

25-Hidroksi Vitamin D İmmün Ölçüm Yönteminin Analitik Performansı

Analytical Performance of Immuno Assay Method of 25 Hydroxy Vitamin D

Pelin Kulan* Ahmet Rıza Uras** Sedef Delibaş***
Mustafa Durmuşcan**** Sembol Yıldırım*****

- * SB 1 nolu Halk Sağlığı Laboratuvarı, Tıbbi Biyokimya, İstanbul, Türkiye
** Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, İstanbul, Türkiye
*** Mağusa Tıp Merkezi Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Magusa, Kuzey Kıbrıs TC
**** Adana Halk Sağlığı Laboratuvarı, Tıbbi Biyokimya, Adana, Türkiye
***** Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Giresun, Türkiye

Başvuru Tarihi: 21 Temmuz 2016

Kabul Tarihi: 15 Aralık 2016

ÖZET

Amaç: Laboratuvarlarda uygulanması düşünülen her yeni yöntemin, analitik hata oranları belirlenmeli ve yöntem değerlendirme çalışmaları yapılmalıdır. Bu çalışmanın amacı; 25-hidroksi vitamin D immün ölçüm yönteminin analitik performansını belirlemek ve yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi ile karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: 113 plazma örneği kullanılarak kemiluminesans immün ölçüm esaslı Abbott Architect 25-OH Vitamin D yöntemi için tekrarlanabilirlik, linearite ve geri elde çalışmaları yapıldı. Yüksek performanslı sıvı kromatografi referans yöntem olarak kabul edildi. Yöntem karşılaştırma çalışması yapıldı.

Bulgular: Architect 25-OH Vitamin D yöntemine ait varyasyon katsayıları sırasıyla düşük ve orta seviyeli serumlar için gün içi %4.07 ve %2.42; günler arası %4.77 ve %3.93 olarak bulundu. Geri elde çalışmalarında geri elde edilen miktar düşük seviyelerde %92.5 ve %105.9; orta seviyelerde %108.3 ve %105.5 bulundu. Yöntem karşılaştırma çalışması sonucunda, Architect yönteminin önemli düzeyde negatif bias (ortalama 9 ng/mL daha düşük; $\pm 2SD$ aralığı: (-34.1) – (16.1) ng/mL) gösterdiği ve iki metot arasında hem sabit hem de orantısız fark (Yüksek performanslı sıvı kromatografi= -3.2657 + 1.7388 kemiluminesans immün ölçüm; $\rho = 0.656$) olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Architect 25-OH Vitamin D yönteminin tekrarlanabilirlik, linearite ve geri elde hedeflerini karşıladığı halde bias hedeflerini karşılayamadığı görülmüştür. D vitamini eksikliği tanısı ve tedavi takibinin doğrulukla yapılması için ölçümlerin analitik performans çalışmalarının yapılması ve yöntemlerin standardizasyonunun gerekliliği aşikardır. 25-OH Vit D yöntemlerinin standardizasyonu için geliştirilen standart referans materyallerin kullanımı yaygınlaştıkça metotlar arası değişkenlik de azalacaktır. Ayrıca laboratuvarların dış kalite değerlendirme programlarına katılmaları ve sonuçlarını değerlendirmeleri laboratuvar bulgularının hasta yararına kullanımı konusunda önemli katkılar sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: 25-hidroksi vitamin D; Analitik performans; İmmün ölçüm; Yüksek performanslı sıvı kromatografi

ABSTRACT

Aim: Method evaluation studies should be carried out for every new method planned to be used in laboratories. The aim of this study is to determine the analytical performance of the immunoassay method used for determining of plasma 25-hydroxy vitamin D levels and also to compare to high performance liquid chromatography (HPLC) method.

Materials and Methods: 113 plasma samples were used to carry out repeatability, linearity and recovery studies for 25-hydroxy vitamin D measurement with the Abbott Architect chemiluminescence immunoassay (CLIA) method. HPLC was accepted as reference method. Method comparison study was carried out.

Results: The coefficient of variations for the Architect 25-hydroxy vitamin D method were 4.07% and 2.42 % within-day; 4.77% and 3.93% between-day for low and intermediate plasma levels respectively. The results obtained from the recovery studies were 92.5% and 105.9% for low levels; and 108.3% and 105.5% for intermediate levels. As a result of the method comparison study, Architect method was found to have a significant negative bias [As mean, 9 ng/mL lower, $\pm 2SD$ interval: (-34.1) – (16.1) ng/mL] and it was also observed that there was a constant and proportional difference between that two methods (HPLC= -3.2657 + 1.7388 CLIA; rho= 0.656).

