

1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται διαρκώς αυξανόμενο επιστημονικό ενδιαφέρον για τις βιολογικές δράσεις της βιταμίνης D. Σε γενικές γραμμές, οι γνώσεις μας μαζικά επεκτείνονται πέρα από τον ορίζοντα της ομοιόστασης του ασβεστίου, είμαστε όμως ακόμη μακριά από την κατανόηση του πλήρους φάσματος των επιπτώσεων της υποβιταμίνωσης D.

Πολυάριθμες μελέτες προσθέτουν συνεχώς νέα γνώση για τον κύριο ρόλο και την εξαιρετική σημασία της βιταμίνης D για τη διασφάλιση της καλής υγείας. Η επιτυχία αυτών των μελετών απαιτεί την ικανότητα για ακριβή και αναπαραγωγίμη μέτρηση των μεταβολιτών της βιταμίνης D. Έχει υπάρξει αξιοσημείωτη πρόοδος στις μεθόδους προσδιορισμού και έτσι σήμερα οι ερευνητές μπορούν να μετρήσουν 25(OH)D με μια σειρά διαφορετικών μεθοδολογιών. Η επιλογή της δοκιμασίας που θα χρησιμοποιηθεί κάθε φορά, θα πρέπει να υπαγορεύεται από

τη διαθεσιμότητα του απαιτούμενου εξοπλισμού, την τεχνική εμπειρογνώμοσύνη και την ανάγκη για ποσοτικοποίηση τόσο της D₃ όσο και της D₂. Το πιο σημαντικό είναι να υπάρχει ένας εξωτερικός μηχανισμός ελέγχου της ποιότητας, για την διασφάλιση της ορθότητας και της ακρίβειας των μετρήσεων της βιταμίνης D σε κάθε εργαστήριο.

2. Γενικά

2.1 Η χημική δομή της βιταμίνης D

Η βιταμίνη D είναι ορμόνη, υπό την έννοια ότι συντίθεται στο σώμα, μολονότι όχι από ενδοκρινή αδένες και μεταφέρεται μετά από περαιτέρω διεργασίες, μέσω της κυκλοφορίας για να δράσει σε κύτταρα-στόχους. Είναι επίσης βιταμίνη υπό την έννοια ότι όταν δεν είναι δυνατόν να συντεθεί σε επαρκείς ποσότητες, πρέπει να προσληφθεί εξωγενώς. Ουσιαστικά πρόκειται για προ-ορμόνη.

