

HPLC ve Immunoassay Yöntemleri İle Ölçülen D Vitamini Düzeylerinin Karşılaştırılması

Comparison of vitamin D levels measured by HPLC and Immunoassay

Müge Bekmez* Özkan Alataş**

* Iğdır Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Iğdır, Türkiye

** Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Eskişehir, Türkiye

Başvuru Tarihi: 21 Ocak 2016

Kabul Tarihi: 18 Mart 2016

ÖZET

Amaç: D vitamininin belirlenmesinde genellikle 25(OH)D'nin plazma konsantrasyonunun ölçümü kullanılmaktadır. Ancak 25(OH)D'nin ölçümünde analitik ve standardizasyon problemleri halen devam etmektedir. Çalışmanın amacı; sağlıklı gönüllülerden oluşan 50 bireyin High Performance Liquid Chromatography ve Immunoassay yöntemleri ile ölçülen D vitamini düzeylerinin karşılaştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 50 tane sağlıklı gönüllü alınmıştır. Katılımcıların plazma örneklerinden D vitamini düzeyleri çalışılmıştır. D vitamini Chromsystems'in High Performance Liquid Chromatography kiti kullanılarak Agilent 1100 cihazında ve Roche Diagnostics E170 cihazında elektrokemilüminesans yöntem ile çalışılmıştır. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: High Performance Liquid Chromatography yöntemi için median değer 16.50 µg/l, Immunoassay yöntemi için median değer 13.48 µg/l bulundu. Spearman korelasyon testine göre yöntemler arasında ileri düzeyde pozitif yönlü bir korelasyon saptandı (p<0.001, r:0.78). Immunoassay yöntemi için yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında çalışma içi değişkenlik katsayısı 3.6 ve günler arası değişkenlik katsayısı 3.7 bulundu. Test stabilitelelerini karşılaştırdığımız numune sonuçlarında, saklama koşuluna ve zamana göre başlangıç değerinden sapmalar olabileceği görüldü.

Sonuç: Elektrokemilüminesans yönteminin, laboratuvar iş akışı ve verimliliğini arttıracaklarını, otomatize metodlara kesinlik, kolaylık gibi faydalar sağlayacağını düşünmekteyiz. Test stabilitesi açısından ise numunenin saklanmadan, aynı gün içerisinde çalışılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: D vitamini, immunoassay, yöntem karşılaştırma

ABSTRACT

Objective: However, the analytical and standardization problems have continued, vitamin D status is usually assessed by measuring the plasma concentration of 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D]. The aim of this study was to compared vitamin D levels of 50 healthy volunteers measured by High Performance Liquid Chromatography and Immunoassay methods.

Material and Methods: 50 healthy volunteers were involved. Vitamin D was determined both in Agilent 1100 which is used High Performance Liquid Chromatography kits and Roche Diagnostics E170 in plasma specimens. The results were evaluated statistically.

Results: The median value was 16.50 $\mu\text{g/l}$ for High Performance Liquid Chromatography assay and 13.48 $\mu\text{g/l}$ for immunoassay method. A positive correlation was found between methods by Spearman's correlation test ($p < 0.001$, $r: 0.78$). The within-run and between run coefficient of variations for immunoassay method were 3.6 and 3.7 respectively. When we compared the test stabilities of specimens according to the storage condition and time, we found deviations from the initial value.

Conclusion: We conclude that the electrochemiluminescence assay provides the benefits such as improving laboratory workflow and efficiency, being precise, providing greater convenience. We determined that the samples were assayed in the same day.

Key words: Vitamin D, immunoassay, method comparison

GİRİŞ

D vitamininin bağırsaktan kalsiyum ve inorganik fosfor emiliminde düzenleyici, kemik yapımını uyarıcı bir vitamin olup eksikliğinin osteoporoz için risk faktörü olduğu bilinmektedir (1). Son bilgiler D vitamini eksikliğinin kanser, diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar gibi birçok yaygın ve ciddi hastalık için risk faktörü olduğunu göstermektedir (2). D vitamininin etkileri ve hastalıklarla ilişkisi ortaya konuldukça D vitamini ölçümlerinin önemi artmış ve sık kullanılmaya başlanmıştır. Bu durum doğru, güvenilir ve hızlı sonuç veren yöntemlere ihtiyacı ortaya koymuştur.

