

## Validatie van de iSYS (IDS) 25-hydroxyvitamine D-bepaling en vergelijking met vier andere 25-hydroxyvitamine D-meetmethoden

H.H. van ROSSUM<sup>1</sup>, M.M. BUIJS<sup>2</sup>, J.M.W. van den OUWELAND<sup>3</sup> en G. STEEN<sup>1</sup>

Naast de duidelijk beschreven functie van vitamine D in het botmetabolisme zijn er steeds meer aanwijzingen dat een tekort aan vitamine D ook een rol speelt bij andere aandoeningen zoals bij verschillende maligniteiten, hart- en vaatziekten en auto-immuun ziekten (1). Als maat voor de vitamine D status is de 25-hydroxyvitamine D (25-OHD) concentratie de standaard. Gezien de recente associatie van de vitamine D-status met verschillende aandoeningen en de hoge prevalentie van vitamine D deficiëntie in de Nederlandse bevolking, is er de laatste jaren een sterke toename van het aantal 25-OHD-aanvragen. Zo is in het Bronovo ziekenhuis het aantal aanvragen voor de 25-OHD-bepaling de afgelopen drie jaar gestegen van 1659 in 2008 tot 5651 in 2010 en daarmee meer dan verdriedubbeld. De huidige 25-OHD-bepaling maakt gebruik van HPLC-UV (ChromSystems). Vanwege de hoge werkbelasting inherent aan de HPLC-techniek, in combinatie met het sterk toegenomen aantal aanvragen, werd gezocht naar een geautomatiseerde 25-OHD-analyse. Ondanks de grote vraag naar 25-OHD-bepalingen, is er slechts een beperkt aantal leveranciers van geautomatiseerde meetmethoden voor 25-OHD. De reden hiervoor is dat het voor fabrikanten géén eenvoudige opgave blijkt om zonder uitgebreide (off-line) extractiestap een robuuste 25-OHD-methode te ontwikkelen. Het lipofiele karakter van 25-OHD, de sterke binding aan het vitamine D-bindend eiwit en andere matrix-afhankelijke invloeden zijn hierbij complicerende factoren (2, 3). Daarnaast is het bestaan van twee relevante vormen van 25-OHD, die slechts één dubbele binding en methyl-groep van elkaar verschillen; 25-OHD<sub>2</sub> (ergocalciferol) en 25-OHD<sub>3</sub> (cholecalciferol), een complicerende factor (2, 4). 25-OHD<sub>3</sub> is door zijn 3-10 maal hogere potentie en hogere serumconcentratie klinisch het meest relevant. 25-OHD<sub>2</sub> wordt voor substitutietherapie voorgeschreven in verschillende landen zoals de Verenigde Staten. Ter voorkoming van een mogelijke overbehandeling door onderschatting van de 25-OHD status, dient 25-OHD<sub>2</sub> dan ook te worden meebepaald (2, 4). Ten tijde van dit schrijven waren er drie geautomatiseerde 25-OHD immunoassays beschikbaar; Elecsys/Modular E170 (Roche; 25-OHD<sub>3</sub>, Lot# 159256), Liaison (DiaSorin; 25-OHD total, Lot# 124784F) en iSYS (IDS; 25-OHD total,

Lot# 617A, Bronovo en Medial) (5). In deze studie zijn deze drie assays vergeleken met een referentie LC-MS/MS-methode voor de afzonderlijke bepaling van 25-OHD<sub>3</sub> en 25-OHD<sub>2</sub> (6). Daarnaast is de iSYS 25-OHD-bepaling gevalideerd voor ingebruikname in het laboratorium van het Bronovo ziekenhuis.