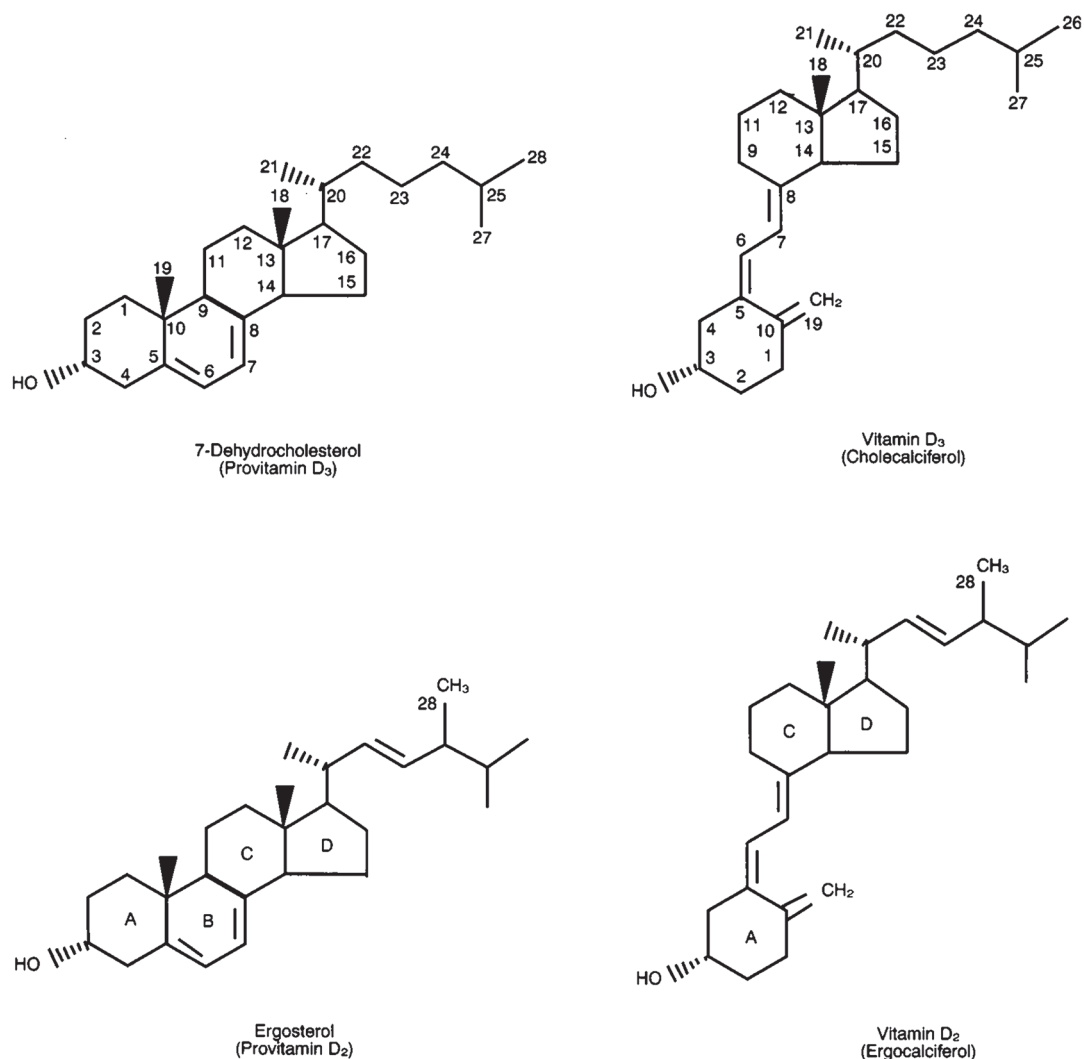
Είναι ουσία λιποδιαλυτή που διακρίνεται σε δύο κύριες μορφές. Τη βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη) ζωικής προέλευσης και τη βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη) φυτικής προέλευσης (κυρίως από μανιτάρια και μαγιά). Η βιταμίνη D₂ 9,10-seco(5Z,7E)-5,7,10(19),22-ergostatetraene-3b-ol, είναι ένα οργανικό μόριο με ανθρακική αλυσίδα 28 ανθράκων που προέρχεται από τη φυτική στερόλη εργοστερόλη. Η βιταμίνη D₃ 9,10-seco(5Z,7E)-5,7,10(19) chole-statriene-3b-ol είναι ένα οργανικό μόριο με ανθρακική αλυσίδα 27 ανθράκων που προέρχεται από τη χοληστερόλη. Οι δύο μορφές διαφέρουν ως προς τη μεθυλομάδα στη θέση 24 και το διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων 22-23 (Εικόνα 1).

Η βιταμίνη D και οι μεταβολίτες της έχουν στεροειδή προέλευση, διαφέρουν όμως από ένα τυπικό στεροειδές στα ακόλουθα σημεία:

- Ο δεσμός ανάμεσα στους άνθρακες C-9 και C-10 έχει σπάσει.
- Ο δακτύλιος A έχει περιστραφεί κατά τη cis διαμόρφωση.
- Η πλευρική αλυσίδα έχει επιμηκυνθεί.

Το πιο σημαντικό στοιχείο της δομής της βιτ. D αφορά στην cis-trans διαμόρφωση. Αυτή η μοναδική γεωμετρία την κάνει (αυτή και τους μεταβολίτες της) ευαίσθητους στην οξειδωση, στις προσαρμοστικές αλλαγές από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας καθώς και επιδεδκτικούς στην επίδραση των ελευθέρων ριζών. Η βιταμίνη D₂ είναι λιγότερο βιοενεργή από τη βιταμίνη D₃. Πιστεύεται ότι οι δύο μορφές ενεργοποιούνται και λειτουργούν με τον ίδιο τρόπο [1].

