

# ADVIA Centaur Total Vitamin D vizsgálat

Szemponatok, melyeket figyelembe kell venni a biztos, megbízható választ adó D-vitamin teszt kiválasztásához

## Klinikai használhatóság

A D-vitamin egy zsírolékony szteroid hormon, melynek a bélrendszerből történő kalcium abszorpcióban, a kalcium és foszfor hemosztázis szabályozásában van jelentősége. Alapvető szerepet játszik az erős és egészséges csontok kialakításában és fenntartásában a vesén keresztüli kalcium abszorpció segítése révén. A D-vitamin hiány gyermekek esetén régóta az angolkórral, felnőttek esetén az oszteomaláciával hozható összefüggésbe, továbbá a hosszútávú kalcium és D-vitamin elégtelenség oszteoporózishoz vezethet. Ezen túl, az utóbbi években számos tanulmány összefüggésbe hozta az D-vitamin hiányt különböző kórképekkel is, mint a rák, kardiovaszkuláris betegségek, diabétesz és autoimmun betegségek. A D-vitamin-hiány diagnosztizálásának legjobb módja a szérumból történő 25(OH)vitamin D szintek – a cirkuláló D<sub>2</sub> és D<sub>3</sub> formák-mérése, szemben más D-vitamin metabolitok mérésével, mivel a 25(OH)vitamin D szintek a test tartalék D-vitamin státuszát tükrözik és a hiányállapotok klinikai tüneteivel korrelálnak. A D-vitamin táplálékkiegészítők D<sub>2</sub> (ergokalciferol, növényi eredet) és D<sub>3</sub>-vitamin (kolekalciferol, állati eredet és napfény) formákat tartalmaznak. Szükségszerűen fontos, hogy egy D-vitamin teszt képes legyen mérni a 25(OH)vitamin D<sub>2</sub> és D<sub>3</sub> formáinak össz mennyiségét.

## D-vitamin mérés komplexitása

A D-vitamin nagy affinitással, 100%-ban fehérjéhez kötődve található a humán szérumban, így azt mérés előtt a kötőfehérjétől fel kell szabadítani. A folyadék-kromatográfiás - tandem tömeg-spektrometriás (LC-MS/MS) módszerek esetén a fehérjét először kicsapják, majd egy szerves extrakcióval nyerik ki a D-vitamint. A különböző gyártók immunkémiai vizsgálataik esetén a D-vitamin kötőfehérje eltávolítása különböző módokon történik. Az ADVIA Centaur teszt esetén 20 µl minta és 200 µl feloldó ágens 6 percig inkubálódik a küvetében, mely alatt a fehérjék denaturálódnak, másrészt egy vegyület kimosztja a D-vitamint a fehérje fragmentumok közül, ezáltal szabad formába és oldatba hozva azt. Az eljárás alatt az antitestek hozzáadódnak a küvetébe, így azonnal megkezdődnek a komplexek létrejötte. A Siemens szabadalmaztatta ezen felszabadítási technológiáját.

## D-vitamin méréséhez kiválasztott antitestek

A kecske és juh eredetű poliklonális antitesteket használó teszteknek nagyobb a heterofil interferenciája a kecske és juh élelmiszerek következtében, mint pl. tej, sajt és hústermékek. A poliklonális antitestek rendelkezésre állása limitált lehet a termelő állatok miatt, és a specificitás változhat a lotok között.

Egy monoklonális antitesteket használó tesztnek jobb a lot-to-lot állandósága, mivel a monoklonális antitestek nem mutatnak akkora variabilitást. Az ADVIA Centaur Vitamin D Total teszt monoklonális antitestjei specifikusan, ekvimoláris 25(OH)vitamin D<sub>2</sub> és D<sub>3</sub> felismerésére, és heterofil antitestekkel való legkevésbé interferálás szerint lettek kiválasztva. Az ADVIA Centaur Vitamin D Total teszt lot-to-lot és készülékek közötti teljesítménye: a meredekség tipikusan 0,95-1,05, a tengelymetszet kevesebb, mint 3 ng/ml, a korrelációs koefficiens 0,95-0,97 (készülékek között) és 0,97-0,98 (lot-to-lot).