D vitamininin deride sentezlenen kolekalsiferol (vitamin D_3) ve besinlerle alınan ergokalsiferol (vitamin D_2) olmak üzere iki kaynağı vardır (2). Bununla birlikte, vitamin D_2 'nin etkisi vitamin D_3 'ün etkisinin üçte birinden azdır ve vitamin D_2 'nin etki süresi vitamin D_3 'ten kısadır (3). D_2 ve D_3 vitamininin her ikisi de aynı yolla metabolize olduğu için ortak bir isimle, D vitamini olarak adlandırılır (2). D vitamininin bu iki formu kanda D vitamini bağlayan protein (DBP) ile kompleks oluşturarak taşınır. D vitamini dolaşımında önce karaciğerde 25-hidroksivitamin D [$25(\text{OH})\text{D}$]’ye hidroksillenir. Kişide vitamin D düzeyi hakkında bilgi sahibi olmak için serum veya plazma $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyine bakılmalıdır. Çünkü $25(\text{OH})\text{D}$ yarı ömrü 2-3 hafta olan major sirkulatuar formudur. Hem vitamin D alımını ve hem de endojen yapımını göstermektedir (2). Ayrıca insan vücudunda D vitamininin temel depo formudur.

Biyolojik aktif form olan 1,25-dihidroksivitamin D [$1,25(\text{OH})_2\text{D}$] ise vücut vitamin D düzeyinin belirlenmesi için uygun değildir. Çünkü yarı ömrü 4-6 saat kadar kısa ve sirkulatuar düzeyleri $25(\text{OH})\text{D}$ 'den 1000 kat düşüktür (4). Ancak $25(\text{OH})\text{D}$ ölçümünde analitik ve standardizasyon problemleri halen devam etmektedir (3).

Günümüzde D vitamini ölçümleri; immunoassay, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ve kütle spektrometresi (MS) yöntemleri ile yapılabilmektedir. Immunoassay yöntemlerinde kullanılan antikorların hangi D vitamini türevini tanıdığı önem kazanmaktadır. HPLC metodları D vitamini türevleri ve formlarını ayırarak belirleyebilmesine rağmen rutin kullanımları kompleks örnek hazırlama gereklilikleri yüzünden kısıtlanmıştır (5). Çalışmamızın amacı, rutin kullanıma uygun, otomatize bir immunoassay yöntem ile HPLC ölçüm yönteminin performanslarının sağlıklı kişilerin örneklerinde karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma yaş ortalaması 48.3 ± 10.23 (29-69) yıl olan, sağlıklı, gönüllü 25 erkek ve 25 kadından alınan kan örnekleri ile yapıldı. Kalsiyum, fosfor ve D vitamini metabolizma bozukluğu olan veya kalsiyum, D vitamini preparatı kullanan bireyler çalışmaya alınmadı.

Her katılımcıdan sabah, 8-12 saatlik açlık sonrası venöz kan örnekleri EDTA'lı tüplere alındı. Örnekler 4000 rpm'de 3 dakika

santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazma örnekleri çalışma gününe kadar -80°C 'de saklandı.

D vitamini ölçümleri Chromsystems kiti kullanılarak Agilent 1100 HPLC cihazında ve Roche Diagnostics (RD) kiti kullanılarak E170 cihazında yapıldı.

HPLC yöntemi ile D vitamini ölçümü

Agilent 1100 HPLC cihazında D vitamini ölçümü için, mobil faz olarak asetonitril karışımı içeren bir solusyon kullanıldı. Stabil bir D vitamini derivesi internal standart olarak kullanıldı. Kolonun akış hızı 40-50 bar basınçta dakikada 0.7 ml idi. Kolon sıcaklığı 25°C idi. Dakikada 0.7 ml akış hızında 25-OH-vitamin D_3 pikinin retansiyon zamanı 4.2 dakika, internal standardın retansiyon zamanı 7.1 dakikaydı. Ölçüm 265 nm dalga boyunda UV dedektör yardımı ile yapıldı. Ekstraksiyon sonrası elde edilen eluentten 25 μl ölçüm için kullanıldı.

Metod 250 $\mu\text{g/l}$ 'ye kadar lineerdir. Ölçüm limiti yaklaşık 1.4 $\mu\text{g/l}$ 'dir. Metodun üç farklı seviye örnek için intra-assay değişkenlik katsayıları (CV) %3.0 (24.9 $\mu\text{g/l}$), %0.9 (58.9 $\mu\text{g/l}$), %1.9 (89.9 $\mu\text{g/l}$)'dur. Metodun iki seviye örnek için inter-assay CV'leri %3.3 (25.2 $\mu\text{g/l}$) ve %2.3 (90.4 $\mu\text{g/l}$) olarak bulunmuştur. Yöntemin kış mevsimi için referans aralığı 10-60 $\mu\text{g/l}$ 'dir.