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	
D ₂	ΒΙΤΑΜΙΝΗ D ₂
D ₃	ΒΙΤΑΜΙΝΗ D ₃
25(OH)D	25-ΥΔΡΟΞΥ-ΒΙΤΑΜΙΝΗ D
1,25(OH) ₂ D	1,25-ΔΙΥΔΡΟΞΥ-ΒΙΤΑΜΙΝΗ D
24,25(OH) ₂ D	24,25-ΔΙΥΔΡΟΞΥ-ΒΙΤΑΜΙΝΗ D
3-epi-25(OH)D ₃	C-3 ΕΠΙΜΕΡΕΣ
VDBP	ΔΕΣΜΕΥΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΤΗΣ ΒΙΤ. D
VDR	ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D
FGF-23	ΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΤΩΝ ΙΝΟΒΛΑΣΤΩΝ 23
PTH	ΠΑΡΑΘΟΡΜΟΝΗ
HPLC	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
GC-MS	ΑΕΡΙΑ ΦΑΣΜΑΜΕΤΡΙΑ
LC-MS/MS	ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ
HR-MS	ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΣΗΣ
RMP	ΠΡΟΤΥΠΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΡΗΣΗΣ
ALTM	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ
VDSP	ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D



Εικ. 1. Χημική δομή της βιταμίνης D₂ και βιταμίνης D₃ και των αντίστοιχων προδρόμων, εργοστερόλη και 7-δευδροχοληστερόλη. (Τροποποιημένη από Holick 2007)[2].

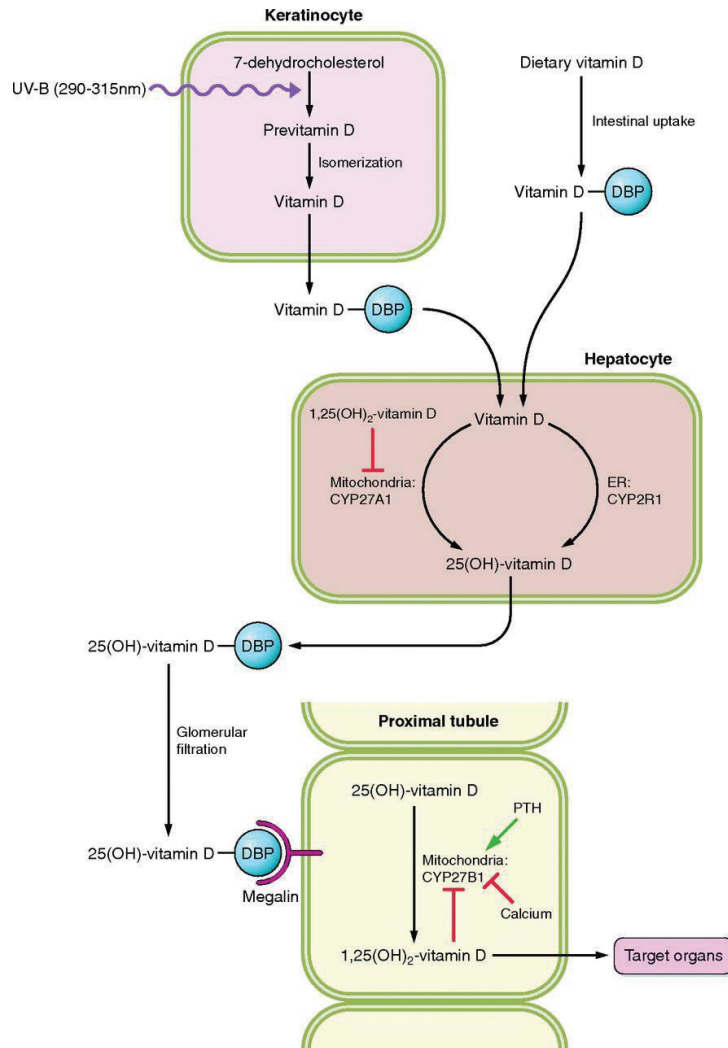
2.2 Η βιοσύνθεση της βιταμίνης D

Στο δέρμα των θηλαστικών (κυρίως στη βασική μεμβράνη της επιδερμίδας) εντοπίζεται μια πρόδρομη ουσία της βιτ. D₃ η 7-διυδρο-χοληστερόλη. Με την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας UVB (μέγιστο αποτέλεσμα σε μήκος κύματος 290-310 nm, βέλτιστο 296 nm) διεγείρεται η φωτόλυση της 7-διυδρο-χοληστερόλης σε προβιταμίνη D₃ ως συνέπεια της διάνοιξης του δακτυλίου της. Κατόπιν μετά από επαναδιάταξη του μορίου της προβιταμίνης στο χώρο (επαναδιάταξη που απαιτεί ενέργεια και εξαρτάται από τη θερμοκρασία) παράγεται η ισομερής της βιτ. D₃ [3]. Πολλοί είναι οι παράγοντες (ενδογενείς και περιβαλλοντικοί) που επηρεάζουν την παραγωγή της βιτ. D από το δέρμα:

- Διάρκεια έκθεσης.
- Χρήση αντηλιακών.
- Εποχή του έτους.