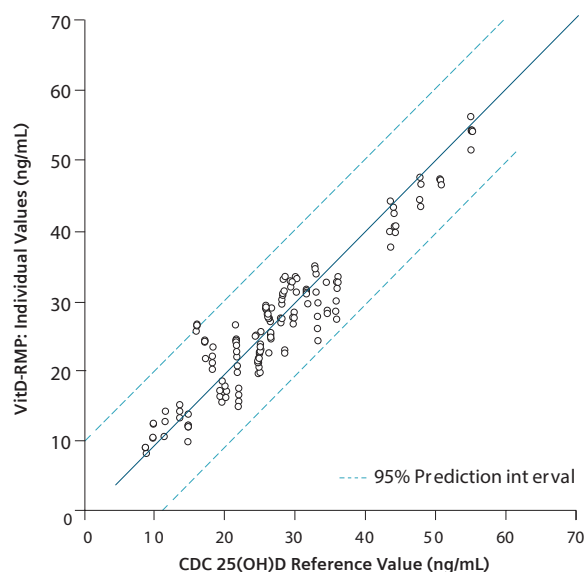
## Módszerek közötti különbségek

Számos, in vitro diagnosztikai eszközöket gyártó cég, kereskedelmi laboratórium, kutató laboratórium fejlesztett 25(OH)vitamin D total teszteket. A tesztek eredményei között jelentős eltéréseket tapasztaltak, mely feltette a kérdést, hogy a metabolikusan releváns szintek esetén, mely módszer ad megbízható, pontos eredményeket. Talán még nagyobb jelentősége van, hogy nemzetközileg elfogadott referencia-anyagok hiányában az ismételt, időben és helyszínben eltérő mérések még inkább érintettek a módszerek közötti különbségek miatt. A gyártók közötti vizsgálat-összehasonlítások szóródása nyilvánvaló, melynek oka lehet – a referencia-anyag hiányán túl – a D-vitamin mérésének gyártónként különböző módja, mint pl. különböző D-vitamin felszabadítási eljárások és heterofil interferenciák. Módszer összehasonlításoknál ezek hozzájárulnak a kisebb korrelációs koefficienshez. Az elvárt, gyártók közötti korrelációs koefficiens  $>0,9$  és 0,8-1,2 meredekség, ha a teljes méréstartományban kerültek mérésre minták.<sup>1</sup> Az immunkémiai tesztek közötti disszonanciák feloldásának legjobb módja az LC-MS/MS módszerhez való hasonlítás, mivel ennek a módszernek nincs heterofil interferenciája.<sup>2</sup> A visszavezethetőség, pedig olyan LC-MS/MS módszerrel szemben kell, hogy történjen, amelyet – nemzetközi standard hiányában – a NIST (National Institute of Standards and Technology) SRM2972 standard referens preparátumra standardizáltak. Viszont az eredmények varianciája tapasztalható annak függvényében, hogy a laboratórium a NIST referencia-anyagára hogyan standardizálja a módszerét.

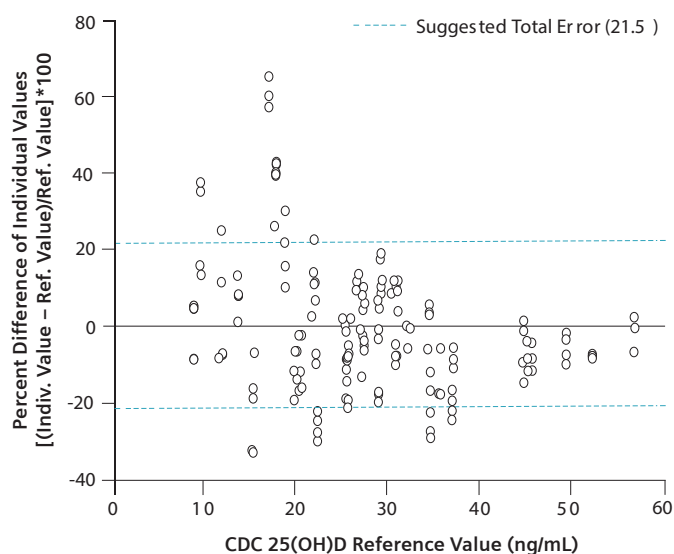
## A D-vitamin standardizációs program (VDSP)