Conclusion: Architect 25-hydroxy vitamin D method has met the precision, linearity and recovery targets but not the bias targets. For the accurate diagnosis and treatment follow-up of Vitamin D deficiency, it is obvious that to carry out analytical performance studies and to standardize of the measurement methods are essential. As the use of standard reference materials developed for the standardization of vitamin methods becomes widespread, the inter-method variability will also decrease. In addition, participation in laboratories' external quality assessment programs and their assessment of results will provide significant contributions to the use of laboratory findings for patient benefit.

Key words: 25-hydroxy vitamin D, Analytical performance, Immuno assay, High performance liquid chromatography

GİRİŞ

D vitamini diğer vitaminlerden farklı olarak vücutta sentezlenebilmektedir. Hem kimyasal yapısının steroid hormonlar ile benzerlik göstermesi hem de aktif formunun kalsiyum-fosfor metabolizmasının ve genomik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamasıyla bir hormon olarak değerlendirilebilir (1).

D vitamini durumunun belirlenmesinde en uygun test plazma 25-hidroksi vitamin D (25-OH Vit D) ölçümüdür. Plazma 25-OH Vit D seviyesinin 10 ng/mL'nin altında olması eksiklik; 10-20 ng/mL arası yetersizlik; 20-30 ng/mL arası yeterli; >30 ng/mL ise optimal olarak tanımlanır (2).

25-OH Vit D'nin ölçümü için birçok ticari yöntem geliştirilmiştir. Bunlar, yarışmalı protein bağlama yöntemi, radyoimmünoassay, enzim immünoassay, kemiluminesans immünoassay (CLIA), yüksek performanslı sıvı kromatografisi

(HPLC) ve sıvı kroma-tografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) yöntemleridir.

HPLC yönteminin interferans veren lipidleri ve D vitamini metabolitlerini uzaklaştırması, 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃'ü ayrı ayrı ölçebilmesi en önemli avantajlarından. Ancak bu yöntem fazla örnek hacmi, pahalı ekipman, yoğun emek, deneyim ve zaman gerektirmektedir. LC-MS/MS yöntemi immün ölçüm-lerin doğruluğunu teyit etmek için referans yöntem olarak kullanılmaktadır. Otomatize immün ölçüm yöntemler ise total 25-OH Vit D (25-hidroksivitamin D₂ ve 25-hidroksivitamin D₃'in toplamı olarak)'yi tespit edebilir, daha az örnek hacmi gerektirir, kullanımı daha kolay, kullanıcı hatası daha az ve daha hızlı sonuç vermektedir (3).

Laboratuvarlarda uygulanması düşünülen her yeni yöntemin, analitik hata oranları belirlenmeli ve performansının yeterli

olduğu kanıtlanmış bir yöntemle karşılaştırmak üzere yöntem değerlendirme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmanın amacı, plazmada 25-OH Vit D tayini için kullanılan bir immün ölçüm yönteminin analitik performansını belirlemek, HPLC yöntemi ile karşılaştırmak ve laboratuvarımızda kullanımının klinik amaçlar için uygun olup olmayacağına karar vermektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Analitik performans ve yöntem karşılaştırma çalışmalarına 2013 yılında İstanbul Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'na 25-OH Vit D ölçümü için başvuran 18 yaş üstü hastaların verdikleri rastgele seçilen 113 plazma örneği dahil edildi.

Kan örnekleri K₂EDTA'lı tüplere (BD Vacutainer, ABD) alındı. Bir saat içerisinde 1500 x g'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek plazmaları elde edildi. Hemolizli, ikterik ve lipemik numuneler çalışmaya dahil edilmedi. Elde edilen her bir plazma örneği immün ölçüm analizleri için 2 ependorf tüpüne aktarıldı. Örneklerde aynı gün içinde İstanbul Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda HPLC yöntemi ile plazma 25-OH Vit D düzeyleri (**D2 ve D3 toplamı**) tayin edildi. HPLC yönteminin intra-assay tekrarlanabilirliği 25-OH D3 için %2.7 ve 25-OH D2 için % 2.4; inter-assay tekrarlanabilirliği 25-OH D3 için %3.1 ve 25-OH D2 için %2.8 idi. HPLC yönteminin Limit of Detection (LoD) değeri 25-OH D3 ve D2 için 0.8 ng /mL ve Limit of Quantitation (LoQ) değeri 25-OH D3 ve D2 için 2.4 ng/mL idi. Lineritesi ise 200 ng/mL'e kadardı.