### Methode

Voor het vergelijken van de drie beschikbare geautomatiseerde 25-OHD-immunoassay methoden met de referentiemethode, is van 63 serummonsters de 25-OHD-concentratie bepaald met elk van de vier methoden. Na initiële 25-OHD-meting met de Roche methode is het resterende serum verdeeld over drie porties en ingevroren bij -20°C. De resultaten verkregen met de immunoassays zijn steeds vergeleken met de LC-MS/MS-methode en geanalyseerd met behulp van Passing-Bablok regressieanalyse. Daarnaast werd de Pearson's correlatiecoëfficiënt (r) berekend. De volgende validatiecriteria werden gehanteerd: niet-significant afwijkende intercept en slope t.o.v. de referentiemethode en een  $r \geq 0,90$ . Voor de validatie van de iSYS zijn volgens het CLSI EP10-protocol de reproduceerbaarheid, drift, carry-over en lineariteit onderzocht. Als voorwaarde voor de reproduceerbaarheid werd een maximaal toegestane totale variatiecoëfficiënt (VC) van 10% voor alle geteste concentraties gesteld (7). Het CLSI EP9-protocol is gehanteerd voor onderzoek naar de correlatie met de huidige HPLC-UV-methode voor 25-OHD<sub>3</sub> (ChromSystems) in het Bronovo ziekenhuis (n=50). Hier werden dezelfde criteria gebruikt als bij de vergelijking met de LC-MS/MS-methode. Tot slot zijn de 25-OHD-methoden op twee verschillende iSYS systemen (Bronovo en Medial) middels het CLSI EP9-protocol met elkaar vergeleken (n=38). Hiervoor zijn nieuw verzamelde serummonsters gebruikt.

### Resultaten

Alle uitgevoerde regressieanalyses staan weergegeven in figuur 1. De bijbehorende resultaten staan gerapporteerd in tabel 1. Geen van de gemeten serummonsters bevatte een significante hoeveelheid 25-OHD<sub>2</sub>.

### Conclusie

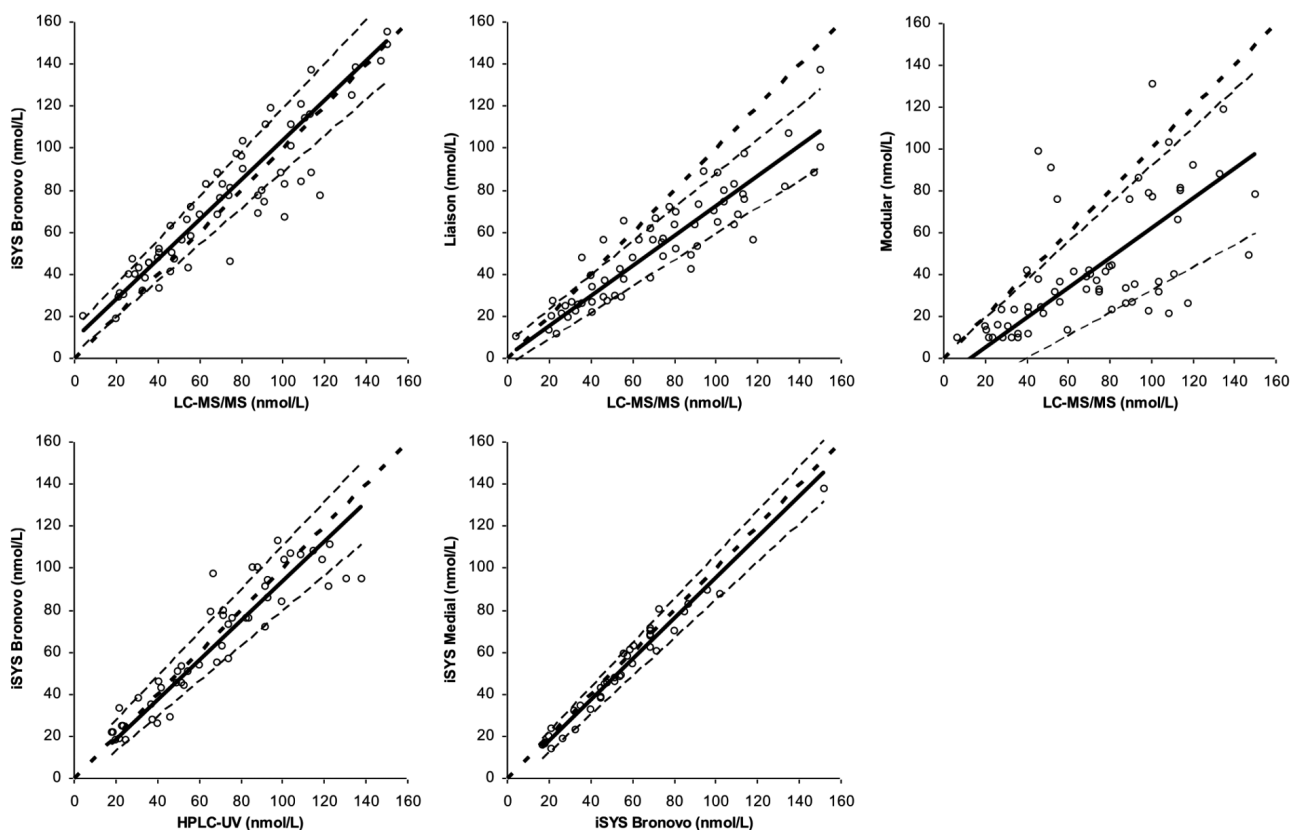
In het Bronovo ziekenhuis wordt middels de HPLC-UV-methode de 25-OHD<sub>3</sub>- en 25-OHD<sub>2</sub>-concentratie afzonderlijk bepaald, maar wordt alleen de 25-OHD<sub>3</sub>-concentratie gerapporteerd. Voor een eventuele overgang naar een nieuwe methode waren we dan ook met name geïnteresseerd in de relatie tussen de 25-OHD<sub>3</sub>-concentratie gemeten met de chromatografie-methode

*Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium, Bronovo ziekenhuis, Den Haag<sup>1</sup>; Medial Diagnostische Centra, Hoofddorp<sup>2</sup>; Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen<sup>3</sup>*

E-mail: gsteen@bronovo.nl

en de door de immunoassays bepaalde (totale) 25-OHD concentratie. Met de LC-MS/MS methode worden de 25-OHD<sub>3</sub>- en 25-OHD<sub>2</sub>-concentratie apart bepaald(6). De immunoassays zijn niet in staat om de 25-OHD<sub>2</sub> en 25-OHD<sub>3</sub> concentraties apart te kwantificeren. Ook zijn ze in het algemeen minder specifiek voor 25-OHD<sub>3</sub> omdat zij kunnen kruisreageren met onder meer 25-OHD<sub>2</sub> en 24,25-dihydroxyvitamine D<sub>3</sub> (24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Zo is de kruisreactiviteit voor respectievelijk 25-OHD<sub>2</sub> en 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 100% en onbekend voor de Liaison, 100% en  $\geq 100\%$  voor de iSYS en  $< 10\%$  en  $< 20\%$  voor de Modular (8). Uit de regressieanalyses kwam naar voren dat de Liaison en de Modular een systematische onderschatting geven van de 25-OHD concentratie ten opzichte van de LC-MS/MS-methode. Dit blijkt uit de verlaagde richtingscoëfficiënt van beide regressielijnen. Daarnaast voldeed ook de correlatie tussen de Modular en de LC-MS/MS niet aan het validatiecriterium. De monsters die met de Modular zijn gemeten missen de extra vries/dooi cyclus ten opzichte van de andere methoden, maar het is onwaarschijnlijk dat dit verantwoordelijk is voor de afwijkende concentraties (9). De correlaties voor de Liaison ( $r=0,90$ ) en de iSYS ( $r=0,92$ ) met de LC-MS/MS-methode voldeden wel aan het door ons gestelde criterium ( $r \geq 0,90$ ). Het effect van de aanwezigheid van kruisreagerende vormen van vitamine D, zoals 25-OHD<sub>2</sub> en 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, op de gevonden resultaten is een relevant discussieonderwerp. Door een verschillende aanwezigheid van deze kruisreagerende vormen van vitamine D in calibratoren en monsters zouden

bijvoorbeeld de lagere richtingscoëfficiënt van de Liaison en de verhoogde asafsnede bij de iSYS verklaard kunnen worden. In onze monsters kwamen echter geen significante hoeveelheden 25-OHD<sub>2</sub> voor, waardoor de gevonden resultaten niet door verschillen in 25-OHD<sub>2</sub> verklaard kunnen worden. De fysiologische concentratie van 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> is ongeveer 7% van de 25-OHD<sub>3</sub> concentratie (10). Gezien de beschreven kruisreactiviteit van deze verbinding is 24,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> wel een significant kruisreagerende fractie bij de iSYS. Het is goed voor te stellen dat biologische variatie in aanwezigheid van kruisreactieve vormen van vitamine D een 100% correlatie tussen de 25-OHD concentratie bepaald middels een immunoassay (iSYS) en een specifieke 25-OHD<sub>3</sub>-bepaling (LC-MS/MS) in de weg staat. Ondanks het feit dat de regressieanalyse van de iSYS met de LC-MS/MS een significant verhoogde asafsnede liet zien is er wegens de geringe afwijking toch gekozen om de iSYS-methode verder te valideren voor ingebruikname in het Bronovo ziekenhuis. Bij de validatie van de iSYS bleek dat de methode voldeed aan alle op voorhand gestelde analytische voorwaarden. De vergelijking met de huidige HPLC-UV-methode liet een niet-significant afwijkende richtingscoëfficiënt en een Pearson's correlatiecoëfficiënt van  $> 0,90$  zien. Bovendien waren de gevonden VC's voor alle concentratieniveaus acceptabel ( $< 10\%$ ). Op basis van deze resultaten is de iSYS in gebruik genomen voor de 25-OHD-bepaling waarbij géén omrekenfactor wordt gebruikt of aanpassing van de referentiewaarden is doorgevoerd.