- Ηλικία.
- Παχυσαρκία.
- Ποσότητα μελανίνης.
- Γεωγραφικό πλάτος [4].

Ακολούθως μεταφέρεται στη συστηματική κυκλοφορία όπου συνδέεται με την πρωτεΐνη φορέα της, την **VDBP [(Vitamin D Binding Protein)]**. Η VDBP συνδέεται με πολλούς από τους μεταβολίτες της βιτ. D με διαφορετική συγγένεια για τον καθένα (μεγαλύτερη για τους μεταβολίτες της D₃ παρά με εκείνους της D₂). Η προερχόμενη από τη διαίτα βιτ. D απορροφάται από το έντερο όπου ενσωματώνεται με τα χυλομικρά και μεταφέρεται μέσω του λεμφικού συστήματος στο αίμα και τελικά στο ήπαρ. Η βιταμίνη D αποθηκεύεται στο λιπώδη ιστό, σε επαρκείς ποσότητες, υπό φυσιολογικές συνθήκες για αρκετούς μήνες [3,5].



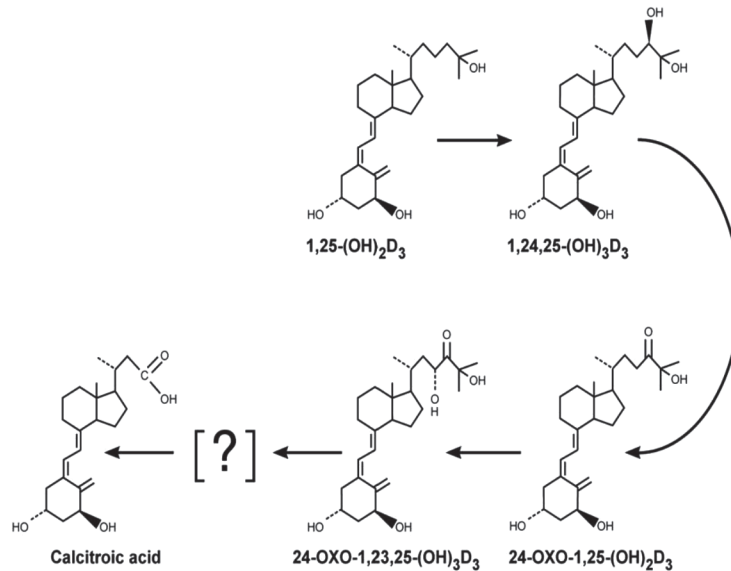
Εικ. 2. Ο μεταβολισμός της βιτ. D. (Τροποποιημένο από Koric, 2013)[8].

2.3 Ο μεταβολισμός της βιταμίνης D

Στο μικροσωμικό κλάσμα των κυττάρων του ήπατος η D_3 υδροξυλιώνεται στη θέση 25 σχηματίζοντας την 25-υδροξυ-βιταμίνη D_3 [$25(OH)D_3$] η οποία είναι η κύρια μορφή της βιταμίνης D_3 στην κυκλοφορία. Η υδροξυλίωση καταλύεται από το ένζυμο 25-υδροξυλάση (CYP2R1) που ανήκει στην οικογένεια του κυτοχρώματος P-450(CYP). Κάποια υπολειμματική 25-υδροξυλίωση μπορεί να οφείλεται στη μιτοχονδριακή CYP27A1, της οποίας η κύρια φυσιολογική λειτουργία είναι η υδροξυλίωση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης στη σύνθεση χολικών οξέων, αλλά η οποία μπορεί επίσης να υδροξυλιώνει την $25(OH)D_3$ [6].