A Vitamin D Standardization Program (VDSP) elindítását a NIH Office of Dietary Supplements (ODS) kezdeményezte, mely a National Institute of Standards and Technology (NIST), a Centers for Disease Control and Prevention (CDC) intézetekkel és a Ghenti Egyetemmel (Ghent, Belgium) együttműködve törekszik a célja elérésére, mely a laboratóriumok és gyártók számára referencia protokollt nyújtani a D-vitamin mérés standardizálásához.<sup>3-7</sup> A program kiegészítéseként a laboratóriumok és gyártók részt vehetnek egy, a CDC által vezetett tanúsítási eljárásban is, a Vitamin D Standardization – Certification Programban (VDSCP)<sup>8</sup>. A Siemens Healthcare Diagnostics egy korai alkalmazója a VDSP-nak, mert a vállalat felismerte a jelentőségét annak, hogy olyan tesztet nyújtson, ami metrológiailag a VDSP 25(OH)vitamin D referencia mérési módszerét (RMP) követi nyomon. Ezért az ADVIA Centaur Vitamin D Total teszt referencia módszere Prof. Linda Thienpont (Ghent/Belgium) ID-LC/MS/MS módszere. A Ghenti Egyetem izotóphígítási folyadék-kromatográfia – tandem tömegspektrometria (ID-LC/MS/MS) módszere a NIST Standard SRM2972<sup>9,10</sup> referencia anyagra vezethető vissza, közismerten pontosan méri csak a 25(OH)D<sub>2</sub> és D<sub>3</sub> formákat, és nem detektálja sem a 3-epi 25(OH) sem a 24,25 dihydroxy Vitamin D metabolitokat. A Siemens a tanúsítási programban (VDSCP) is részt vesz. VDSCP-tanúsítottá váláshoz a résztvevők négy, egymást követő negyedévben vakmintákat kapnak egy 40 mintából álló kalibrálási periódust követően. Minden fázis mintáját a CDC biztosítja, melyek várható értékeit a ghenti Reference Method Procedure (RMP) határozza meg. A mért eredmények analízisát a CDC végzi a CLSI EP9-A2 dokumentuma szerint a torzítás, precízió és totál error meghatározásához<sup>11,12</sup>. A tanúsítvány megszerzéséhez az átlagos torzításnak (összesen 160 eredményre) 5%-on belül, a teljes imprecízióknak 10% alatt kell lennie<sup>13</sup>. A Siemens azon kevés gyártók közé tartozik, aki rendelkezik a Vitamin D Total tesztjéhez a tanúsítással. A program folyamatos, és a tanúsítás évente felülvizsgálatra kerül. Az ADVIA Centaur VitD vizsgálat eredményei és a CDC-RMP által meghatározott értékek kiválóan korreláltak mindegyik negyedévben (1. ábra). Az átlagos torzítás 0,3% volt (SD=16,8; 95% CI=-5,0-5,6), az átlag CV 5,5%-nak adódott (SD=3,2; 10 percentilis=1,6%, 90 percentilis=9,8%). A minták 86%-a a javasolt ±21,5% totál hibán belül volt (2. ábra). A CDC tanúsítja az ADVIA Centaur VitD teszt pontosságát és a ghenti referencia módszerre való visszavezethetőségét. A tanúsítás, a teszt teljesítmény-jellemzői és a módszer-összehasonlítások eredményei bizonyosságot adnak, hogy az ADVIA Centaur Vitamin D Total teszt pontos, megbízható választ ad a páciens D-vitamin státuszának megítéléséhez.

Term	Coefficient	95% CI		SE	P
Intercept	-1.8893	-6.3943	2.6157	2.2809	0.4088
Slope	1.0134	0.9608	1.0660	0.0266	<0.0001



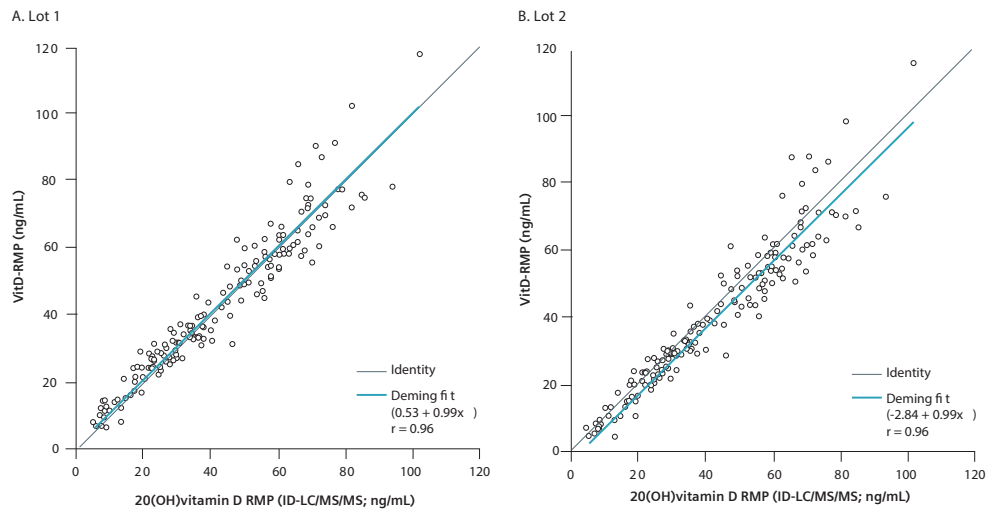
1. ábra: Lineáris regresszió CDC VDSCP által készítve 2013-ban