**Figuur 1.** Plots van de 25-OHD-concentratie gemeten met immunoassays (iSYS, Liaison en Roche) en LC-MS/MS-methode. De vet gedrukte lijn is de regressielijn verkregen middels Passing-Bablok regressieanalyse en de gestippelde lijnen daaromheen geven het 95% betrouwbaarheidsinterval weer. De dikgedrukte gestreepte lijn geeft  $x=y$  weer. Boven staan de vergelijkingen met de LC-MS/MS-methode en onder de vergelijkingen die zijn gedaan in het kader van de iSYS-validatie in het Bronovo ziekenhuis.

**Tabel 1.** Resultaten van regressie en correlatie analyses verkregen uit de vergelijkingen tussen de verschillende 25-OHD-methoden. CI = betrouwbaarheidsinterval. Bij de validatie van de iSYS 25-OHD-methode volgens het CLSI EP10-protocol werd geen significante drift en geen carry-over vastgesteld. Daarnaast was de bepaling lineair in het meetgebied van 33 tot 109 nmol/l. De totale VC's die werden gevonden waren 7,9% (33 nmol/l), 5,6% (69 nmol/l) en 6,5% (109 nmol/l).

| Vergelijkingen                  | Helling (95%CI)  | Asafsnede (95%)  | r    |
|---------------------------------|------------------|------------------|------|
| iSYS (Bronovo) vs LC-MS/MC      | 0,95 (0,86-1,05) | 9,4 (2,0-14,1)   | 0,92 |
| Liaison vs LC-MS/MC             | 0,72 (0,63-0,81) | 1,5 (-4,0-7,0)   | 0,90 |
| Modular vs LC-MS/MC             | 0,68 (0,51-0,86) | -7,4 (-18,5-2,7) | 0,61 |
| iSYS (Bronovo) vs HPLC-UV       | 0,94 (0,84-1,04) | -10,1 (-4,4-6,4) | 0,92 |
| iSYS (Medial) vs ISYS (Bronovo) | 0,97 (0,90-1,05) | -1,6 (-6,1-1,1)  | 0,99 |

Concluderend kunnen we zeggen dat de iSYS 25-OHD-bepaling adequate analytische eigenschappen heeft. Daarnaast laat de iSYS van de technieken die gebruik maken van geautomatiseerde immunoassaytechnologie de beste correlatie met de LC-MS/MS methode zien en blijkt de iSYS goed reproduceerbaar op verschillende iSYS-systemen.

#### Referenties

- Muskiet FAJ, van der Veer E. Vitamine D: waar liggen de grenzen van deficiëntie, adequate status en toxiciteit. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2007; 32: 155-158.
- Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Weber H, Niederau C. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference. *Ann Clin Biochem.* 2008; 45: 153-159.
- Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 149-151.
- Cavalier E, Delanaye P, Chapelle J-P, Souberbielle J-C. Vitamin D: current status and perspectives. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47: 120-127.
- Wallace AM, Gibson S, Hunty A de la, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids.* 2010; 75: 477-488.
- van den Ouweland JMW, Beijers AM, Demacker PNM, van Daal H. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *J Chrom B.* 2010; 878: 1163-1168.
- Stöckl 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.
- Cavalier E, Wallace M, Carlisi A, Chapelle JP, Delanaye P, Souberbielle JC. Cross-reactivity of 25-hydroxy vitamin D2 from different commercial immunoassays for 25-hydroxy vitamin D: an evaluation without spiked samples. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49: 555-558.
- Antioniucci DM, Black DM, Sellmeyer DE. Serum 25-hydroxyvitamin D is unaffected by multiple freeze-thaw cycles. *Clin Chem.* 2005; 51: 258-261.
- Taylor CM, Mawer EB, Wallace JE, St John J, Cochran M, Russell RG, Kanis JA. The absence of 24,25-dihydroxy-cholecalciferol in anephric patients. *Clin Sci Mol Med Suppl.* 1978; 55(6): 541-547.