

# Vitamin D - současný stav preanalytiky, analytiky a postanalytiky

B. Friedecký

V souladu se současným pochopením obrovského klinického a diagnostického významu vitamínu D se v poslední době prudce zvyšuje počet požadavků na jeho laboratorní vyšetřování. Dotazníková akce Americké asociace klinické chemie konstatuje, že nárůst požadovaných vyšetření za jeden rok (v období 2008-2009) byl u většiny dotázaných laboratoří o více než 50 % a u 27 % dotázaných pracovišť dokonce o více než 100 %. Uvažujeme-li o vitamínu D, musíme specifikovat veličinu, kterou vlastně měříme. Podle údajů respondentů dotazníku 78 % z nich poskytovalo výsledky celkového 25-hydroxyvitamínu D (dále 25-OH-D), 25 % laboratoří poskytovalo i výsledky 1,25-dihydroxyvitamínu D a 32 % poskytovalo výsledky buď frakce 25-OH D2 nebo 25-OH- D3, respektive jejich sumu (zejména laboratoře, používající metod LC-MS/MS). Z výsledků šetření (a i dalších pramenů) plyne nejasnost, jakého specifikovaného analytu by vlastně mělo být používáno. (Rollins G, Clinical Laboratory News 2009, přístupné na <http://www.aacc.org>).

Současně s tímto enormním nárůstem požadavků se objevila řada indicií, svědčících o velmi významných systematických diferencích mezi metodami a laboratořemi. To vede k závažným klinickým rozpakům při interpretaci výsledků a k následné potřebě urychlené standardizace stanovení.

Kritický nedostatek standardizace měření je naprosto zřejmý z výsledků programů externích hodnocení kvality. Patrně nejautoritativnější program EHK pro vitamin D, britský DEQAS (<http://www.deqas.org>) používá směsi nativních sér pacientů. Jsou rozesílány čtvrtletně a v každém cyklu je pět kontrolních vzorků. Výsledky jsou hodnoceny ve skupinách podle použitých diagnostik. Nedávno byly demonstrovány typické hodnoty reprodukovatelnosti uvnitř těchto skupin: CV % =15-20 a typické intervaly průměrů jednotlivých skupin: 31-43, 75-94 a 94-125 nmol/l (Carter GD. Clin Chem. 2009, 55 :1300-1302).

Kontrolní program CAP USA (Ligand) vykazuje podobné výsledky: průměr metody LC-MS/MS 31 µg/l se velmi lišil od neúnosně širokého intervalu průměrů chemiluminiscenčních imunochemických stanovení 41-96 µg/l (Singh R. Clin Chem 2008, 54 :221-222).

Také v programu Německé společnosti klinické chemie a laboratorní medicíny (DGKL) je situace velmi podobná. V cyklu VIT 2/09 bylo dosaženo reprodukovatelnosti CV % = 19-26 a intervalu mezi průměry (u vzorku B) 76-126 µg/l. Konečně v programu SEKK v roce 2009, kde je vitamin D hodnocen jako jeden z kostních markerů, bylo dosaženo reprodukovatelnosti CV % =15-18 a difference mezi průměry dvou dominantně použitých diagnostik (Roche a Immunodiagnosics) byly 90-104 nmol/l, resp. 197-267 nmol/l. Je tedy na místě otázka, zda kvalita výsledků měření, poskytovaných laboratořemi odpovídá jejich klinickému významu.

Problém začíná u způsobu hodnocení výsledků programů EHK, které více, než 20 let (DEQAS) hodnotily analytickou způsobilost laboratoří posuzováním jejich výsledků po metodických skupinách. Nyní si situace vynucuje hodnocení systematických chyb (bias) a k tomu zatím nemají organizátoři EHK nástroje a kriteria. Především chybí cílové hodnoty na bázi mezinárodně schválené referenční metody. Stále narůstá počet laboratoří, které používají namísto málo specifických imunochemických metod vyspělejší analytické technologie LC-MS/MS. Ani to nepřináší zatím žádoucí zlepšení. Důvodem je neexistence referenčních materiálů patřícíné metrologické třídy a referenčních metod, a z toho plynoucí nemožnost návaznosti pracovních kalibrátorů na ně.

Pracovníci programu DEQAS nedávno organizovali experiment, při němž porovnali výsledky účastníků, používajících metodu LC-MS/MS, dosažené kalibrací „in house“ a s použitím jednotného, organizátory poskytnutého kalibrátoru firmy Chromsystems. Výsledkem aplikace jednotného kalibrátoru bylo zlepšení reprodukovatelnosti z 16,4 % na 10,4 % (Carter GD, Jones JC, Annals of Clinical Biochemistry 2009, 46:79-81). Experimentálně tak potvrdili logicky očekávaný závěr, že k zlepšení srovnatelnosti má klíčový význam zlepšení kalibrace. Z hlediska programů EHK a použití pracovních kalibrátorů je zajímavé, že v experimentu se shodně chovaly nativní a lyofilizované materiály.