İmmün ölçüm analizleri için ayrılan porsiyonlar en geç 7 gün içinde çalışılmak üzere -20°C'de saklandı. İmmün ölçüm çalışması Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda, Abbott Architect otoanalizöründe gerçekleştirildi. İmmün ölçüm yöntemi için analitik performans

kriterlerinden; gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik, line-arity ve geri elde çalışmaları yapıldı. Her iki yöntemle elde edilen hasta sonuçları yöntem karşılaştırması için kullanıldı.

Gün içi tekrarlanabilirliğin belirlenmesi amacıyla, orta seviye 25-OH Vit D içeren plazma havuzları aynı gün içerisinde 20 kez çalışıldı. Günler arası tekrarlanabilirliğin belirlenmesi amacıyla, düşük, orta ve yüksek seviye kontrol materyalleri 20 gün boyunca her gün çalışıldı. Linearite çalışması, 160 ng/mL kon-santrasyonunda standart çözeltinin dilüsyonları yapılarak gerçekleştirildi. Dilüsyon işlemi için 0 ng/mL'lik kalibratör çözeltisi kullanıldı. Geri elde çalışması, yüksek seviye 25-OH Vit D içeren hasta plazmasından, immün ölçüm yöntemi ile 25-OH Vit D'nin 0 ng/mL ölçüldüğü bir plazmaya ekleme yapılması ve ardından yeni karışımda ölçülen ile ölçülmesi gereken 25-OH Vit D arasındaki oranın yüzdesinin hesaplanmasıyla gerçekleştirildi. Yöntem karşılaştırma çalışmasında kullanılan 113 plazmanın immün ölçüm analizleri, her gün en az 20 plazma çalışmak üzere, 5 ardışık güne yayıldı.

Architect 25-OH Vit D tayini, kemilüminesans mikropartikül immün ölçüm prensibine dayanır. Bu çalışmada Abbott Architect i2000SR analizörü (Abbott Laboratuvarları, ABD)'nde Architect 25-OH Vitamin D kiti (Katalog no: 3L52-25, Abbott Laboratuvarları, İspanya) kullanıldı.

HPLC yönteminde bir presipitasyon basamağı ekstraksiyon ile kombine edilmiştir. Bu yöntem için Zivak ONH-100A Vitamin D2-D3 HPLC analizörü (Zivak Teknoloji, Türkiye)'nde Zivak 25-OH Vitamin D2-D3 kiti (Katalog no: ZV-4007-200-10 Zivak Teknoloji, Türkiye) kullanıldı.

Çalışma sonucu elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla, istatistiksel analizler için MedCalc 11.3.3.0 programı ve SPSS for Windows 17.0 programı kullanıldı.

Tekrarla-nabilirlik, linearite ve geri-elde çalışmalarına ait sonuçların değerlendirilmesi için Microsoft Excel 2010 programı kullanıldı.

BULGULAR

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasına ait sonuçlar Tablo 1'de, günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasına ait sonuçlar Tablo 2'de; linearite çalışmasıyla elde edilen linearite grafiği Şekil 1'de verildi. Beklenen ve ölçülen değerler arasındaki farka Ki-kare testi ile bakıldı. Fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (Ki-kare=0.510; p=0.99). Yöntemin 160 ng/mL'ye kadar doğrusal olduğu belirlendi. Architect 25-OH Vitamin D yöntemiyle yüksek seviye örneklerle yapılan geri elde çalışmalarının sonuçları Tablo 3'te verildi. 25-OH Vit D ölçüm yöntemlerinin sonuçlarının tanımsal bulguları Tablo 4'te, Box-Whisker grafikleri Şekil 2'de gösterildi.

İki yöntem arasındaki ilişkiyi belirlemek için Spearman's Rank korelasyon yapıldı. Korelasyon analizinde CLIA yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile HPLC yöntemiyle elde edilenler arasında pozitif yönde orta düzeyde anlamlı ilişki bulundu [rank korelasyon katsayısı (ρ) = 0.656; %95 güven aralığı (CI)= 0.536 – 0.750; p<0.001].