Στη συνέχεια η $25(OH)D_3$ μεταφέρεται στο νεφρό, συνδεδεμένη με την VDBP, όπου (στα εγγύς νεφρικά σωληνάκια) υπό την επίδραση του ενζύμου 1-α υδροξυλάση (CYP27B1) υδροξυλιώνεται στη θέση C_1 του δακτυλίου A και με αυτόν τον τρόπο μετατρέπεται στη δραστική της μορφή 1,25 διυδροξυ-βιτα-

μίνη D_3 [$1,25(OH)_2D_3$]. Η 1-α υδροξυλάση είναι ένζυμο των μιτοχονδρίων των κυττάρων των νεφρικών σωληναρίων που εκφράζεται και σε άλλους ιστούς όπως οστεοβλάστες, έντερο, πάγκρεας, προστάτη, μαστό συμμετέχοντας έτσι και σε τοπική παραγωγή ενεργούς βιτ. D. Κοκκιωματώδη νοσήματα όπως η σαρκοείδωση συχνά συνοδεύονται από υπερέκφραση CYP27B1 η οποία οδηγεί σε υπερβολική τοπική παραγωγή $1,25(OH)_2D_3$ [1]. Η μεγαλίνη μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη 600-kDa δεσμεύει εξωκυττάρια το σύμπλεγμα βιταμίνη D-VDBP [4]. Ειδικότερα, τα επιθηλιακά κύτταρα του εγγύς σωληναρίου εκφράζουν τις πρωτεΐνες μεγαλίνη και cubilin, οι οποίες δεσμεύουν και οδηγούν στο εσωτερικό του κυττάρου το άθικτο σύμπλοκο $25(OH)D_3$ -VDBP. Μετά την ενδοκυττάρωση μέσω μεγαλίνης η $25(OH)D_3$ πιστεύεται ότι αποδεσμεύεται από την VDBP για να μεταφερθεί στα νεφρικά μιτοχόνδρια όπου μεταβολίζεται σε [$1,25(OH)_2D_3$] [7] (βλ. Εικόνα 2).



Εικ. 3. Η αποικοδόμηση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. (Τροποποιημένη από DeLuca 2014 [10]).

2.4 Η κάθαρση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$

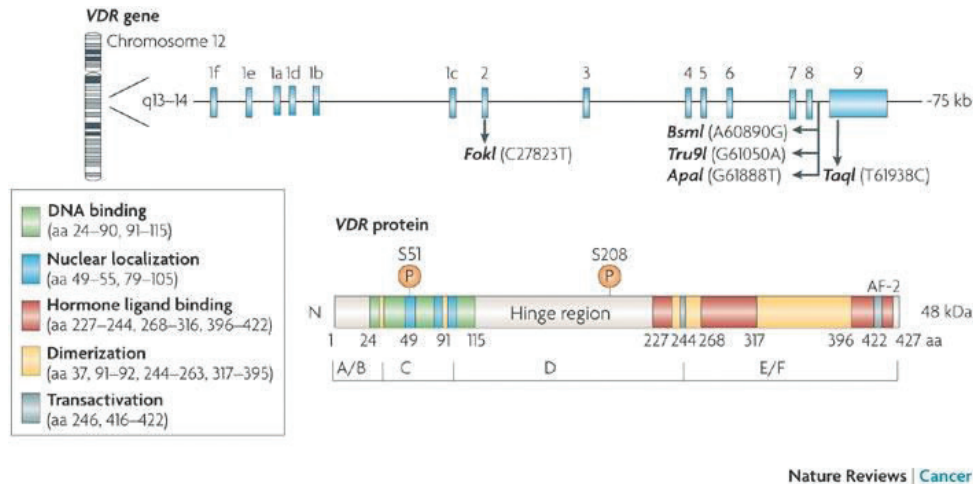
Στο νεφρό εκτός από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ μπορούν να σχηματιστούν και άλλοι μεταβολίτες όπως η 24,25 δι-υδροξυ-χοληκασιφερόλη [$24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$] η οποία είναι δραστική μόνο κατά το 1/20 της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Το ένζυμο που καταλύει αυτή την αντίδραση είναι η 24-υδροξυλάση (CYP24A1) του κυτοχρώματος P450 η οποία βρίσκεται σε όλους τους ιστούς στόχους της βιτ. D και έχει ως κύριο ρόλο την απενεργοποίηση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Αυτό γίνεται αυξάνοντας τον καταβολισμό της σε $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}_3$ και ακολούθως σε καλσιτροϊκό οξύ το οποίο αποβάλλεται στη χολή αλλά και με την παραγωγή $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ καταλύοντας την $25(\text{OH})\text{D}_3$ και μειώνοντας τη διαθεσιμότητά της για την 1-υδροξυλίωση (Εικόνα 3). Αυτή η τρίτη υδροξυλίωση των μεταβολιτών της βιταμίνης D στον άνθρακα 24, έχει μια σημαντική επίδραση στην δραστικότητα της βιταμίνης D. Ενώ αυτή η αντίδραση είναι υπεύθυνη για μετρήσιμα επίπεδα των μεταβολιτών $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και $1,24,25$ -τρι-υδροξυ-βιταμίνης D στο αίμα, είναι το πρώτο βήμα για την αδρανοποίηση της βιταμίνης D. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα του μεταβολισμού, που προστατεύει τους οργανισμούς από την τοξικότητα της βιταμίνης D. Όλα τα κύτταρα που εκφράζουν τον υποδοχέα της βιταμίνης D και ως εκ τούτου απαντούν στην $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ πιστεύεται ότι εκφράζουν το CYP 24 γονίδιο [4]. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ του ορού δρα στο λεπτό έντερο για τον έλεγχο της ενεργού εντερικής απορρόφησης του ασβεστίου και του φωσφόρου και τα επίπεδά της στον ορό συσχετίζονται με ενεργό εντερική απορρόφηση του ασβεστίου σε ανθρώπους [9].

