

Vitamin D: Xét nghiệm của chúng ta tốt như thế nào?

Ronda Greaves

Tổng quan

- Kiến thức cơ bản
- Lâm sàng
- Các khoản tham chiếu
- Các hệ thống thử nghiệm Vitamin D
- Mục tiêu đi đến chất lượng

Phân loại Vitamin

- A - Retinol
- B - Bao gồm 8 vitamin
- C - Ascorbic acid
- D - **Ergocalciferol**
- **Cholecalciferol**
- E - Tocopherol
- K - Phylloquinone

B1	Thiamine
B2	Riboflavin
B3	Niacin
(B4	Adenine)
B5	Pantothenic acid
B6	Pyridoxine
B7 (H)	Biotin
(B8	Inositol)
B9	Folate
(B10	PABA)
(B11	Choline)
B12	Cobalamin

Tổng cộng: 13 = 4 loại tan trong dầu + 9 loại tan trong nước

(B4.B8.B10.B11: hiện nay không còn thuộc nhóm Vitamin)

Vitamin D: Định nghĩa

VITAMIN

Là hợp chất hữu cơ cần thiết như dinh dưỡng, nhưng cơ thể không tổng hợp đủ, vì vậy cơ thể phải được bổ sung qua thức ăn.

HORMONE

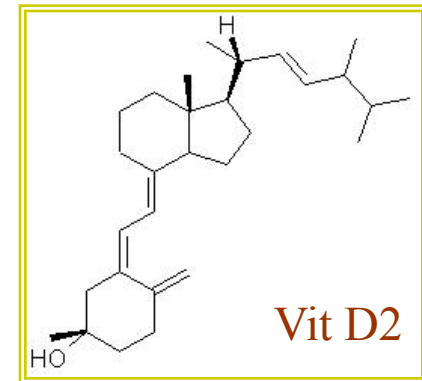
Là một nhóm nhóm tế bào (tuyến) tiết vào vòng tuần hoàn để tác động lên chức năng của tế bào đích, thông qua các thụ thể.

Vitamin D:

- **Vit D1** – Là sự pha trộn theo tỉ lệ 1:1 của lumisterol và Vit D2

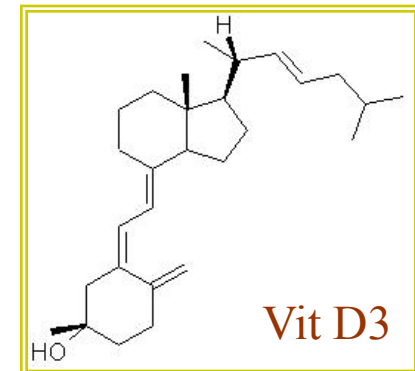
- **Vit D2 – ERGOCALCIFEROL**

- n Có nguồn gốc từ thực vật
- n Được sinh ra từ ergosterol khi bị tia cực tím chiếu qua.
- n Bị cắt cầu nối ở vị trí 9,10 và tạo thành nối đôi ở vị trí C10 và 19.

