



A D-vitamin 25-hidroxiemetabolitok laboratóriumi vizsgálati módszereinek összehasonlítása analitikai és klinikai szempontok alapján

Karvaly Gellért Balázs^{1,2}, Patócs Attila^{1,2,3}, Mészáros Katalin³, Sipák Zoltán⁴, Kovács Krisztián^{1,2}, Vásárhelyi Barna^{1,2}

¹Semmelweis Egyetem, Laboratóriumi Medicina Intézet, Budapest; ²Bionikai Innovációs Központ, Budapest; ³Magyar Tudományos Akadémia – Semmelweis Egyetem "Lendület" Örökletes Endokrin Daganatok Kutatócsoport, Budapest; ⁴Petz Aladár Megyei Oktatókórház, Győr

Bevezetés

A D-vitamin szerepe egyre több élettani és kóreltani folyamattal kapcsolatban merül fel, ezért a laboratóriumi meghatározások iránti igény folyamatosan növekszik. Az elmúlt években ugyanakkor bebizonyosodott, hogy a D-vitamin vegyületek (hazánkban elsősorban a D3-vitamin) 25-hidroxiemetabolitjainak (25OHD) automatizált vizsgálati módszerei nem adnak ekvivalens eredményeket [1]. A D-vitamin standardizációs program (VDSP) keretében referencia eljárás (RMP) áll rendelkezésre, amely szérumban a valós 25-hidroxiergkalciferol (25OHD2) és 25-hidroxiokkalciferol (25OHD3) koncentrációkat a legjobb teljesítmény jellemzőkkel közelíti meg [2]. Ez a módszer folyadékromatográfiával kapcsolt tandem tömegspektrometria (LC-MS/MS) méréseken alapul, így a hozzá kapcsolódó költségek miatt adaptálása a legtöbb klinikai laboratórium számára a realitásokon túlmutat.

A különböző vizsgálati módszerekkel kapott 25OHD szinteket számos tanulmány vetette össze korábban. Ezek leginkább az analitikai összehasonlításra hagytakoztak, a klinikai szempontú vizsgálatokra elvéve, kiegészítésként került sor.

Jelen munkánkban a szérumban 25OHD szinteket 6 korszerű automatizált és egy saját fejlesztésű LC-MS/MS módszerrel határoztuk meg (1. táblázat). Vizsgálataink célja a különböző eljárások összehasonlíthatóságának jobb megértése volt az eredmények klinikai szempontú elemzésén keresztül.

1. táblázat: A vizsgálataink során használt automatizált módszerek főbb jellemzői. CLIA: kemilumineszcens immunoassay, CMIA: kemilumineszcens mikropartikuláris immunoassay, ECLIA: elektro-kemilumineszcens immunoassay.

	Abbott Architect 25-OH Vitamin D	Beckmann Access 25 (OH) Vitamin D Total	DiaSorin Liaison 25 OH Vitamin D Total
rövidítés	AA	BA	DL
FDA 510(k) dokumentum azonosító	k110619	k142373	k112725
mérési módszer elve	CMIA	CLIA	CLIA
mérési tartomány (ng/ml)	13-96	7-120	4-150
VDSP szerinti standardizálás	nem	igen	nem

	IDS-ISYS 25-Hydroxy Vitamin D ^s	Roche Elecsys Vitamin D	Siemens ADVIA Centaur Vitamin D Total (Vit D)
rövidítés	II	RE	SA
FDA 510(k) dokumentum azonosító	k140554	k113546	k133156
mérési módszer elve	CLIA	ECLIA	CLIA
mérési tartomány (ng/ml)	7-125	5-60	4,2-150
VDSP szerinti standardizálás	igen	nem	igen

Eredmények

Az analitikai összehasonlítások eredményeit a **2. táblázat** mutatja. A 25OHD szintek klinikai klasszifikációjának százalékos egyezései és a Cohen-féle kappa értékekből számított minimális százalékos egyezések az **1. ábrán**, az egyes módszerpárok esetében egymással szemben egyoldalúan kapott pozitív eredmények aránya és ezek statisztikai értékelése a **2. ábrán** látható. A 162 minta közül kettőben mutattunk ki 25OHD2-t (1,25 illetve 2,05 ng/mL töménységben).

