Osteoporosis Int* 1999; 9: 394-397.
- 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.
- Wallace AM, Gibson S, de la Hunt A et al.: Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 2010; 75: 477-488.
- Moon HW, Cho JH, Hur M et al.: Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem* 2012; 45: 326-330.
- 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.