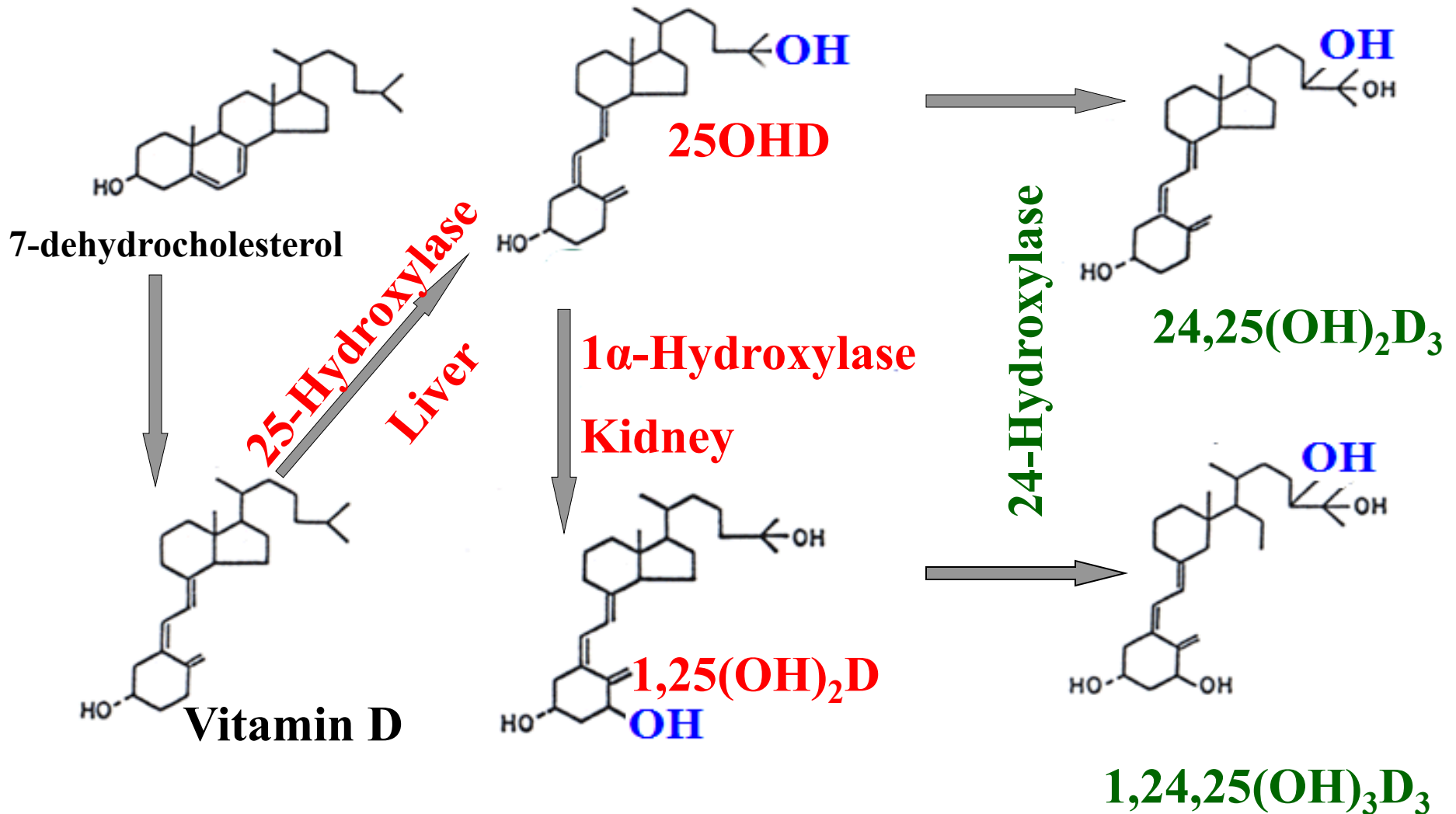


- **Vit D3 – CHOLECALCIFEROL**

- n Có nguồn gốc từ động vật
- n Được hình thành do phá vỡ cầu nối C9 và 10 của 7-dehydrocholesterol bởi tia cực tím, tạo nối đôi C10 & 19
- n Tìm thấy ở da, bộ lông của động vật và chim khi tiếp xúc với ánh nắng. Vit D3 còn tìm thấy trong bơ, não, dầu cá, và lòng đỏ trứng.



Vitamin D



Ứng dụng lâm sàng

- Y Học cổ điển
 - n Bệnh còi xương.
 - n Bệnh nhuyễn xương
- Y học ngày nay
 - n Sức khỏe của xương
 - n Bệnh tiểu đường
 - n Bệnh tự miễn
 - n Điều hòa miễn dịch
 - n Bệnh nhiễm trùng
 - n Bệnh Ung Thư
 - n Bệnh lý về tim mạch



Before vitamin D treatment



After 14 months of vitamin D treatment

(b)

Photos from Lehninger, Principles of Biochemistry

Tăng chỉ định xét nghiệm Vit D

Trong năm 2009, các phòng xét nghiệm ở Mỹ thống kê số xét nghiệm Vit D đã tăng vọt từ 50% đến khoảng 100%. Nhưng với sự tăng vọt của các xét nghiệm và chỉ định sử dụng, thì chất lượng xét nghiệm Vit D ra sao?

www.Westgard.com

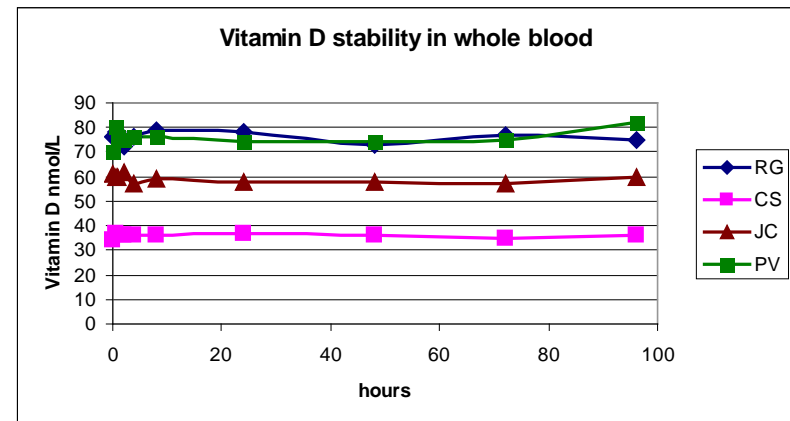
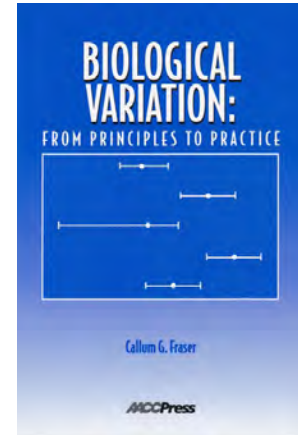
Vitamin D: Ngưỡng tham chiếu nào phù hợp?

- RCH
 - n Thập niên 90: Ngưỡng tham chiếu được đề nghị 23 - 90nmol/L
 - n Thập niên gần đây: Ngưỡng tham chiếu thay đổi từ 50 - 150 nmol/L
- Những khoảng tham chiếu khác
 - n >60nmol/L được đề nghị khi có kèm PTH tăng
 - n >75 nmol/L được đề nghị cho người bình thường
 - n >100 nmol/L trong ngăn ngừa bệnh ung thư
- Ngưỡng nào là thích hợp thì vẫn đang được bàn luận
- NHƯNG- chúng ta chưa có cách nào để cân đối những khác biệt này!!!!

Ảnh hưởng của các nhân tố tiên phân tích

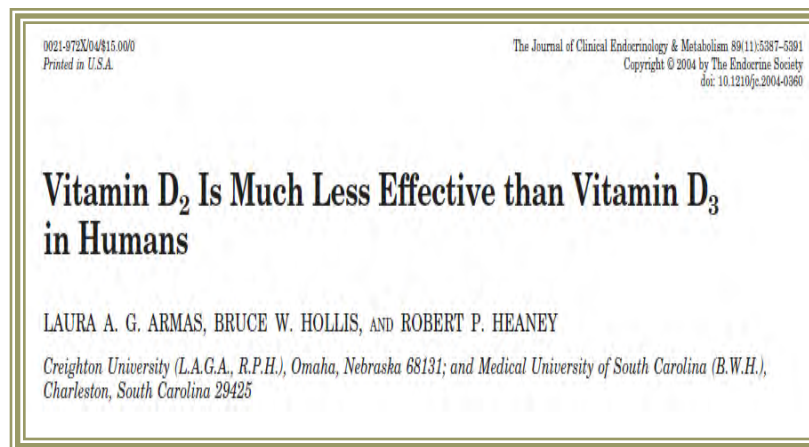
- Sự khác biệt về mặt sinh học
- Sự khác nhau giữa các mùa trong năm
- Sự khác biệt màu da
- Sự khác biệt chủng tộc
- Vitamin D ổn định trong máu toàn phần ở nhiệt độ phòng và dưới ánh nắng mặt trời lên đến 96 giờ.

(Theo: AACB ASM năm 2005)



Vitamin D

- Lựa chọn cách đánh giá thường qui tình trạng của Vitamin D
- Cần phải tách Vit D từ DBP (Vit D liên kết với Protein)
- Mẫu chuẩn phải được chuẩn hóa bằng D3
- Một số kit miễn dịch phản ứng chéo với D2.
 - Trước đây người ta cho rằng điều này là có lợi.
- Hiện nay, Vit D3 được ưa chuộng hơn Vit D2 tại Úc.