A hipovitaminózis kategóriába (<20 ng/ml) eső eredmények aránya az AA, BA, DL, II, RE, SA és LC-MS/MS módszerek esetében 29,6%, 29,0%, 39,5%, 13,6%, 34,0%, 29,0%, 28,1%. és 18,5% volt.

Hivatkozások

- Le Goff C, Cavalier E, Souberbielle JC, et al. Pract Lab Med 2015;2:1-14.
- Binkley N, Sempos CT. J Bone Mineral Res 2014;29:1709-14.
- Karvaly G, Mészáros K, Kovács K et al. Clin Chem Lab Med 2016; doi: 10.1515/ccm-2016-0536.

Módszerek

A 25OHD vizsgálatokat 162 anonimizált maradék klinikai laboratóriumi szérumból végeztük, a vonatkozó etikai és jogszabályi előírások betartásával. A DiaSorin Liaison® 25 OH vitamin D TOTAL (Buda Labor Kft.), az Abbott Architect 25-OH Total Vitamin D (Abbott Laboratórius (Magyarország) Kft.), a Roche Elecsys® Vitamin D Total (Roche Kft.), az Access 25(OH) Vitamin D Total (Beckman Coulter Magyarország Kft.), az IDS-ISYS 25-Hydroxy Vitamin D^s (IDS-Medical Kft.) és a Siemens Advia Centaur Vitamin D Total (Diagon Kft.) került összehasonlításra (n=162, Siemens Advia Centaur: n=114).

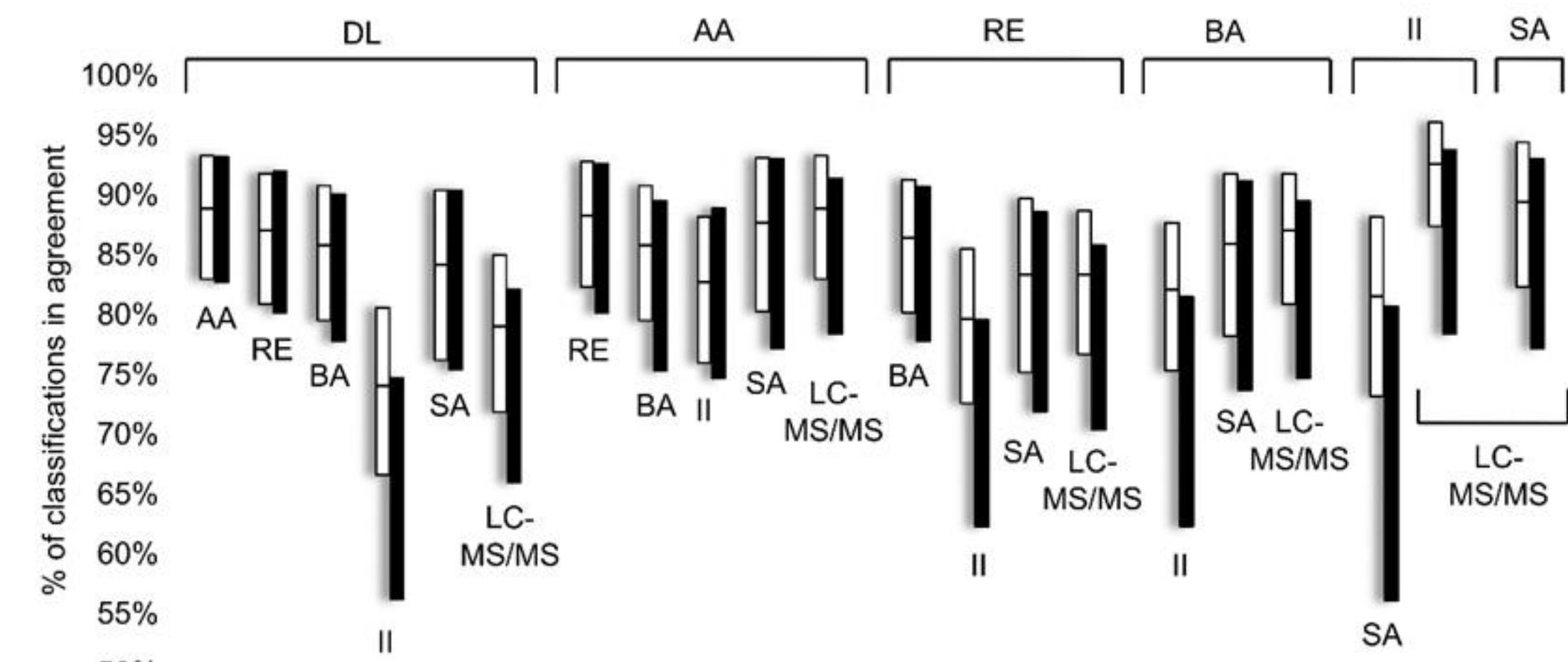
Az LC-MS/MS mérésekre az SE Laboratóriumi Medicina Intézet és a Bionikai Innovációs Központ Nonprofit Kft. (Budapest) együttműködésében került sor. A méréseket belső standard módszerrel, folyadék-folyadék extrakciót és oldószercserét követően, Perkin Elmer Flexar FX-10 UPLC-vel kapcsolt Sciex 5500QTRAP tandem tömegspektrométerrel végeztük pozitív elektropray ionizációval, többszörös reakciókövetés (MRM) módban [3]. A módszer segítségével a 25OHD2 és 25OHD3 koncentrációkat szelektíven határoztuk meg.