2. ábra: Totál error a CDC VDSCP mintáival

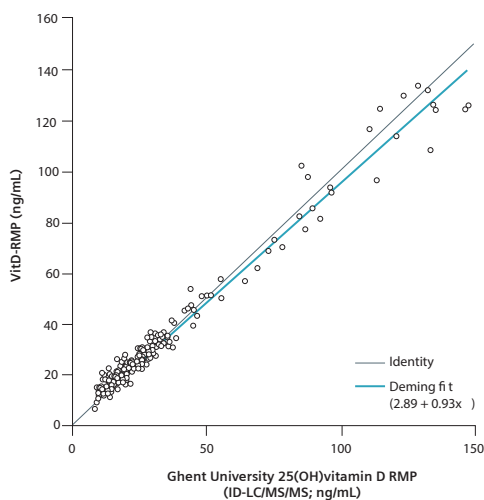
### Módszer-összehasonlítások az ADVIA Centaur VitD és az ID-LC/MS/MS között

Módszer-összehasonlító tanulmányok vizsgálták az összefüggést az ADVIA Centaur Vitamin D Total teszt és a ghenti 25(OH)vitamin D ID-LC/MS/MS módszer között. Az egyik tanulmányban 177 humán szérum mintát vizsgáltak. Ezek dózisa előzetesen meghatározásra kerültek: 90 mintáé a NIH vagy CDC által, 60 mintáé egy kereskedelmi forgalomban kapható, Ghent RMP-vel összehangolt LC-MS módszerrel, 27 mintáé a Ghenti Egyetem által. Deming regresszióval történt az előzetesen meghatározott értékek összehasonlítása az ADVIA Centaur Vitamin D Total eredményekkel, egy ADVIA Centaur XP készüléken, 2 különböző reagens lottal végezve<sup>5,9</sup>. A korreláció az ADVIA Centaur VitD és az ID-LC/MS/MS módszer között 96%, a meredekség pedig 0,99 volt mindkét reagens lottal. A torzítás a két módszer között átlagosan -1% volt (3. ábra).

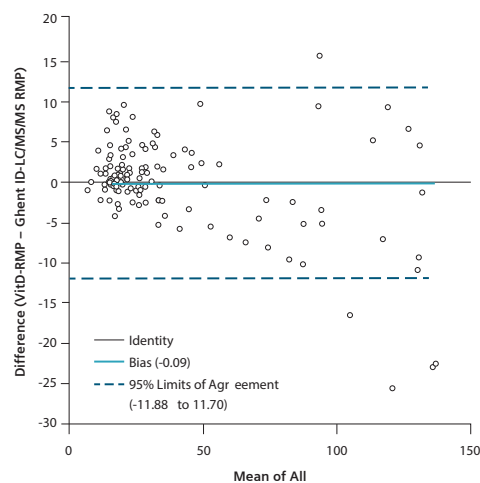


3. ábra: Deming regresszió analízissel való összehasonlítás az RMP és az ADVIA Centaur VitD (VitD-RMP) között

Egy másik kiértékelésben 122 szérum (116 natív, és 6 kevert) mintát vizsgáltak. A minták értékeit a Ghenti Egyetem ID-LC/MS/MS 25(OH)vitamin D RMP módszerével határozták meg. Az értékek 7,8 ng/ml és 148,1 ng/ml között voltak. A minták egy ADVIA Centaur készüléken, egy Vitamin D Total reagens lottal kerültek lemerésre. Az eredmények Deming regresszióval történtek kiértékelésre (4. ábra). Bland-Altman analízist használtak a torzítás meghatározásához. Habár a nagyobb koncentráció tartományban nagyobb torzítás volt tapasztalható, a torzítás nem haladta meg a 12 ng/ml-t a ghenti értékek és az ADVIA Centaur VitD eredmények között (5. ábra). A teljes torzítás -0,09 ng/ml volt.