Vitamin D: Hệ thống phân tích tự động

- **Roche cobas e 601**
 - n Chỉ phát hiện 25 OH Vit D3
 - n Tỷ lệ phản ứng chéo với Vit D2 là 0%

- **Diasorin Liasion**
 - n Phát hiện 25 OH Vit D3
 - n Trên 80% phản ứng chéo với 25 OH Vit D2



Vitamin D: Những phương pháp miễn dịch khác

- ELISA
- RIA (Miễn dịch phóng xạ)
 - n Diasorin (Sorin)
 - n IDS
- Phương pháp tự động
 - n IDS – iSYS – Hệ thống tự động của IDS
 - n Abbott - Đang trong quá trình thử nghiệm tại xét nghiệm
 - n Siemens - đang nghiên cứu



Chromatography + MS (+MS)

- Tiêu chuẩn vàng
- Cho kết quả chậm
- Cần chuyên viên có kinh nghiệm
- Chi phí đầu tư cao



Live rates at 2010.05.23 11:09:07 UTC

500,000.00 AUD = 7,896,262,319.09 VND

Australia Dollars Vietnam Dong

1 AUD = 15,792.52 VND 1 VND = 0.0000633211 AUD

THE ANALYSIS OF 25-HYDROXYVITAMIN D IN SERUM USING UPLC/MS/MS

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

LJ Calton¹, SD Gillingwater¹, GW Hammond¹, DP Cooper¹ & S Wilson²
¹Waters Corporation, Manchester, UK ²Waters, Australia

INTRODUCTION

Several recent studies have shown that vitamin D deficiency is common in adults and children around the world. In addition to the well known effects of vitamin D deficiency, such as calcium malabsorption, there is growing evidence that the risk for other conditions (e.g. cancers^{1,2}) may be increased. The measurement of 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D) is accepted as the clinical indicator of vitamin D status³ and is important in the diagnosis and treatment of vitamin D deficiency. The major issue with immunoassays is that they cannot differentiate between the two forms of 25(OH)D; 25(OH)D₂ & 25(OH)D₃, and instead, rely on the cross-reactivity of the antibody to measure a total 25(OH)D concentration. If that cross-reactivity is less than 100% then vitamin D₂ therapy may not be monitored effectively.⁴ The aim of this study was to develop a quantitative method for 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ in serum to prevent the misdiagnosis of vitamin D deficiency in patients.



Figure 1. System configuration of Waters ACQUITY UPLC / TQD

METHODS

A Waters[®] ACQUITY[®] Tandem Quadrupole Detector (TQD) coupled to an ACQUITY UPLC[®] (Waters Corporation, Manchester, UK) was used for all analyses (Figure 1). The 25(OH)D compounds were separated from endogenous interferences using an ACQUITY UPLC BEH C8 Column 2.1 x 50 mm, 1.7 µm employing a gradient elution profile, 73-98% B in 1.5min following a 2min initial hold at a flow rate of 0.4mL/min, where mobile phase A and B are 2mM ammonium acetate+0.1% formic acid in water and methanol respectively.

The instrument was operated in positive electrospray ionisation mode using MassLynx[™] 4.1 software with auto data processing by the QuanLynx[™] Application Manager. Specific Multiple Reaction Monitoring (MRM) experiments for each compound were created as shown in Table 1.

A single calibrator and bi-level QC's (Chromsystems, Munich, Germany) were prepared as per the manufacturer's instructions. A low QC was prepared by pooling human serum and adding a known concentration of 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃. The final concentrations of the low, medium and high QC samples were 19, 27 and 84ng/mL for 25(OH)D₂ and 13, 29 and 89ng/mL for 25(OH)D₃ respectively.

Compound	MRM	Dwell (secs)	Core Voltage (V)	Collision Energy (eV)
25(OH)D ₂	401.35 >159.1	0.05	28	28
25(OH)D ₃ *	401.35 >263.2	0.05	28	18
6,25(OH)D ₃	402.35 >159.1	0.05	28	28
25(OH)D ₂	412.35 >83.1	0.05	28	22
25(OH)D ₃ *	413.35 >263.2	0.05	28	18

Table 1. The tuning parameters used when monitoring for 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ and the internal standard. *denotes optimal qualifier ion

To assess linearity, calibrators were prepared in mammalian serum over the concentration range 2.5-100ng/mL for 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃.

The samples were prepared using a liquid-liquid-extraction protocol that involves the addition of internal standard (250ng/mL hexa-deuterated 25(OH)D₃, Synthetica AS, in 80% MeOH/20% IPA), ZnSO₄, MeOH and Hexane to 150µL of serum. Following centrifugation for 5 mins at 13,000rpm, the hexane layer was removed and placed into Waters maximum recovery vials and evaporated to dryness under nitrogen at 50°C. The samples were reconstituted in 75µL of 70% methanol in water and 20µL was injected.

RESULTS

Accuracy

The accuracy of the assay was determined by the analysis of external quality control samples from DEQAS (www.deqas.org). The Chromsystems single point calibrator was used and a calibration line constructed through zero to calculate the DEQAS sample concentrations. Passing-Bablok linear regression was used to compare the Waters 25(OH)D₃ results with the DEQAS LC/MS method mean. All results were within ±11.5% deviation of the expected value (Figure 2).

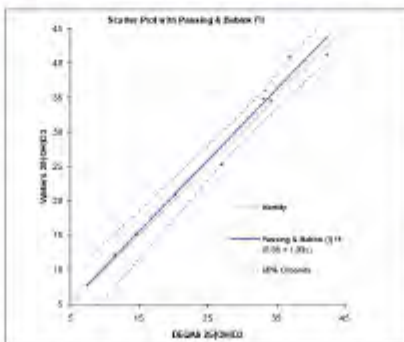


Figure 2. Passing-Bablok linear regression analysis comparing the Waters 25(OH)D₃ results to DEQAS LC/MS method mean

Linearity

The coefficient of determination (R²) for 25(OH)D₃ was >0.999 and the calculated concentrations for the calibrators were all within ±4% of the assigned values. The coefficient of determination (R²) for 25(OH)D₂ was >0.997 and the calculated concentrations for the calibrators were all within ±10% of the assigned values.

