

Imunochemická měření 25-OH vitamínu D. Dominují analytické nebo klinické problémy?

J. Vávrová, B. Friedecký

Odborná literatura už několik let produkuje bezpočet publikací zabývajících se různými problémy klinického použití, metabolismu a analytiky vitamínu D. Zcela recentně upozorňujeme na velkou přehledovou práci (1). Velmi cenné je na této práci respektování kontextu nových a zpřesňovaných poznatků klinických, metabolických a analytických. Takový přístup je jedinečně schopný objasnit poznávání studovaných problémů, ale navzdory jeho evidentní platnosti se s ním setkáváme v pracích mnoha autorů jen zřídka.

Vazebné proteiny, volné formy 25-OH D, 3-epi 25-OH D3, vitamin D2/vitamin D3

95-99 % cirkulujícího vitamínu D je transportováno v séru prostřednictvím vitamínu D vazebného proteinu (VDBP). VDBP má afinitu k 25-OH vitamínu D, 24,25 (OH)₂ vitamínu D3, zatímco afinita 1,25 (OH)₂ vitamínu D je 10 až 100krát nižší. Potřebné uvolňování vitamínu D z vazby je prováděno u různých imunochemických metod různým způsobem s různými výsledky, takže se může podílet na diferencích výsledků mezi metodami.

Volný vitamin D (free vitamin D), definovaný jako složka bez vazby na VDBP a albumin (cca 1 % z celkového cirkulujícího množství) a biologicky přístupný (biological available vitamin D-BAVD), definovaný jako součet volného a na albumin vázaného vitamínu D, jsou někdy považovány za další budoucí biomarkery.

Mezi další často zmiňované metabolity vitamínu D patří C3-epimery vitamínu D, molekuly identické struktury, odlišující se pouze stereochemickou konfigurací hydroxylové skupiny na třetím uhlíkovém atomu. Vazby C3-epimerů na VDBP a na receptor vitamínu D jsou stejné jako u 25-OH vitamínu D, proto C3-epimery a 25-OH vitamin D vzájemně významně neinterferují při imunoanalytických nekompetitivních stanoveních. Zvýšená koncentrace 3-epi může působit vyšší výsledek 25-OH vitamínu D u kompetitivních metod (Roche), u ostatních imunochemických metod je vliv 3-epi malý.

Původní představa, že zvýšená koncentrace 3-epi je typická zejména pro děti, se zcela nepotvrdila, přestože zvýšené hodnoty 3-epi jsou skutečně pro vzorky dětí typické. Metody LC-MS/MS s limitem detekce kolem 2 nmol/l, ukázaly, že hladiny C3-epimerů o hodnotách nad mez stanovitelnosti lze nalézt až u 99 % dospělé populace, a to v překvapivě širokém rozmezí 2,5-59 nmol/l. Nicméně, jak bylo shora uvedeno, vliv na výsledky stanovení je málo významný (u nekompetitivních metod nevýznamný). Program DEQAS dokonce ukazuje, že většina rutinně používaných LC-MS/MS metod není schopna C3-epimery vůbec separovat.

Při stanoveních imunochemickými metodami působí mnohem větší problémy než přítomnost C3-epimerů poměr vitamínů D2 a D3. Neekvivalence D2 a D3 je pozorována např. u metod Abbott, Roche, Vidas. Zvýšený obsah vitamínu D2 ve vzorku může výrazně změnit bias rutinních metod, což potvrzují kontrolní cykly mezinárodního systému DEQAS (příklad v tabulce č.1 to potvrzuje pro Roche, Abbott a iSYS, zatímco výsledky DiaSorin a Siemens nejsou poměrem D2/D3 ovlivněny).

Tabulka 1: Viv poměru D2/D3 na bias 25-OH vitamínu D u několika metod. Data z DEQAS programu.