Az analitikai szempontú összehasonlítást Passing-Bablok regresszióval, százalékos Bland-Altman analízissel és a Lin-féle konkordancia korrelációs együttható kiszámításával végeztük. Az eredmények eloszlását Wilcoxon-féle előjeles rangpróbbával hasonlítottuk össze. A klinikai szempontú vizsgálatokat a klasszifikáció páronkénti összehasonlításával végeztük. Az elemzésekhez a Microsoft Excel 2013, az R („beeswarm”, „mcr”, „epiR”, „exact2x2”, „stats” csomagok, <https://cran.r-project.org/>), és a GraphPad QuickCalcs (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA) alkalmazásokat használtuk. A hipotézis-vizsgálat során szignifikáns eltérést p<0,05 értékek esetében állapítottunk meg.

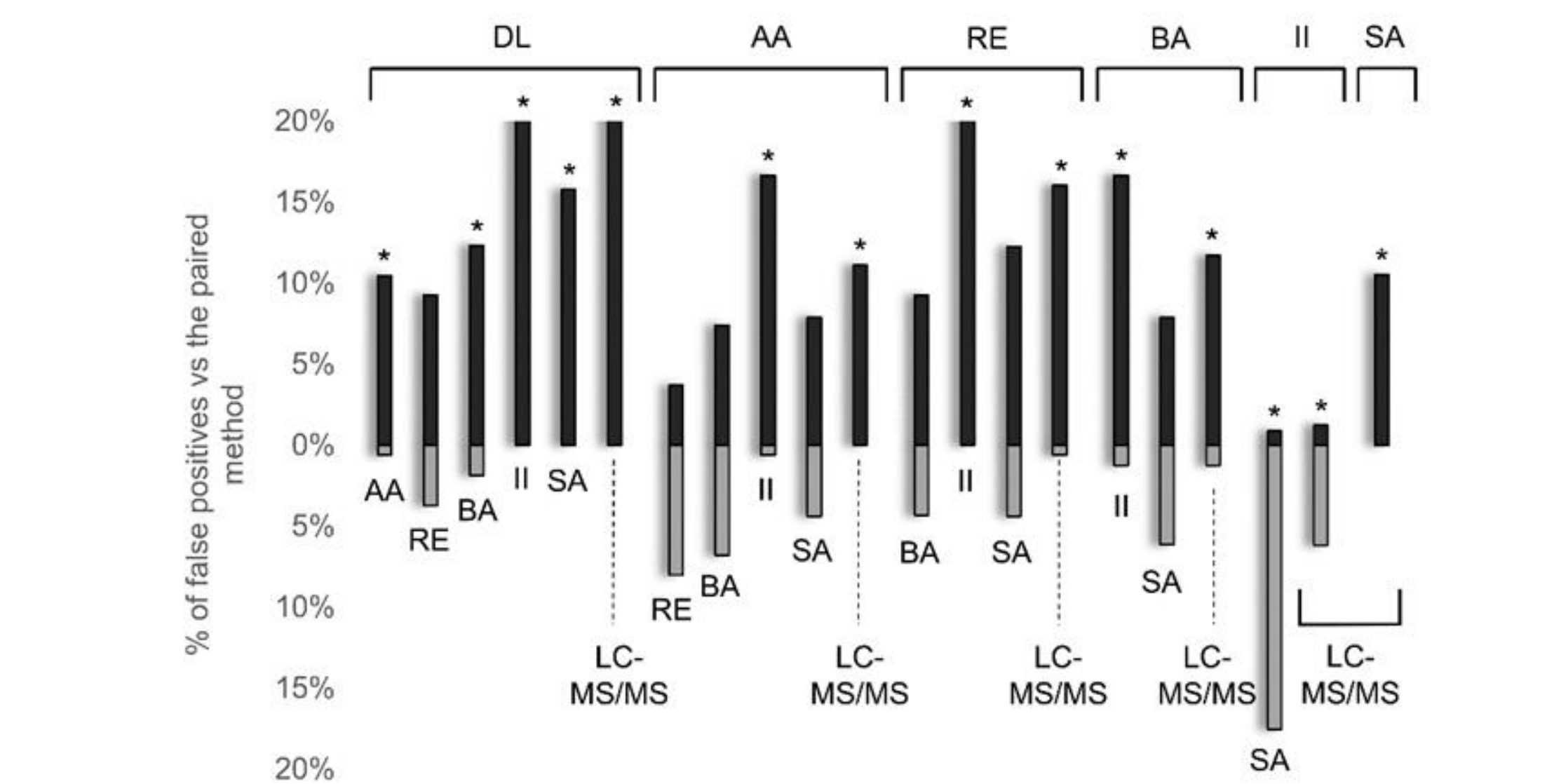
A Cohen-féle kappa statisztikákból Monte-Carlo szimulációval számítottuk ki a minimális százalékos egyezéseket. Ehhez saját fejlesztésű, R környezetben futó scriptet használtunk. A szimulációt a tényleges vizsgálati elemszámokkal, 1 millió szimulált futással végeztük.