4. ábra: Centaur VitD vs. Ghent ID/LC/MS/MS



5. ábra: Bland-Altman differencia plot

## Az ADVIA Centaur Vitamin D Total teszt specifikációi

### Előnyök

- visszavezethetőség a 25(OH)vitamin D Referencia Módszer Eljárásra (RMP)
- a Vitamin D Standardization – Certification Program (VDSCP) szerint kiértékelte és tanúsított teszt
- klinikai pontosság a totál 25(OH) D-vitamin értékekkel
- reprodukálható eredmények
- szérum és plazma minta is használható

### Egyedülálló teljesítmény-jellemzők

- equimoláris mérése az össz 25(OH)vitamin D<sub>2</sub> és D<sub>3</sub> formáknak
- 25(OH) D<sub>2</sub>-vitamin: 104,5% reaktivitás
- 25(OH) D<sub>3</sub>-vitamin: 100,7% reaktivitás
- minimális (1,1%) keresztreaktivitás 3-epi 25(OH) D<sub>3</sub>-vitaminnal
- LoB (limit of blank): 1,7 ng/ml
- széles mérési tartomány: 4,2-150 ng/ml
- kiváló precízió
- inter-assay precízió: 3,0 - 5,3 CV%
- intra-assay precízió: 4,2 - 11,9 CV%
- gyors mérési idő: 18 perc

### CAP (College of American Pathologists) és DEQAS (Vitamin D External Quality Assessment Scheme) felmérésben való részvétel

Mindkét szervezet által a megjelölt megfelelőségi kritérium, hogy a minták eredményeinek 80%-a essen a felmérésben meghatározott átlag koncentráció 25%-os torzításán belül. A visszaküldött ADVIA Centaur Vitamin D Total eredmények 95%-a volt a kritériumon belül.

### Rendelési információk

10699201	1 ReadyPack® primary reagent pack of ADVIA Centaur VitD (kalibrátorral)	100 teszt
10699533	5 ReadyPack® primary reagent pack of ADVIA Centaur VitD (kalibrátorral)	500 teszt
10699200	ADVIA Centaur VitD quality control material	3x2x2 ml



alapítva 1989

1047 Budapest, Attila u. 126. • Telefon: 369-0739, 369-3684, 369-4500 • Fax: 369-4383 • szalma.aniko@diagnosticum.hu

# SIEMENS

#### Irodalomjegyzék:

1. Farell C-JL et al. Clinical Chemistry 58:3 (2012)
2. Vogeser M et al. Dtsch Arztebl 2007; 104 (31-32):A 2194-200
3. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2012;243:32-40.
4. Thienpont LM, Stepman HC, Vesper HW. Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. Scand J Clin Lab Invest Suppl. 2012;243:41-9.
5. Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytvanghe K, Thienpont LM. 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;57:441-8.
6. Phinney KW, Bedner M, Tai SS, et al. Development and certification of a standard reference material for vitamin D metabolites in human serum. Anal Chem. 2012;84:956-62.
7. ODS Vitamin D Initiative. Accessed March 27, 2014, at: <http://ods.od.nih.gov/Research/VitaminD.aspx#vdsp>
8. Vesper HW, Rahmani YE. Vitamin D standardization certification program: standardization of total serum 25-hydroxyvitamin D measurements. In: Sciences DoL, ed. Atlanta, GA: Centers for Disease Control; 2012:1-5.
9. Thienpont L, Stepman HCM, Vesper HW. Standardization of measurements of 25-Hydroxyvitamin D3 and D2. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, 2012; 72(Suppl 243): 41 -49
10. Dietary Supplemental Fact Sheet: Vitamin D. Office of Dietary Supplements. National Institutes of Health. Updated 11/13/2009. Accessed 08/17/2010.
11. Vesper HW, Rahmani YE. Vitamin D standardization certification program: standardization of total serum 25-hydroxyvitamin D measurements. In: Sciences DoL, ed. Atlanta, GA: Centers for Disease Control; 2012:1-5.
12. CLSI. Method comparison and bias estimation using patient samples. Wayne, PA; 2002.
13. Stockl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. Clin Chim Acta. 2009;408:8-13.