Elektrokemiluminesans yöntemi ile D vitamini ölçümü

RD D vitamini kiti yarışmalı immunoassay prensibine dayanmaktadır. Yöntemde; DBP'nin Rutenyum ile işaretli ve işaretli ve işaretli formları vitamin D_2 ve vitamin D_3 'e bağlanmak için yarışır.

Elektrokemiluminesans yöntem ile yapılan ölçümün alt sınırı 3 $\mu\text{g/l}$, ölçüm aralığı 3-70 $\mu\text{g/l}$ 'dir. Metodun iki farklı seviye örnek için intra-assay ve inter-assay CV'leri sırasıyla %3.9, %6.5 (28.3 $\mu\text{g/l}$) ve %2.2, %3.4 (69.6 $\mu\text{g/l}$) olarak bulunmuştur. D vitamini için eksiklik düzeyi ≤ 20 $\mu\text{g/l}$, yetersizlik düzeyi < 30 $\mu\text{g/l}$ ve yeterlilik düzeyi ≥ 30 $\mu\text{g/l}$ olarak tanımlanmıştır.

BULGULAR

Çalışma grubumuzun median değeri HPLC yöntemi ile 16.50 $\mu\text{g/l}$, immunoassay (IA) yöntemi ile 13.48 $\mu\text{g/l}$ olarak bulundu (Tablo 1).

Tablo 1. Çalışma grubumuzun HPLC ve Immunoassay yöntemleriyle çalışılan plazma D vitamini verileri

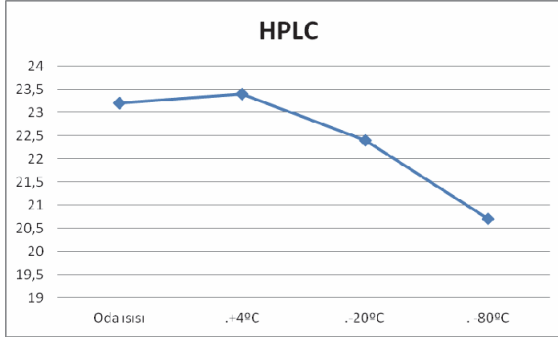
| | HPLC($\mu\text{g/l}$) | IA($\mu\text{g/l}$) |
|----------|-------------------------|-----------------------|
| Ortalama | 16.64 | 14.11 |
| SD | 5.83 | 5.05 |
| Median | 16.50 | 13.48 |
| %25-75 | 17.73-19.63 | 10.52-16.04 |
| Minimum | 7.75 | 5.59 |
| Maksimum | 33.80 | 28.61 |

Spearman korelasyon testine göre yöntemler arasında ileri düzeyde pozitif yönlü bir korelasyon saptandı ($p < 0.001$, $r: 0.78$). Immunoassay yöntemi için yapılan tekrarlanabilirlik çalışmasında D vitamini 24.97 $\mu\text{g/l}$ derişiminde olan plazma porsiyonlara ayrılarak aynı çalışma içinde arka arkaya 10 kez çalışıldı ve çalışma içi CV %3.6 bulundu. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için ise örnekler -80°C 'de 3 ay süreyle saklandı. Sürenin sonunda çözölen numuneler oda ısısına geldikten sonra çalışıldı ve günler arası CV değeri %3.7 bulundu (Tablo 2).

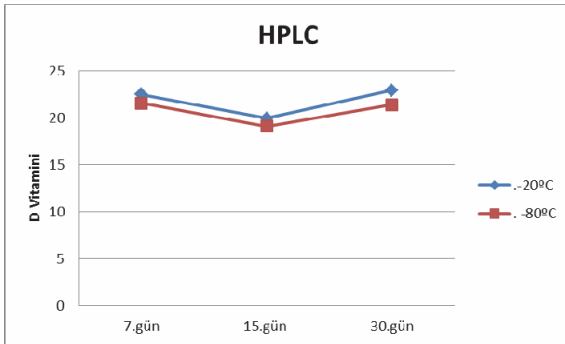
Tablo 2. Çalışma içi ve günler arası kesinlik deneylerinden elde edilen veriler

| | SD | %CV |
|-----------------------|------|-----|
| Çalışma içi kesinlik | 0.92 | 3.6 |
| Günler arası kesinlik | 1.43 | 3.7 |