Precision

The intra-assay precision was determined by extracting and analysing five replicates of the low, medium and high QC samples. The coefficient of variation (CV) for 25(OH)D over the three levels were calculated. The inter-assay precision was determined over five consecutive days using the low, medium and high QC samples. The results are shown in Table 2.

	Low QC		Medium QC		High QC	
	25(OH)D ₂	25(OH)D ₃	25(OH)D ₂	25(OH)D ₃	25(OH)D ₂	25(OH)D ₃
Intra-assay % CV	5.6	7.5	8.0	3.8	3.1	6.2
Inter-assay % CV	8.9	6.3	9.2	5.5	7.2	5.9

Table 2. Summary of the intra and inter-assay precision of the assay

DISCUSSION

A method for the UPLC/MS/MS analysis of 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ in serum has been developed. The methodology involves a simple liquid-liquid extraction of the analytes from serum and the MRM detection of each analyte using two transitions. Quantifier and qualifier ion ratios were monitored to ensure lack of interference⁵. The assay demonstrates good sensitivity with acceptable intra and inter-day precision. Using this methodology it is feasible to manually process and analyse up to 100 samples per day.

CONCLUSION

- A method for the independent quantification of 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ in serum has been developed with good linearity, sensitivity and precision.
- UPLC/MS/MS offers significant advantages over the traditional HPLC/UV methodology through reduced sample volume, increased sensitivity, specificity and speed.
- UPLC/MS/MS allows for the accurate and reliable measurement of 25(OH)D₂ and 25(OH)D₃ in serum to prevent the misdiagnosis of vitamin D deficiency in patients who are receiving vitamin D₂ supplementation.

References

1. Gorman MD, Garland DF, Garland RL, Grant WS, Mohr WB, Lujan M, et al. Optimal vitamin D status for colorectal cancer prevention: a quantitative meta-analysis. *Am J Prev Med* 2007; 22:210-6.
2. Garland DF, Gorman MD, Mohr WB, Grant WS, Giovannucci EL, Lujan M, et al. Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2007; 103:309-13.
3. Working Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Institute of Medicine. DRIs Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. National Academy Press, Washington, DC, 1997.
4. Kulis B. Editorial: The Determination of Circulating 25-Hydroxyvitamin D in Baby Seal. *J Clin Endocrinol Metab*, July 2004, 89(7):3249-3253.
5. CLS. Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: general principles and guidelines. CLS-4, 2007.

Method comparisons: So sánh các phương pháp

25-Hydroxyvitamin D - Which Assay?

JA Grant^{1,2}, MJ Whiting³, RF Greaves⁴, MJ Black⁵, AM Woolton²

¹Biochemistry Department, The Royal Melbourne Hospital, Parkville VIC 3050 Australia; ²School of Medical Sciences, RMIT University, Sintoner VIC 3083 Australia; ³SouthPath, Flinders Medical Centre, Bedford Park, SA 5042 Australia; ⁴Complex Biochemistry Department, The Royal Children's Hospital, Parkville VIC 3052 Australia; ⁵Clinical Biochemistry Department, Alfred Pathology Service, Melbourne VIC 3004 Australia.

Introduction

Vitamin D plays an important role in calcium homeostasis. Deficiency is associated with defects in bone mineralization, and may predispose to a range of progressive and immune diseases (1). Low levels are prevalent in many European populations and clearly underlie osteoporosis in a major strategy to reducing fracture risk, particularly in the elderly (2). Accurate assessment of vitamin D status is essential. Both to identify patients at risk of fracture and to assess response to treatment. A number of different vitamin D metabolites are present in serum as a result of sequential hydroxylations of the parent compound. 25-Hydroxyvitamin D (25(OH)D) is accepted as the best indicator of clinical vitamin D status (3) and is used routinely for this purpose.

When D levels are low, clinicians (VDC) obtained either an endogenous synthesis, or an exogenous (VDC) obtained solely through diet. While VDC is normally the major form, both may be used for assessment and food intake. Until recently, only VDC was used for this purpose in Australia, however pharmaceutical preparations of VDC are now widely available.

Analysis of 25(OH)D is complicated by the requirement to detect both 25-hydroxyvitamin D₂ (25(OH)D₂) and 25(OH)vitamin D₃ (25(OH)D₃). Poor agreement between 25(OH)D immunoassays reported in recent quality assurance programs (4) has raised concerns about their ability to accurately assess vitamin D status, particularly in patients taking VDC. This issue is highlighted by use of an agreed reference method with which to assess performance. Recently, the Institute of Reference and Diagnostic Chemistry (IRDC) has developed a reference method for 25(OH)D analysis.

AIM

To use LC-MS/MS as a reference method to:

- 1) investigate the presence of 25(OH)D₂ in routine patient sera; and
- 2) assess the accuracy of five 25(OH)D immunoassays in routine containing or not significant amounts of this metabolite.

Methods

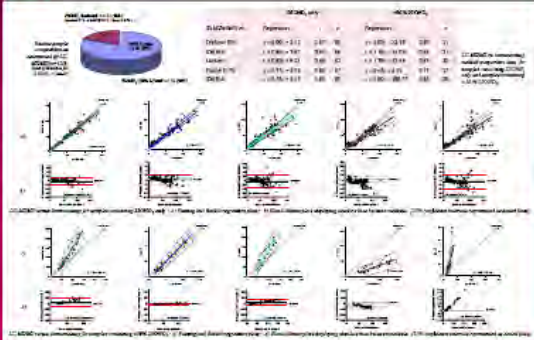
120 unselected routine 25(OH)D serum samples were collected over a 12 week period in 2006. Of these, 107 were obtained from The Royal Children's Hospital (RCH) (Pathology Services from a tertiary care site) (tertiary population) and 13 were from Melbourne Health (MHI) Pathology Services from a related generalist population. An additional 121 samples were obtained from nine clinical trial subjects taking high doses of VDC. In order to assess potential confounding additional work of 25(OH)D₂. Approval for the use of all samples was granted by both the RCH Ethics and Human Research Committee and the MHI Human Research Ethics Committee. 25(OH)D₂, 25(OH)D₃ and total 25(OH)D concentrations were determined using LC-MS/MS (5).