2. táblázat: Az alkalmazott vizsgálati eljárásokkal kapott 25OHD koncentrációk analitikai összehasonlításának és eloszlás-vizsgálatának eredményei. CCC: konkordancia korrelációs együttható. PB: Passing-Bablok analízis. p: a Wilcoxon-próba során kapott p érték. r: a Passing-Bablok analízis során kapott Pearson-féle korrelációs együttható.

		BA	DL	II	RE	SA	LC-MS/MS
AA	n	148	148	148	148	107	148
	meredekség	0.8893 (0.8008 – 1.000)	1.215 (1.136 – 1.293)	1.188 (1.086 – 1.314)	1.225 (1.114 – 1.322)	0.930 (0.827 – 1.057)	1.270 (1.136 – 1.402)
	PB tengelymetszet	1.028 (-1.920 – 3.230)	-0.3757 (-2.263 – 1.711)	1.294 (-2.435 – 4.508)	-7.163 (-9.708 – -4.207)	-0.4461 (-3.684 – 2.094)	-1.755 (-5.052 – 2.078)
	r	0.794	0.940	0.863	0.888	0.714	0.832
	Bland-Altman %	4.6 (-41.6 – 50.8)	-18.0 (-45.7 – 9.6)	-22.7 (-62.9 – 17.5)	6.8 (-42.1 – 55.8)	4.5 (-41.6 – 50.5)	-17.9 (-58.4 – 22.5)
BA	n		161	158	158	114	161
	meredekség		1.065 (1.000 – 1.145)	1.385 (1.268 – 1.492)	0.7273 (0.6800 – 0.7740)	0.9978 (0.8864 – 1.109)	1.368 (1.270 – 1.471)
	PB tengelymetszet		1.625 (0.1473 – 3.081)	-1.285 (-4.435 – 1.196)	6.177 (4.780 – 7.495)	-0.2962 (-3.069 – 2.785)	-3.225 (-5.413 – -1.059)
	r		0.887	0.821	0.821	0.733	0.878
	Bland-Altman %		-16.1 (-55.1 – 22.9)	-25.6 (-70.3 – 19.2)	-5.5 (-67.1 – 56.1)	0.8 (-46.7 – 48.3)	-20.0 (-58.7 – 18.6)
DL	n			161	158	112	162
	meredekség			1.437 (1.350 – 1.529)	1.434 (1.337 – 1.544)	1.105 (1.004 – 1.203)	1.483 (1.384 – 1.587)
	PB tengelymetszet			1.565 (-0.5032 – 3.697)	-6.058 (-8.309 – -3.963)	0.422 (-1.907 – 2.706)	-0.5603 (-2.455 – 0.8553)
	r			0.910	0.886	0.834	0.908
	Bland-Altman %			-41.8 (-78.0 – -5.6)	-9.7 (-62.5 – 43.0)	-13.1 (-44.0 – 17.8)	-36.1 (-67.3 – -4.9)
II	n				158	114	161
	meredekség				0.9922 (0.9119 – 1.087)	0.7307 (0.6469 – 0.8190)	1.020 (0.9296 – 1.1188)
	PB tengelymetszet				8.783 (5.558 – 10.84)	0.2811 (-2.304 – 2.919)	-2.360 (-5.080 – 0.5977)
	r				0.810	0.710	0.878
	Bland-Altman %				-31.2 (-92.3 – 30.0)	27.0 (-1.9 – 73.9)	5.9 (-35.4 – 47.3)
RE	n					158	158
	meredekség					0.6889 (0.6037 – 0.7911)	1.011 (0.9172 – 1.104)
	PB tengelymetszet					6.617 (4.631 – 8.807)	5.365 (3.335 – 7.766)
	r					0.604	0.821
	Bland-Altman %					-6.6 (-77.6 – 64.5)	-26.0 (-82.7 – 30.6)
SA	n						114
	meredekség						1.419 (1.240 – 1.587)
	PB tengelymetszet						-3.579 (-7.358 – 0.3949)
	r						0.747
	Bland-Altman %						22.4 (-19.7 – 64.4)