CLIA ve HPLC yöntemleri ile elde edilen ölçümlerin Bland-Altman grafiği ile karşılaştırılması Şekil 3'de verildi. Grafikte farkların ortalamasının -9 ng/mL ve farkların $\pm 2SD$ aralığının ise (-34.1) – (16.1) ng/mL olduğu görüldü.

CLIA yöntemine ait sonuçlar ile HPLC yöntemine ait sonuçlar arasındaki ilişkinin belirlenmesi için Passing-Bablok regresyon analizi yapıldı. Analiz sonuçları ve regresyon grafiği sırasıyla Tablo 5 ve Şekil 4'da verildi.

Tablo 1. Architect 25-OH Vitamin D metoduna ait gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları (n=20)

Table 1. Within-day precision results for the Architect 25-OH Vitamin D method (n=20)

	Orta seviye
Ortalama (ng/mL)	43.69
Standart sapma	1.06
% CV	2.42

Tablo 2. Architect 25-OH Vitamin D metoduna ait günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları (n=20)

Table 2. Between-day precision results for the Architect 25-OH Vitamin D method (n=20)

	Düşük seviye	Orta seviye	Yüksek seviye
Ortalama (ng/mL)	20.44	40.34	76.22
Standart sapma	0.98	1.58	2.38
% CV	4.77	3.93	3.13

Tablo 3. Architect 25-OH Vitamin D yöntemi yüksek seviye ile geri elde çalışması sonuçları

Table 3. Recovery results with high levels for the Architect 25-OH Vitamin D method (n=20)

Orta Seviye Örnek	Eklenen 25(OH)VitD (ng/mL)	Ölçülen 25(OH)VitD (ng/mL)	Geri kazanılan 25(OH)VitD (ng/mL)	% Geri Elde
Başlangıç	-	29.8	-	-
1. Ekleme	4.06	34.2	4.4	108.3
2. Ekleme	6.92	37.1	7.3	105.5

Tablo 4. HPLC ve CLIA yöntemine ait tanımsal bulgular

Table 4. Data of HPLC and CLIA methods.

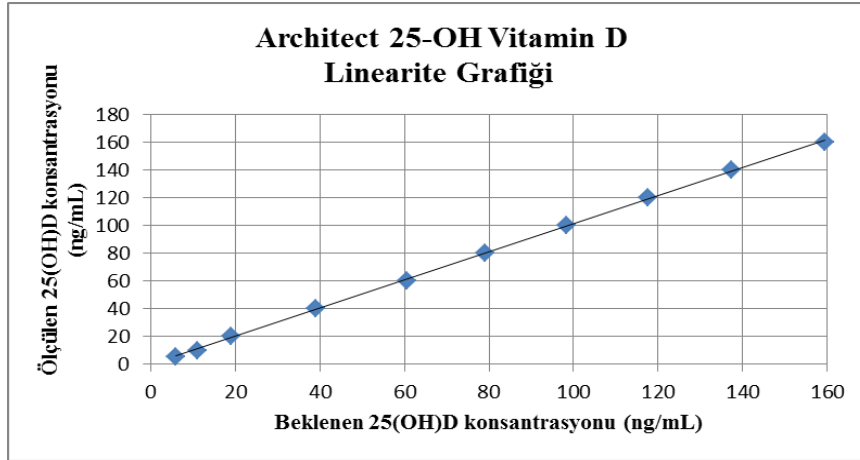
	Veri sayısı	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Persentiller	
					25	75
HPLC	113	27.61	19.74	20.70	13.05	9.80
CLIA	113	18.62	14.22	13.90	35.75	25.25

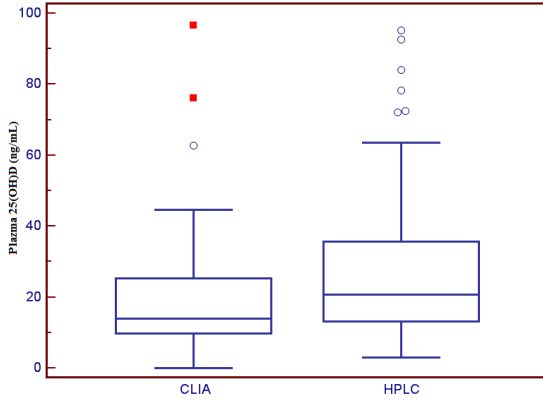
Table 5. CLIA ile HPLC yöntemlerinin Passing-Bablok regresyon analizi sonuçları**Table 5.** Passing bablok regression analysis results of CLIA and HPLC methods.