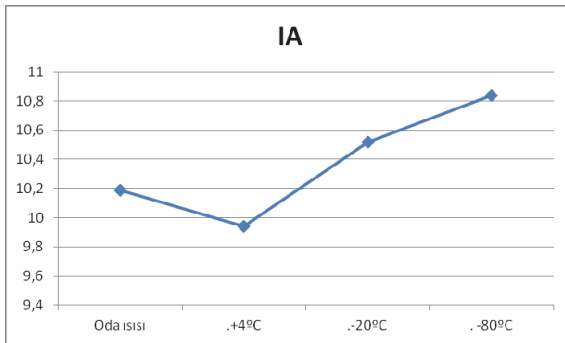
Çalışmamızda numune stabilitelerini değerlendirebilmek amacıyla plazma havuzları oluşturuldu; farklı ısılarda (oda ısısı, $+4^{\circ}\text{C}$, -20°C ve -80°C) farklı sürelerde (örnekleme günü, 1 gün sonra, 7. gün, 15.gün ve 30. gün) saklanarak HPLC ve IA ile ayrı ayrı ölçüm yapıldı. HPLC ölçümlerinde kullanılan örnek havuzunun örnekleme günü elde edilen düzeyi 25.5 $\mu\text{g/l}$, IA yöntemi için kullanılan örnek havuzunun değeri ise 9.72 $\mu\text{g/l}$ idi. HPLC yöntemi ile elde edilen veriler Şekil 1 ve 2'de, IA yöntemi ile elde edilen veriler Şekil 3 ve 4'de verilmiştir.



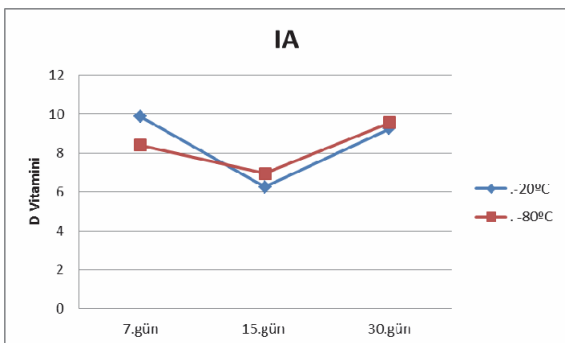
Şekil 1. 24 saat sonra HPLC yöntemi ile elde edilen veriler



Şekil 2. 7, 15 ve 30. günlerde HPLC yöntemi ile elde edilen veriler



Şekil 3. 24 saat sonra IA yöntemi ile elde edilen veriler



Şekil 4. 7, 15 ve 30. günlerde IA yöntemi ile elde edilen veriler

TARTIŞMA

D vitamini ölçümünde; rutin kullanıma uygun otomatize bir yöntem olan IA ile numune hazırlaması zaman alıcı ve kompleks HPLC ölçüm yöntemleri bu çalışmada karşılaştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre, yöntemler arasında ileri düzeyde pozitif yönlü bir korelasyon saptanmıştır. Bunun yanında, saklama koşuluna ve zamana göre numune stabilite de değerlendirilmiştir.

25(OH)D'nin yaklaşık %85'i DBP'ye, %10'u albumine bağlanır, %0.05'ü ise serbest halde bulunur (6). Bu nedenle kromatografik ayrımlar 25(OH)D'yi bağlı proteinlerden ayırmak için bir ekstraksiyon basamağı içerir. Bu da çeşitli ko-presipitasyonların oluşmasına yol açabilir (7). Diğer yandan, ekstraksiyon içermeyen immunoassay metodlar kısmen 25(OH)D'nin lipofilik özelliğine bağlı olarak matriks etkisine duyarlı olabilir (5). Serumda düşük seviyelerdeki (nanomolar) D vitamini metabolitleri göz önüne alınırsa yukarıdaki faktörler, rutin 25(OH)D ölçümündeki temel analitik hataları oluşturmaktadır (5).

D vitamini ölçüm yöntemlerinden HPLC 1977'de geliştirilmiştir. Bu yöntemde UV absorpsiyon yolu ile ölçüm yapılmaktadır. İnterferans veren lipidleri ve vitamin D metabolitlerini ayrıştırması, geniş bir ölçüm aralığına sahip olması, 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃'ü ayrı ayrı ölçebilmesi en önemli avantajlarıdır. Ancak HPLC yöntemini uygulayabilmek için iyi bir donanıma gereksinim vardır (8,9). Sahillioğlu ve ark'nın yaptığı yöntem geçerli kılama çalışmasında (10), tandem kütle spektrometre yöntemi altın standart yöntem olarak kabul edilmiş ve bu yöntemle en uyumlu sonuçlar HPLC yöntemi ile elde edilmiştir. Ancak ön işlemlerinin uzunluğu, örnek hacminin fazla olması gibi nedenlerle, bu metodların rutinde, klinik laboratuvarlarda kullanımlarının elverişsiz olduğu kabul edilmiştir (11).