25(OH)D₂ was measured using the following five immunoassay systems:

- DiaSorin Liaison (immunoassay) (LIA)
- IDS EVIDENCE (LIA)
- IDS EVIDENCE (LIA)
- IDS EVIDENCE (LIA)
- IDS EVIDENCE (LIA)

All samples were stored frozen (-20°C) in separate aliquots for each assay and subjected to thaw then freeze before being analysed by separate analysis (6,7). Results from samples containing 100% 25(OH)D₃ and 100% 25(OH)D₂ were included against LC-MS/MS using assays 1-5 (Diagen laboratory with Abbott EIA-250).

Results



Discussion

When samples contained only 25(OH)D₃, all immunoassays demonstrated a similar high negative bias compared to LC-MS/MS, with the lowest bias combining more closely than a standard assay.

Agreement with LC-MS/MS was much more variable when samples contained significant levels of 25(OH)D₂.

The Roche assay greatly overestimated 25(OH)D₂ when low compared to the antibody specificity for 25(OH)D₃ is stated as poor in the kit insert. This assay is marketed as a 25(OH)D₃ assay and is unsuitable for monitoring 25(OH)D in patients taking VDC.

The two DiaSorin assays (LIA and Liaison) demonstrated a positive proportion bias in the group which was unexpected as the antibody specificity for 25(OH)D₂ is stated as 100%. Similarly, the IDS EVIDENCE immunoassay (LIA) demonstrated a positive bias in the group which was unexpected as the antibody specificity for 25(OH)D₂ is stated as 100%.

While most routine clinical samples contained only 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ was included in 10% of routine clinical samples. It is clear as a result of our study that we should be concerned about the accuracy of routine 25(OH)D assays in the presence of this metabolite.

Conclusions

All assays demonstrated a similar slight negative bias compared with LC-MS/MS when samples contained 25(OH)D₃ only. Agreement was more variable in samples containing 25(OH)D₂. The presence of this metabolite in 10% of routine patients indicates the VDC, it still is seen as a result of LC-MS/MS and routine 25(OH)D results should be interpreted with caution.

References

1. Holmberg M, et al. (2002) Vitamin D deficiency in the elderly. *Journal of Internal Medicine* 252: 187-198.
2. Holmberg M, et al. (2002) Vitamin D deficiency in the elderly. *Journal of Internal Medicine* 252: 187-198.
3. Holmberg M, et al. (2002) Vitamin D deficiency in the elderly. *Journal of Internal Medicine* 252: 187-198.
4. Holmberg M, et al. (2002) Vitamin D deficiency in the elderly. *Journal of Internal Medicine* 252: 187-198.
5. Holmberg M, et al. (2002) Vitamin D deficiency in the elderly. *Journal of Internal Medicine* 252: 187-198.
6. Holmberg M, et al. (2002) Vitamin D deficiency in the elderly. *Journal of Internal Medicine* 252: 187-198.
7. Holmberg M, et al. (2002) Vitamin D deficiency in the elderly. *Journal of Internal Medicine* 252: 187-198.



Home Current issue Browse archive Alerts About the journal

Annals of Clinical Biochemistry > Volume 45, Number 2 > Pp. 153-159

Ann Clin Biochem 2008;45:153-159
doi:10.1258/acb.2007.007091
© 2008 Association for Clinical Biochemistry

Original Article

Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference

Heinz Jürgen Roth¹, Heinrich Schmidt-Gayk¹, Holger Weber² and Christoph Niederau³

¹ Limbach Laboratory, Department of Endocrinology and Oncology, Im Breitenspiel 15, 69126 Heidelberg, Germany; ² Labor Prof G Enders und Partner, Rosenbergstraße 85, 70193 Stuttgart, Germany; ³ Labor Dr Niederau, Leopoldstr 10, 44147 Dortmund, Germany

Kết quả kiểm tra chất lượng vòng 32 năm 2009:

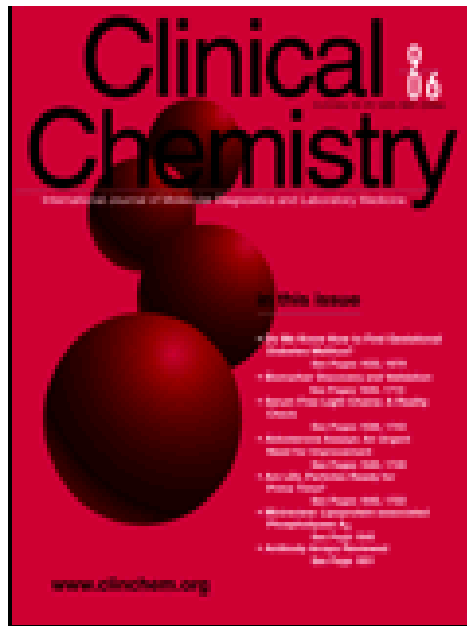
Welcome		Program Selection		End Of Cycle Report: Vitamin D3 (25-hydroxycholecalciferol) Cycle: 32		Summary Data	
Vitamin D3 (25-hydroxycholecalciferol) (nmol/L) - Summary Data Endocrine Program Cycle 32							
Analytical Principle		No. Labs	S.D.	CV	Low 6.0	High 254.0	
Isotope Diln Tandem Mass Spec (IDMSMS)		4	5.4	4.45	7.0	242.0	▲
Radioimmunoassay		5	8.9	9.0	12.0	214.0	
Electrochemiluminescence		26	12.5	11.75	44.0	160.0	▬
HPLC		1	15.5	12.5	3.0	245.0	
Chemiluminescence		24	15.0	15.3	36.0	170.0	
ELISA		4	20.3	10.25	44.0	186.0	▼
Reagent		No. Labs	S.D.	CV	Low 6.0	High 254.0	
Own Preparation		3	5.5	4.5	8.0	246.0	
Roche Diagnostics (Integra)		1	5.4	4.7	44.0	183.0	
Chromsystems		2	10.4	8.45	5.0	242.0	
Roche Diagnostics (Hitachi)		25	12.6	12.9	44.0	159.0	
DiaSorin		28	14.3	14.75	32.0	172.0	
IDS Ltd		5	19.5	17.6	42.0	183.0	
Instrument		No. Labs	S.D.	CV	Low 6.0	High 254.0	
Applied Biosystems API 3200 Q-TRAP		2	4.3	3.4	7.0	246.0	
HPLC Waters		1	5.3	4.4	6.0	238.0	
Applied Biosystems API 4000 Q-TRAP		1	6.4	5.0	8.0	246.0	
Nichols Institute Diagnostics Advantage		1	5.2	5.2	38.0	162.0	
Roche Diagnostics Hitachi Modular		1	8.1	8.0	46.0	156.0	
Scintillation Counter - Gamma		5	8.9	9.0	12.0	214.0	
Roche Diagnostics Elecsys 1010/2010/cobas e 411		4	11.3	10.9	46.0	159.0	
Roche Diagnostics E170/ e 601 (cobas 6000- IA)		21	12.6	12.9	43.0	161.0	
DiaSorin Liaison		23	15.4	15.4	35.0	170.0	
Spectrophotometer/Plate Reader Spectrophotometer/Plate Reader		3	19.5	20.9	42.0	183.0	
Calibrator		No. Labs	S.D.	CV	Low 6.0	High 254.0	
Chromsystems		1	6.4	5.0	8.0	246.0	
Inhouse Calibrator		5	9.9	9.5	42.0	165.0	
LC-MS-MS		21	13.6	14.1	42.0	159.0	
UV Quantification		4	17.5	14.7	29.0	202.0	
Your Method Code: I: Electrochemiluminescence 11L : Roche Diagnostics E170/ e 601 (cobas 6000- IA) 21: Roche Diagnostics (Hitachi) C: LC-MS-MS							