	Bias %	
	3% D2	27% D2
Roche	14	-4
Abbott	0,5	-19
Siemens	8	3
DiaSorin	-15	-20
IDS iSYS	22	-4

24,25 dihydroxyvitamin D3

Metabolit 24,25 (OH)₂ vitamínu D je klíčovým produktem katabolismu vitamínu D, kdy hydroxylace v poloze 24 je katalyzovaná enzymem CYP24A1. Přítomnost 24,25 (OH)₂ vitamínu D působí při použití spikování kontrolních vzorků pozitivní chyby v obrovském rozmezí 5-580 % v závislosti na metodě. Tato interference, signifikantně ovlivňující měření celkového 25-OH vitamínu D imunochemickými metodami, se neprojevuje při měření metodami separačními.

Je třeba poznamenat že výrazné interference, způsobující nesrovnatelnost hodnot celkového 25-OH vitamínu D v systémech EHK, souvisí významně s velikostí přídatku 24,25 (OH)₂ vitamínu D do kontrolních vzorků. Systém DEQAS používal v něk-

terých cyklech přídavek cca 70 nmol/l, skutečná koncentrace u pacientů je však mnohem nižší (4-15 nmol/l) a také koncentrace 24,25 (OH)₂ D uváděné již v certifikátu SRM 972a se pohybují v pouhých 3,4-6,4 nmol/l). Z toho plyne, že při studování vlivu 24,25-(OH)₂ D bylo v programu DEQAS použito nereálně vysokého přídávku metabolitu. Samotné stanovení 24,25 (OH)₂ vitamínu D nedosahovalo do nedávna podle údajů z programu DEQAS (duben 2015, říjen 2015) dostatečné úrovně preciznosti (v dubnu 2015 CV% = 25 – 55; v říjnu 2015 CV% = 27 – 33). Shrnutí interference metabolitů při stanovení 25-OH vitamínu D je k nalezení v práci Cartera a spol. (3).

Recentně byla vyvinuta a publikována referenční metoda pro stanovení 24,25(OH)₂ vitamínu D (2) s použitím principu LC-MS/MS s vysokými analytickými parametry (CV%= cca 1, recovery 99%). Její význam spočívá nejen ve zpřesnění míry interference při měření vitamínu D, ale také při výpočtu nově uvažovaného markeru VMR = 25-hydroxyvitamin D/24,25-dihydroxyvitamin D (4).

Standardizace, VDSP, bias, dokumentace výrobců

Probíhá na mezinárodní úrovni prostřednictvím známého programu VDSP s použitím referenčního systému obsahujícího dvě referenční metody LC-MS/MS ekvivalentní kvality (metody NIST a Ghent) a čtyřsložkový certifikovaný referenční materiál SRM NIST 972a. Podmínkou pro získání jednoročního certifikátu návaznosti v programu VDSP je dosažení bias b% ≤ 5,0 (od referenčních metod NIST nebo Ghent) a hodnota preciznosti CV% ≤ 10,0.

Data získaná analýzou výsledků kontrolních programů DEQAS a NHANES ukazují, že vliv programu VDSP na zlepšení analytické kvality stanovení 25-OH vitamínu D není zatím zásadní (5) a také

další data ze studie srovnání čtyř imunochemických metod (Roche, Fujirebo, DiaSorin, iSYS) poskytují stejný závěr (6).

Autoři již zmiňované přehledné studie (1) věnovali velmi důležitou pozornost stavu pracovní dokumentace devíti imunochemických metod různých výrobců. Recovery (míra návaznosti) měření nebylo uvedeno v dokumentaci osmi z nich a dva výrobci dokonce nezmínili ani, zdali a jak jsou kalibrace jejich metod návazné na referenci. Dost zářející skutečností s ohledem na to, že pro řadu klinických laboratoří je pracovní dokumentace metod rozhodujícím faktorem pro provádění měření. Navíc tak závažný nedostatek v úrovni poskytovaných informací budí rozpaky při uvažování zákazníka o ceně certifikačního dokumentu, pokud je tento vůbec k dispozici. Zkrátka vzniká otázka, zda je preferován dokument před realitou.