Immunoassay yöntemi ise, daha az örnek hacmi ile çalıştığı ve ön işlem gerektirmediği için HPLC'ye kıyasla daha hızlıdır. Çalışmamızda kullanılan Roche Diagnostics 25(OH)D kitinin toplam sonuç verme süresi 27

dakikadır. Leino ve ark'nın 25(OH)D ölçümünde elektrokemiluminesans Roche Elecsys ile radyoimmunoassay (RIA), HPLC ve sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi (LC-MS/MS) performanslarının karşılaştırıldığı çalışmalarında, 25(OH)D sonuçlarını RIA ve LC-MS/MS ile uyumlu bulmuşlardır (1).

Biz de çalışmamızda elektrokemiluminesans Roche E170 immunoassay yöntemi ile HPLC yönteminin performanslarını karşılaştırdığımızda; her iki yöntem ile elde edilen sonuçların uyumlu olduğunu tespit ettik. Çalışmamızda ayrıca numune stabilitelelerini de karşılaştırdık. Buna göre, 25(OH)D değerlerinin her iki yöntemle de saklama koşulları ve saklama zamanına göre değiştiğini tespit ettik. Sonuçlarımıza göre 25(OH)D ölçümlerinin numunenin alındığı gün içerisinde çalışılması gerektiği, bekleme süresi ve saklama ısısına göre artış ve azalma olabileceği belirlendi.

25(OH)D'nin immunoassay yöntemleri ile ölçümü uygunluk, hız, turnaround time ve maliyet gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir. Bununla birlikte, rutin immunoassay ölçüm yöntemlerinin kullandıkları antikorlar nedeniyle D₂'yi bağlamadığı bunun da D vitamini takviyesi olarak ergokalsiferol alan hastalarda hatalı ölçümlere yol açtığı bildirilmektedir. Bu durumda performansı daha iyi ölçüm yöntemlerinin yanı sıra tedavide ergokalsiferol yerine kolekalsiferol kullanımı da bu sorunu giderebilecektir (11).

Sonuç olarak, Roche Diagnostics E170 25(OH)D immunoassay yöntemi, D vitamini ölçümü için hızlı, güvenilir bir yöntem olduğundan rutin kullanıma uygundur. Ancak numune stabilitesi açısından taze örneklerde, aynı gün içerisinde çalışılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

Teşekkür: Kitleri temin ederek çalışmamıza katkıda bulunan Roche Diagnostics Türkiye firmasına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Leino A, Turpeinen U, Koskinen P. Automated Measurement of 25-OH Vitamin D3 on the Roche Modular E170 Analyzer. Clin Chem 2008;54(12):2059-62.
2. Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med 2007;357:266 - 81.
3. Chapuy MC, Arlot ME, DuBoeuf F, Brun J, Crouzet B, Arnaud S, et al. Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in elderly women. N Engl J Med 1992;327:1637-42.
4. Bouillon R. Vitamin D: from photosynthesis, metabolism, and action to clinical applications. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. Endocrinology. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. p. 1009-28.
5. Hollies BW. The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: No easy task [Editorial]. JCEM 2004;89:3149 -51.
6. Bikle DD, Gee E, Halloran B, Kowalski MA, Ryzen E, Haddad JG. Assessment of the free fraction of 25-hydroxyvitamin D in serum and its regulation by albumin and the vitamin D-binding protein. J Clin Endocrinol Metab 1986;63:954-9.
7. Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D3 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem 2004;50:1415-7.
8. Zerwekh JE. The Measurement of vitamin D: analytical aspects. Ann Clin Biochem 2004;41(Pt 4):272-81.
9. Horst RL, Hollis BW. Vitamin D assays and their clinical utility. In: Holick MF, ed. Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1999: 239-271.
10. Sahillioglu B, Serdar M.A, Erkal N, Erden G, Bakır F, Yildirimkaya MM et al. Method validation of tandem mass spectrometry for 25-Hydroxyvitamin D3 and comparison of this method with other methods. Turk J Biochem 2011;36(1):73-9.
11. Wootton MA. Improving the Measurement of 25-hydroxyvitamin D. Clin Biochem Rev 2005;26(1):33-6.

Yazışma adresi:

Müge Bekmez

İğdır Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya

İğdır, Türkiye

E-mail: mugged@hotmail.com