Kết quả kiểm chuẩn Vit D tháng 01/2010 của DEQAS

25-HYDROXYVITAMIN D3							
		346	347	348	349	350	
HPLC	Mean	29.9	93.4	24.6	47.2	48.8	nmol/L
	SD	8.3	21.6	6.0	9.0	9.3	nmol/L
	n	19	19	19	19	19	
	cv	28	23	25	19	19	%
LCMS	Mean	31.3	94.2	25.1	48.0	50.5	nmol/L
	SD	5.4	14.0	5.1	7.1	11.7	nmol/L
	n	43	43	43	43	43	
	cv	17.2	14.9	20.3	14.8	23.1	%

Phương pháp tham chiếu LC-MS/MS

- Hiện có nhiều phương pháp LC-MS/MS đang thực hiện.
- Có vài khác biệt giữa các phương pháp này
- Bộ Kit của Roche dựa trên phương pháp bên dưới.
- Phương pháp này được phát triển với sự cộng tác của Dr Vogeser Klinikum Grosshadern
- Sau đó được tối ưu hóa bởi Roche.

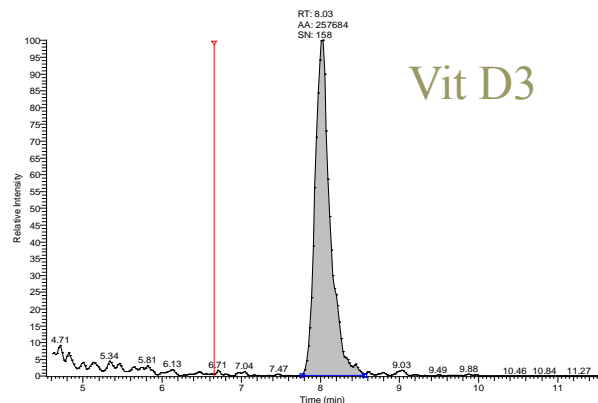


Clinical Chemistry 50, No. 8, 2004

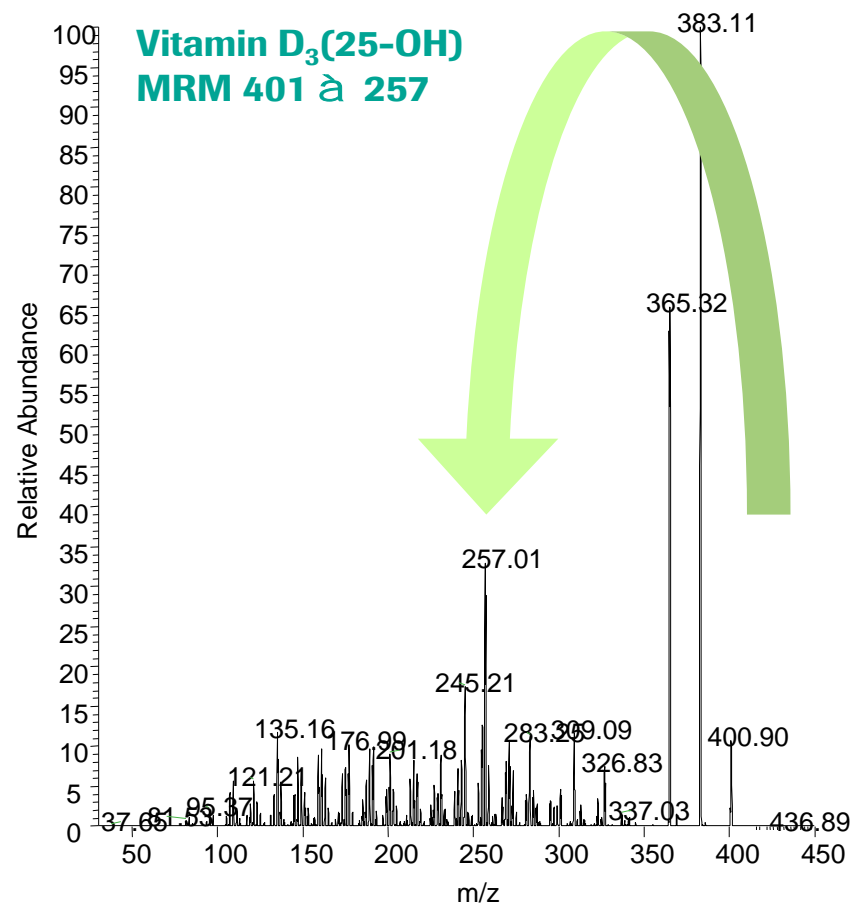
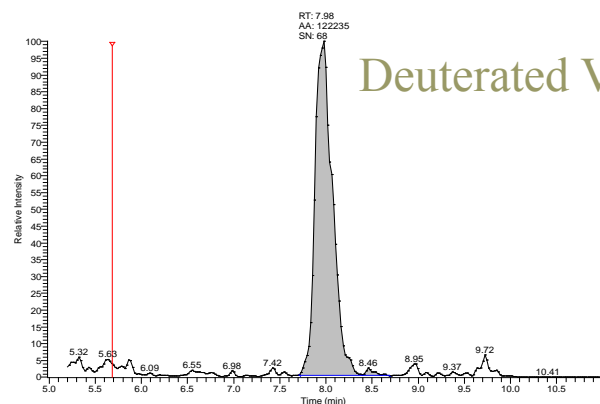
Candidate Reference Method for the Quantification of Circulating 25-Hydroxyvitamin D₃ by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, Michael Vogeser,^{1*} Apostolos Kyriatsoulis,² Erasmus Huber,² and Ilwe Kobold²
(¹ Institute of Clinical Chemistry, Hospital of the University of Munich, Munich, Germany; ² Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany; * address correspondence to this author at: Institute of Clinical Chemistry, Hospital of the University of Munich, D-81366 Munich, Germany; fax 49-89-7095-3240, e-mail Michael.Vogeser@med.uni-muenchen.de)