Değişken X	CLIA
Değişken Y	HPLC
Örnek büyüklüğü	113
Regresyon denklemi	$Y = -3.2657 + 1.7388 X$
Kesim noktası ve %95 güven aralığı	-3.2657(-7.2917; 0.7201)
Eğim ve %95 güven aralığı	1.7388(1.4793; 2.0833)
Linearite için Cusum testi	Linearityden anlamlı sapma yoktur ($P > 0.10$)

Table 6. 25-OH Vit D < 20 ng/mL tıbbi karar seviyesinde CLIA yönteminin tanısal biasları**Table 6.** Bias levels of CLIA method at 25-OH Vit D < 20 ng/mL decision level.

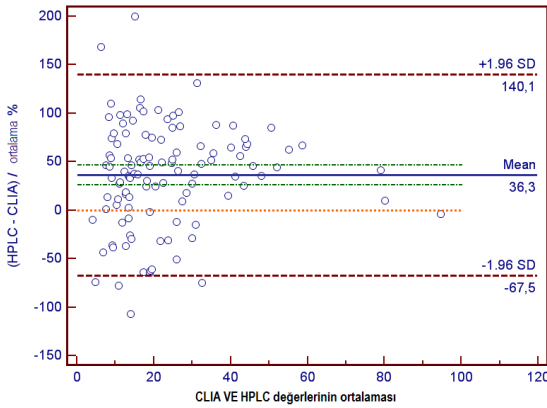
HPLC (Referans yöntem)	Aynı hastalara CLIA yöntemi ile verilen tanı	CLIA yöntemi ile alınan % doğru tanı	CLIA yöntemi ile alınan % tanısal bias
Yetersizlik (n=52)	Yetersizlik n=45 Yeterlilik n=7	%87	%13
Yeterlilik (n=61)	Yetersizlik n=28 Yeterlilik n=33	%50	%50

**Şekil 1.** Architect 25-OH Vitamin D metodu için beklenen değerlere karşı ölçülen değerler (linearite) grafiği**Figure 1.** Expected values versus measured levels graphic for Architect 25-OH Vitamin D method.



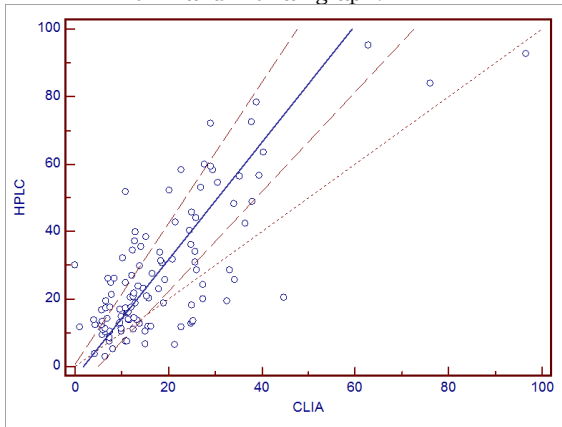
Şekil 2. CLIA ve HPLC yöntemlerine ait Box-Whisker grafikleri

Figure 2. Box-Whisker graphs for CLIA and HPLC methods.



Şekil 3. CLIA ve HPLC yöntemlerinin Bland-Altman grafiği ile karşılaştırılması

Figure 3. Comparison of CLIA and HPLC methods with Bland-Altman graph.



Şekil 4. HPLC ve CLIA yöntemleri arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon grafiği

Figure 4. Regression graphic showing the relationship between HPLC and CLIA methods.

TARTIŞMA

Çalışmamızda tekrarlanabilirlik performansı açısından incelenen Architect 25-OH Vit D metodunun % varyasyon katsayısı (%CV) değerleri genel olarak %5'in altında bulunmuş-tur. *Stöckl ve ark.* (4) rutin metotlarda 25-OH Vit D biyolojik değişkenlik verilerini dikkate alarak yaptıkları çalışmada, 25-OH Vit D ölçümleri için ulaşılması gereken presizyon sınırının <%10 olması gerektiğini belirlemiş-lerdir. Böylece bu çalışmada Architect 25-OH Vitamin D metodunun önerilen tekrarlanabilirlik değerlerini karşıladığı görülmektedir.