Kvalita stanovení vitamínu D v závislosti na diagnostice a etnicitě pacientů

Cavalier a spol. (6) testovali novou immunoanalytickou metodu Fujirebo Lumipulse G. Při analytické validaci použili kromě referenční LC-MS/MS metody také tři jiných, obecně používaných imunochemických metod Roche, DiaSorin, iSYS a ověřili základní indikátory analytické kvality. Mnohem zajímavější je, že stejné sestavy metod použili k separátnímu hodnocení několika skupin pacientů s definovaným statem zdraví, nemoci, etnicity a terapie. Pomocí podrobného statistického hodnocení, jehož základem byla referenční metoda, vyhodnotili kvalitu výsledků v těchto skupinách a označili ji semikvantitativně jako dobrou, akceptovatelnou a nedostatečnou. Výsledky jsme shrnuli do tabulky 2. Získaná data jsou překvapivá. Dobrou kvalitu vykazaly, a to jen z 50 %, pouze tři skupiny z pěti. U některých skupin pacientů s různým typem

Tabulka 2. Semikvantitativní hodnocení kvality 25-hydroxyvitamínu D u čtyř imunochemických metod a šesti skupin pacientů

Pacienti	kvalita		
	dobrá	příjemná	nedostatečná
Zdraví	1	1	2
Osteoporóza	-	-	4
Třetí trimestr	1	1	2
Zdraví Afričané	-	-	4
Hemodialyzovaní	-	1	3
JIP	1	1	2

nemoci zjistili autoři u imunochemických metod až na malé, z tabulky zřejmé výjimky, neuspokojivou kvalitu měření. Již v předchozích několika pracích se docházelo k podobným závěrům o významných rozdílech ve výsledcích, dosažených různými imunochemickými metodami u různých typů probandů. V roce 2012 to byli například nizozemští autoři při sledování souborů zdravých, těhotných a pacientů na JIP (7). Práce Cavaliera a spol. ukazuje zásadní problém laboratorní medicíny. Nerovnováhu mezi analytikou a klinikou a její setrvalý stav motivovaný asi nejen nedokonale používanou metodikou vědecké práce, ale i individuálními zvyky a zájmy.

Problémy imunochemických stanovení vitamínu D spočívají v existenci řady interferujících vlivů a také v tom, že velikost a významnost těchto vlivů je různá u různých metod.

Literatura

1. Hermann H, Farrell CJL, Pusceddu I et al.: Assessment of vitamin D status – a changing landscape (Clin Chem Lab Med 2016; DOI 10.1515/cclm-2016-0264).
2. Tai S. S., Nelson M. A.: Candidate Reference Measurement Procedure for the Determination of (24R),25-Dihydroxyvitamin D₃ in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Anal. Chem., 2015, 87 (15), pp 7964–7970.
3. Carter G. D., Jones J. C., Shannon J. et al.: 25-hydroxyvitamin D assays: potential interference from other circulating vitamin D metabolites. J Steroid Biochem Mol Biol.2015.doi:10.1016/j.jsbmb.2015.12.018
4. Wagner D., Hanwell H. E., Schnabl K. et al.: The ratio of serum 24,25-dihydroxyvitamin D to 25-hydroxyvitamin D is predictive of 25-hydroxyvitamin D response to vitamin D supplementation. J Steroid Biochem Mol Biol 2011,126:72-77
5. Friedecký B., Vávrová J.: Aktualizace poznatků o stavu měření 25-hydroxyvitamínu D v séru/plasmě. Minireview 2015-2016. Klin Biochem Metab 2016,24: 10-13
6. Cavalier E., Lukas P., Bekaert A. C. et al.: Analytical and clinical conclusion of the new Fujirebo Lumipulse G non-competitive assay for 25-OH-vitamin D and three immunoassays for 25(OH)D in healthy subjects, osteoporotic patients, third trimester pregnant women, healthy african subjects, hemodialyzes and intensive care patients. Clin Chem Lab Med 2016, 54:1347-1355.
7. Heijboer A. C., Blankenstein M.A., Kema I. P. et al.: Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. Clin Chem 2012, 58:543-548.