Vit D3 chromatography + MS/MS

OP_15Jan2009_13 - TIC - SM: 6 RT: 4.53 - 11.53 NL: 1.93E4
F: + cAPCI sid=5.00 SRM ms2 401.300@33.00 [159.150-159.250, 257.150-257.250]



OP_15Jan2009_13 - TIC - SM: 5 RT: 4.98 - 10.98 NL: 9.15E3
F: + cAPCI sid=5.00 SRM ms2 407.300@33.00 [159.150-159.250, 263.150-263.250]



Vitamin D3 (25-OH) được tách ra trong 8 phút.
Tổng thời gian thực hiện 20 phút.

Những thách thức hiện nay trong chuẩn hóa Vitamin D

- *Nên cân nhắc đến sự khác biệt của những phương pháp tham chiếu: Đó là sự thiếu Vit D nguyên liệu có thể sử dụng trong thuốc thử miễn dịch.*
- Có khác biệt trong các phương pháp tạo chuẩn tham chiếu (những hạn chế từ phương pháp thực hiện, ảnh hưởng của sự ly giải sắc ký)
- Chưa có giá trị thực của Vit D

NIST human serum SRM

SRM	Description	Certified Constituents	Reference	Form	No. of Levels
909b	Human Serum	Calcium, Chloride, Cholesterol, Creatinine, Lithium, Magnesium, Potassium, Sodium, Total Glycerides, Triglycerides, Urea, and Uric Acid	Bilirubin	Lyophilized	2
1951b	Lipids in Frozen Human Serum	Total Cholesterol, Total Glycerides, Triglycerides		Frozen	2
956b	Electrolytes in Frozen Human Serum	Total Ca, Li, Mg, K, Na	Ionized Ca	Frozen	3
965a	Glucose in Frozen Human Serum	Glucose		Frozen	3
967	Creatinine in Frozen Serum	Creatinine		Frozen	2
970	Ascorbic Acid in Frozen Human Serum	Total Ascorbic Acid		Frozen	2
1952a	Cholesterol in Human Serum (Freeze-dried)	Cholesterol		Lyophilized	3
968c	Fat-Soluble Vitamins, Carotenoids, and Cholesterol in Human Serum	Vitamins (4), Cholesterol, Carotenoids (4)	Carotenoids (8), Vitamin D	Lyophilized	2
1589a	PCBs, Pesticides, and Dioxins/Furans in Human Serum	PCB Congeners (16), Chlorinated Pesticides (5), Total Cholesterol	PCB Congeners (9), Chlorinated Pesticides (5), Total Cholesterol, Triglycerides, "Free" Cholesterol, Phospholipids	Lyophilized	1
1599	Anticonvulsant Drug Level Assay (valproic acid and carbamazepine)	valproic acid carbamazepine		Lyophilized	1
900	Antiepilepsy Drug Level Assay	Antiepileptics (4)		Lyophilized	3
1955	Homocysteine and Folate in Human Serum	Homocysteine 5-Methyltetrahydrofolic acid	Total Folate, Folic Acid	Frozen	3



Chuẩn SRM 972
được phép dùng
rộng rãi trước
đây.

Now 968d

Những thách thức hiện nay trong việc chuẩn hóa Vitamin D

- Hạn chế của SRM 972
 - n Level 1: Huyết thanh người
 - n Level 2: Pha loãng từ level 1 với huyết thanh ngựa
 - n Level 3: Huyết thanh người gắn với vit D2 (25-OH)
 - n Level 4: Huyết thanh người gắn với vitamin D3 (25-OH) và 3-epi 25(OH)
- *Những bất thường ảnh hưởng đến phân tích miễn dịch*
 - n Vit D thêm vào không gắn kết với protein-vit D như đã xảy ra trong cơ thể
 - n Vit D thêm vào gắn với những thành phần khác hơn Vit D protein
- à *Kết quả là định lượng Vit D không chính xác*
- *Có cách nào thoát khỏi vòng lẩn quẩn này không?*

NIST SRM 972 được thực hiện theo phương pháp LC-MS/MS của Roche

NIST Level	Target conc. Vit. D3 (25-OH)	Target conc. 3-epi-Vit.D3 (25-OH)	Target conc. Vit.D2 (25-OH)	NIST total Vitamin D	Conc. found with Roche LC-MS/MS		Total Vitamin D Roche LC-MS/MS
					Vit. D3 (25-OH)	Vit. D2(25-OH)	
Level 1	23.9 +/- 0.8	1.39 +/- 0.04	0.60 +/- 0.20	25.9	24.8	1.5	26.3
Level 2	12.3 +/- 0.8	0.76 +/- 0.02	1.71 +/- 0.08	14.8	14.6	1.2	15.8
Level 3	18.5 +/- 1.1	1.06 +/- 0.03	26.4 +/- 2.0	46.0	20.5	25.2	45.7
Level 4	33.0 +/- 0.8	37.7 +/- 1.2	2.4 +/- 0.21	73.1	72.1	3.1	75.2

Kết quả từ LC-MS/MS tin cậy đến đâu?