Architect 25-OH Vit D metodunun lineer aralığını tespit etmek için yaptığımız çalışmada, yöntemin 160 ng/mL'ye kadar doğrusal olduğunu belirledik. Bu bulgu, üreticinin rapor ettiği linearite sınırı ile tutarlıdır. Yöntemin lineer aralığının 8-160 ng/mL olarak verilmesi, D vitamini eksikliği tanısının cut-off değeri (<10 ng/mL) (2)göz önüne alındığında rutin klinik amaçlar için yeterli görülmektedir. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)'nın hazırladığı EP6-A protokolünde, linearite aralığının belirlenmesi için çeşitli seviyelerde değeri bilinen hasta örneklerinin veya bunların seyreltilmiş havuzlarının kullanılması önerilmektedir (5). Çalışmamızın kısıtı, plazmaları dilüe etmekte kullanılacak bir standart materyalin halihazırda mevcut olmaması ve bu nedenle linearite aralığının tespit edilememesidir. İçeriğinde 25-OH Vit D bulunmayan Architect 25-OH Vit D kalibratörü (0 ng/mL) dilüent olarak %10 hacimde eklendiğinde, matriks etkisi nedeniyle, doğru olmayan sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum-da 25-OH Vit D ihtiva etmeyen bir plazmayı dilüent olarak kullanmak en uygun yaklaşım olacaktır.

Architect 25-OH Vit D yöntemiyle yapılan geri elde çalışmamızın sonuçlarının %90-%110 aralığında yer alması bu yöntemin geri elde bakımından analitik doğruluğunun yeterli olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızdaki geri

elde total D vitaminini değerlendirilmektedir. Total 25-OH Vit D tayini yapan immün ölçümler ile ilgili kuşku 25(OH)Vit D₂'nin % kaçlık bir geri eldeye sahip olduğudur. Architect 25-OH Vit D kit prospektüsünde, 25(OH)D₂ geri eldesi %82 olarak belirlenmiştir. Bu durum D₂ vitamini ile desteklenmiş gıdalar ya da D₂ vitamini takviyesi alanlarda sonuçların değerlendiril-mesi açısından dikkate alınmalıdır. Çünkü düşük geri elde, plazma total 25-OH Vit D'nin olduğundan düşük ölçülmesine neden ola-rak, vitamin D tedavisinin gereksiz yere uza-masına ya da daha maliyetli ileri araştırmalar yapılmasına neden olabilir.

Bland-Altman grafiğinin değerlendirilmesi sonucunda CLIA yöntemi ile elde edilen ölçümlerin HPLC ölçümlerinden önemli düzeyde negatif bias (ortalama 9 ng/mL daha düşük) gösterdiği, farkların geniş bir aralıkta dağıldığı [$\pm 2SD$ aralığı (-34.1)–(16.1) ng/mL] ve konsantrasyon arttıkça farkların dağılımı-nın daha da genişlediği belirlenmiştir. Bu negatif bias hastaların D vitamini eksikliği ya da yeterliliği açısından sınıflandırılmasını etkileyebilir. CLIA ile HPLC yöntemlerinin regresyon eşitliği (HPLC (ng/mL) = 3.2657 + 1.7388 CLIA (ng/mL)) ve güven aralıkları analizi, iki metot arasında hem sabit hem de orantısız anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Architect yöntemi ile günler arası CV'yi % 4.77 tespit ettiğimiz 20.44 ng/mL değere, elde ettiğimiz regresyon eşitliğini uygularsak HPLC yöntemi ile bu değer 32.27 ng/mL gelmesini bekleriz. Bu durumda bu değer için bias %37 olacaktır. *Stöckl ve ark.* (4) 25-OH Vit D ölçümlerinde biyolojik değişken-likler baz alındığında rutin metotlarda CV'nin $\leq$ %10, biasın $\leq$ %5, referans metotlarda CV'nin $\leq$ %5, biasın $\leq$ %1.7 olması gerektiğini belirtmişlerdir. Architect 25-OH Vitamin D metodunun bu çalışmada tekrarlanabilirlik hedeflerini karşılarken, bias hedeflerini karşılayamadığı görülmektedir.