Naděje na očekávané a tolik potřebné zlepšení lze očekávat od nedávno vytvořeného certifikovaného referenčního materiálu NIST-SRM 972, s hodnotami, certifikovanými metodou LC-MS/MS, který obsahuje jak 25-OH D2, tak i 25-OH D3 (<http://www.nist.gov>) až výrobci začnou odvozovat hodnoty jejich pracovních kalibrátorů od něho.

V České republice dominuje použití měřicího systému Roche. V kontrolním programu SEKK byla ověřena jeho velmi dobrá reprodukovatelnost a finšti

autoři prokázali jeho velmi dobrou srovnatelnost s metodou LC-MS/MS (Leino A a spol. Clin Chem 2008, 54:2059-2062). Nicméně systém Roche měří pouze 25-OH D3. Jiní autoři (Massart C, Souberbielle JC. Clin Chem 2009, 55, 1247-1248) však poukazují na to, že k suplementaci se často používá i 25-OH D2, a že by proto bylo vhodnější měřit sumu 25-OH D2+D3. Reagenční protilátky některých diagnostických kitů na bázi metod RIA patrně reagují s D3 i D2, což může být další příčinou systematických diferencí a interpretačních nejasností.

Jestliže analytické metody stanovení 25-OH-D nejsou dosud na žádoucí úrovni, jsou naopak jeho preanalytické vlastnosti velmi dobré. Jak 25-OH D2, tak i 25-OH D3 vykazují vysokou stabilitu již při pokojové teplotě (Wielders JPM, Wijnberg FA. Clin Chem 2009;55:1584-1585), vynikající odolnost při transportu vzorků, vůči světlu i UV záření a vzorky snesou bez úhony i mnohonásobné zamrazování a rozmrazování (Lewis JG, Elder PA. Clin Chem 2008, 54, 1931-1932). Jak píší Wielders a Wijnberg, jde o analyt „solid as rock“.

Jenže nárůst poznatků je neustálý a přináší řadu překvapení. Stejní autoři, popisující neobvyklou stabilitu 25-OH D, nedávno zjistili, že odběr do gelových zkumavek SST BD působí falešné a vysoké zvýšení zdánlivé koncentrace 25-OH D2, přičemž hodnota 25-OH D3 není vůbec ovlivněna (Elder PA, Lewis JG, King RJ, Florkowski CM. Clin Chim Acta 2009, 410, 95). Lze to brát jako dobrý příklad potřeby neustálé validace preanalytické a analytické fáze vyšetřování pro všechny, zdánlivě i nepatrné varianty provedení analýz.

Nedostatečná úroveň srovnatelnosti způsobuje nedostatečnou znalost referenčních intervalů, rozhodovacích mezí a potřebných dávek k suplementaci. Situaci není v tomto ohledu radno podceňovat. Ve zcela recentní publikaci (Stöckl D a spol. Clin Chim Acta, 2009, 408:8-13) vypočetli autoři, že bias -10 % patrně působí nárůst falešně pozitivních

klinických klasifikací o 40-60 % (podle zvolené hodnoty rozhodovacího limitu), zatímco bias +10 % naopak působí nárůst falešně negativních klasifikací o 14-23 %. Autoři odhadli, že by bylo nezbytné, aby reprodukovatelnost měření nepřevýšila hodnotu  $CV \% = 10$  a bias měření nepřekročil hodnotu 5 %. Jedinou cestou k tomu je standardizace měření prostřednictvím kalibrátorů, návazných na certifikovaný referenční materiál a referenční metodu. První podmínka by mohla být splněna pomocí již zmíněného materiálu NIST-SRM 972, referenční metoda je ve stavu vývoje.

Současný stav stanovení vitamínu D je důvěrně známým modelem stále se opakující situace, když při enormním vzestupu klinického významu analytu se následně zjistí závažné analytické a někdy i preanalytické a postanalytické nedostatky. To navozuje situaci dodatečné a urychlené potřeby standardizace, ustanovení návaznosti výsledků měření, zdokonalování programů externího hodnocení kvality a také jasnější specifikaci měřeného analytu.

### Závěry

25-hydroxyvitamin D je analyt dostatečně stabilní a odolný vůči preanalytickým vlivům. Srovnatelnost výsledků, dosažených různými metodami v různých laboratořích je neakceptovatelně nízká. Důvodem je neexistence návaznosti měření v důsledku absence certifikovaného referenčního materiálu a mezinárodní referenční metody. Recentně vyrobený materiál NIST-SRM 972 může být slibným a silným nástrojem zlepšení analytické fáze vyšetření 25-hydroxyvitamínu D. V postanalytické fázi je nejproblematictější otázkou, zdali je dobře znám předmět měření a zda jde o 25-OH vitamin D3, nebo směs vitaminů D2 a D3 se známým poměrem obou složek. Z hlediska analytické specifičnosti a znalosti charakteru analytu je nejvhodnější k stanovení použít metody LC-MS/MS.

Podpořeno projektem MZO 00179906.