The Quest Story

New York Times, ngày 08-01-2009

- “Quest thừa nhận có nhiều sai sót trong thử nghiệm Vitamin D”
- Phòng xét nghiệm y khoa lớn nhất nước Mỹ từng thừa nhận đã cho ra **kết quả không chính xác của hàng ngàn người** cố làm xét nghiệm Vit D trong vòng 2 năm.
- Những sai sót của Quest được phát hiện khi họ sử dụng xét nghiệm mới phát triển dựa trên xét nghiệm cũ đã được FDA chứng nhận vào năm 2006 – 2007
- Những chuyên gia của Quest cho biết: xét nghiệm mới hứa hẹn chính xác hơn và cung cấp nhiều thông tin chi tiết hơn. Nhưng kit mới **phải dựa vào thiết bị quang phổ khối**, loại thiết bị cần được sử dụng kỹ lưỡng, và đặc biệt khi phải thử nghiệm nhiều mẫu thử.

Mức độ tin cậy từ đặc điểm kỹ thuật của hệ thống đo 25-hydroxy Vit D

Clinica Chimica Acta, 2009; 408: 8-13

Dietmar Stöckl, Patrick M. Sluss and Linda M. Thienpont

Abstract

Background

The divergence in analytical quality of serum/plasma 25-hydroxy-vitamin D analysis calls for defining specifications for a reference measurement system.

Methods

Fundamentally, in a reference measurement system, there should be a relationship between the analytical specifications for higher- (reference) and lower-order (routine) measurements. Therefore, when setting specifications, we started with limits for routine imprecision (CV_{rou}) and bias (B_{rou}) using 4 models: (1) the misclassifications in diagnosis, (2) biological variation data (reference interval (RI) and monitoring), (3) expert recommendations, and (4) state-of-the-art performance. Then, we used the derived goals to tailor those for reference measurements and certified reference materials (CRMs) for calibration by setting the limits for CV_{ref} at $0.5 CV_{rou}$, B_{ref} at $0.33 B_{rou}$, max. uncertainty (U_{max}) at $0.33 B_{ref}$.

Results

The established specifications ranged between $CV_{rou} \leq 22\%$, $B_{rou} \leq 10\%$, $CV_{ref} \leq 11\%$, $B_{ref} \leq 3.3\%$, $U_{max} \leq 1.1\%$ (model 3) and $CV_{rou} \leq 4\%$, $B_{rou} \leq 2.6\%$, $CV_{ref} \leq 2\%$, $B_{ref} \leq 0.9\%$, $U_{max} \leq 0.3\%$ (model 2, monitoring).

Conclusions

Model 2 (monitoring) gave the most stringent goals, model 3, the most liberal ones. Accounting for state-of-the-art performance and certification capabilities, we used model 2 (RI) to recommend achievable goals: for routine testing, $CV_{rou} \leq 10\%$, $B_{rou} \leq 5\%$, for reference measurements, $CV_{ref} \leq 5\%$, $B_{ref} \leq 1.7\%$, and for CRMs, $U_{max} \leq 0.6\%$.

Keywords: Serum/plasma 25-hydroxyvitamin D2; Serum/plasma 25-hydroxyvitamin D3; Quality goals; Bias; Imprecision; Uncertainty

Stockl *et al*: Mục tiêu chất lượng

- Có 4 cách khác nhau
- Hướng dẫn của Hội nghị đồng thuận Stockholm năm 1999 về các đặc tính kỹ thuật như sau:
 1. Biện luận lâm sàng: phân tích kết quả xét nghiệm dựa vào lâm sàng kết hợp với ý kiến chủ quan (bias).
 2. Sự khác biệt về sinh học: Liên quan đến khác biệt sinh học của Vit D trên từng cá thể và giữa các cá thể với nhau.
 3. Ý kiến chuyên gia: Dựa vào kết quả cuối cùng từ chương trình kiểm tra chất lượng ngoại kiểm chuẩn được.
 4. Hướng mới: Đánh giá lại các báo cáo về các phương pháp đo lường hiện nay nhưng đã chuẩn xác các dữ liệu bị sai sót.

Stockl *et al*: Những khám phá

- Đối với những hệ thống đo Vitamin D thường qui thì ý kiến của chuyên gia có: CV là 5x cho sự khác biệt sinh học của Vit D.
- Ý kiến của chuyên viên CV 22% Bias 10%
- Khác biệt sinh học CV 4% Bias 2.6%
- Khảo sát trên 14 nghiên cứu mới nhất về những phương pháp thì chỉ có **duy nhất một phương pháp** gần như đáp ứng được tiêu chuẩn nghiêm ngặt nhất về khác biệt sinh học .

Stockl *et al*: Những gợi ý

- Dùng khác biệt sinh học để tiếp cận, ví dụ: phương pháp Gowan
- Thử nghiệm thường quy
 - n $CV \leq 10\%$
 - n $Bias \leq 5\%$
- Các khoảng đo tham chiếu
 - n $CV \leq 5\%$
 - n $Bias \leq 1.7\%$
- Theo Westgard: “Yêu cầu là thử thách, nhưng Stockl và cộng sự luôn tin rằng cộng đồng những người làm xét nghiệm sẵn sàng đương đầu với chúng”

Hướng đến sự đồng thuận

- n LC-MS/MS để chuẩn hóa Vit D cần phải có:
 - o Chí phí đầu tư cao
 - o Phải biện luận kết quả (đặt biệt trong kiểm định phương pháp HPLC)
 - o Các phương pháp chính xác và tin cậy

- n Các phương pháp LC-MS/MS có thể được chuẩn hóa chỉ khi chuyển hóa khối lượng riêng được sử dụng.

Tóm lại:

- Vitamin D: Xét nghiệm của chúng ta tốt như thế nào?
 - n Hiểu biết lâm sàng về tầm quan trọng của Vit D đã nâng cao trong thời gian gần đây
 - n Phát triển cả hai phương pháp phát hiện Vit D: Miễn dịch tự động và sắc ký quang phổ
 - n Thảo luận khoảng chấp nhận của các xét nghiệm Vit D
 - n Sự đồng thuận là mục tiêu kế tiếp.