D vitamini yetersizliği tanısı karar seviyesi (cut-off) <20 ng/mL alındığında, 113 hasta-nın HPLC ve CLIA yönteminin verdiği sonuç-lara göre alacakları tanılarının dağılımı ve tanı dağılımında CLIA yönteminin HPLC yön-te-mine göre %biası Tablo 6'da gösterilmiştir.

Karar seviyesi <20 ng/mL alındığında pre-diktif doğruluk %10'un içinde bulunmamıştır. Gözlenen tanısı biasın, klinik kararlar üze-rine etkisinin kabul edilemez olduğu göröl-mektedir. Biastaki bu oran hastaların sınıf-landırılmasını ve tedavi önerilerini önemli oranda etkileyecektir.

Yöntemler arası gözlenen farklılıklar, matriks etkisinden (plazma örneğindeki protein, pH, iyonik konsantrasyon ya da immün ölçüm-lerde kullanılan denatüre edici ajanlar) ya da D vitamini metabolitleri ile çapraz reaksiyon-ların farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Araştırmacılar otomatize immün ölçümlerin, matriksten etkilenmeye yatkın olduğunu (6) ve sürpriz yüksek sonuçların sebebi olabile-ceğini belirtmişlerdir (7). Ayrıca otomatize immün ölçümler ekstraksiyon basamaklarını ya da organik solventlerle örnek ön işlem-lerini kullanmadıklarından D vitamini bağla-yıcı proteinler kısmen ayrılmaktadır. Bu durum özellikle plazmada yüksek D vitamini bağlayıcı protein varsa düşük sonuçlar alın-masına neden olur (8). Ayrıca düşük 25-OH Vit D konsantrasyonlarında immün ölçüm-lerin zayıf fonksiyonel sensitivite vermesinin nedeni de olabilir (9). Wyness ve ark(10), 6 otomatize 25-OH vitamin D immün ölçüm cihazını LC-MS/MS yöntemi ile karşılaştırdıkları çalışmalarında sadece 2 immün ölçüm cihazının önerilen bias kriterini(< % 5) karşıladığını bildirmişlerdir.

Kromatografik yöntemlerin analitik hatalarına dair kuşkular iki neden üzerinde yoğunlaş-mıştır. Kuşkuların kaynağı öncelikle analitle aynı anda elue olan interfere edici bileşen-lerin olası

varlığı, ikinci olarak da kalibrasyon materyali ile ilgili faktörlerdir (6).

D vitamini eksikliği tanısı ve tedavi takibinin doğrulukla yapılması için ölçümlerin standar-dizasyonunun gerekliliği aşikardır. Bu gereklilik son zamanlarda yapılan pek çok çalışma ile vurgulanmaktadır. 25-OH Vit D yöntemlerinin standardizasyonu için geliştirilen stan-dart referans materyallerin kullanımı yaygın-laştıkça metotlar arası değişkenlik de azala-caktır. Ayrıca laboratuvarların dış kalite değerlendirme programlarına katılmaları ve sonuçlarını değerlendirmeleri laboratuvar bulgularının hasta yararına kullanımı konu-sunda önemli katkılar sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004;80: 1678-88.
2. Pearce SH, Cheetham TD. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. *BMJ* 2010; 340:142-147.
3. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (5th ed), Saunders Elsevier. USA 2012.
4. Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxy vitamin D analysis. *Clin Chim Acta* 2009;408(1-2):8-13.
5. Tholen DW. 1st ed. *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline, EP06-A*. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2003.
6. Binkley N, Krueger DC, Morgan S, Wiebe D. Current status of clinical 25-hydroxy vitamin D measurement: an assessment of between laboratory agreement. *Clin Chim Acta* 2010;411: 1976-82.
7. Costelloe SJ, Woolman E, Rainbow S, Stratiotis L, O'Garro G, Whiting S, et al. Is high-throughput measurement of 25-hydroxy vitamin D3 without 25-hydroxy vitamin D2 appropriate for routine clinical use? *Anal Clin Biochem* 2009;46:86-7.
8. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem* 2012;58(3):543-8.
9. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 2010;75:477-88.
10. Wyness SP and Straseski JA. Performance characteristics of six automated 25-hydroxyvitamin D assays: Mind your 3s and 2s. *Clin Biochem*. 2015 Nov;48(16-17):1089-96.

Yazışma adresi:

Sembol Yıldırım

Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Giresun, Türkiye

E-mail: yildirmaksebol@gmail.com