1. ábra: A különböző módszerekkel kapott eredmények klinikai klasszifikációjának százalékos egyezései, páronként összehasonlítva (világos oszlopok), valamint a Cohen-féle kappa statisztikákból számított minimális százalékos egyezés értékek, szintén páronként összehasonlítva (sötét oszlopok). Az oszlopokon belüli vonalak az átlagos egyezést, az oszlopok alsó és felső szélei a 95%-os konfidencia intervallumok határait jelölik. A rövidítéseket ld. az 1. táblázatban.



2. ábra: A különböző módszerekkel kapott klinikai klasszifikációk egymással, páronként történő összehasonlításának eredményei. A * szignifikáns eltérést jelöl (p<0,05). A rövidítéseket ld. az 1. táblázatban.

Következtetések

- A különböző 25OHD vizsgálati eljárásokkal kapott eredmények nem tekinthetők egymással ekvivalensnek, emellett matematikai úton nem tehetők egymással ekvivalenssé az eredmények közötti jelentős sztochasztikus eltérések miatt.
- Különböző módszerek használatakor a hipovitaminózis esetek előfordulási gyakorisága jelentősen eltérhet, a különbség két módszer között akár háromszoros is lehet (DL vs II).
- Az analitikai összehasonlítás módszereinek alkalmazhatósága a jelenleg elérhető 25OHD vizsgálati módszerek esetében az ekvivalencia hiányának megállapítására korlátozódik. Az eredmények eloszlásának statisztikai azonossága nem mutat összefüggést a módszerek analitikai vagy klinikai egyezésével. A klinikai klasszifikáció százalékos egyezése (2. ábra) ugyanakkor közepes mintaszámmal végzett módszer-összehasonlítások során az egyezés alkalmas mutatója. Használatát a szűkebb konfidencia intervallumok és a közvetlen értelmezhetőség előnyösebbé teszik a Cohen-féle kappa statisztikával szemben.
- A klinikai klasszifikáció százalékos egyezése, illetve a módszerpárokon belül egyoldalúan kapott pozitív eredmények arányainak statisztikai vizsgálata (3. ábra) együtt alkalmasak a rutin diagnosztikai vizsgálatokhoz használt módszerek közötti váltás következményeinek felmérésére, valamint a különböző módszerekkel kapott 25OHD eredmények klinikai szempontú összehasonlítására.
- A BA, II és SA módszerek összehasonlításának eredményei azt mutatják, hogy a VDSP RMP szerinti standardizáció nem garantálja a két vizsgálati módszer közötti ekvivalenciát.