Τα επίπεδα της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στον ορό είναι υψηλότερα στο νεογέννητο και μειώνονται εκθετικά σε όλη τη ζωή. Οι συνέπειες της πώσης στον ορό της

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ της μειωμένης εντερικής απορρόφησης ασβεστίου με αυξημένη συχνότητα εμφάνισης της οστεοπόρωσης είναι επί του παρόντος ασαφείς, αν και υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτές σχετίζονται με ένα σημαντικό παράγοντα κινδύνου για κάταγμα σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση [9].

2.5 Ρύθμιση της σύνθεσης των ενεργών μεταβολιτών της D_3

Η ενεργοποίηση του αναδραστικού ελέγχου της βιτ. D γίνεται μέσω της ρύθμισης της νεφρικής δραστικότητας της 1-υδροξυλάσης και της 24-υδροξυλάσης. Η $25(\text{OH})\text{D}_3$ κατά προτίμηση κατευθύνεται προς τον ενεργό μεταβολίτη της την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ όταν υπάρχει έλλειψη ασβεστίου, φωσφορικών ή και της ίδιας της βιτ. D. Η μείωση ασβεστίου οδηγεί σε αντισταθμιστικούς μηχανισμούς έκκρισης της PTH. Η ορμόνη αυτή διεγείρει την 1-υδροξυλίωση. Το χαμηλό επίπεδο φωσφορικών στο πλάσμα και στους νεφρούς αυξάνει επίσης τη δραστικότητα της 1-υδροξυλάσης. Εξάλλου η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ είναι αναδραστικός αναστολέας της δικής της σύνθεσης. Ως εκ τούτου σε περίπτωση έλλειψης βιτ. D συντελείται αντισταθμιστική αύξηση της 1-υδροξυλάσης. Αντίθετα η δραστικότητα της 24-υδροξυλάσης διεγείρεται από φυσιολογικές έως μέτριες αυξήσεις των συγκεντρώσεων ασβεστίου ή φωσφορικών και από την ίδια την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Το καθαρό αποτέλεσμα της ρύθμισης αυτής είναι η αύξηση της παροχής ενεργού $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και η μείωση της παροχής αδρανούς $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ κάθε φορά που η ομοιόσταση απαιτεί αυξημένη απορρόφηση ασβεστίου και φωσφορικών από τροφικές πηγές ή από αποθήκες του σκελετού. Η παραγωγή της 24 υδροξυλάσης επάγεται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ και τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλα-



Εικ. 4. Η δομή του VDR. (Τροποποιημένη από Nature [14]).

στών 23 (FGF23) που σχετίζεται με την ομοιοστασία του φωσφόρου. Φυσιολογικές καταστάσεις όπως η αύξηση ενός οργανισμού, η εγκυμοσύνη, η γαλουχία χαρακτηρίζονται από ορμονικές μεταβολές, αυξημένες απαιτήσεις σε ασβέστιο και συνεπώς επηρεάζουν το μεταβολισμό της βιτ. D [11].

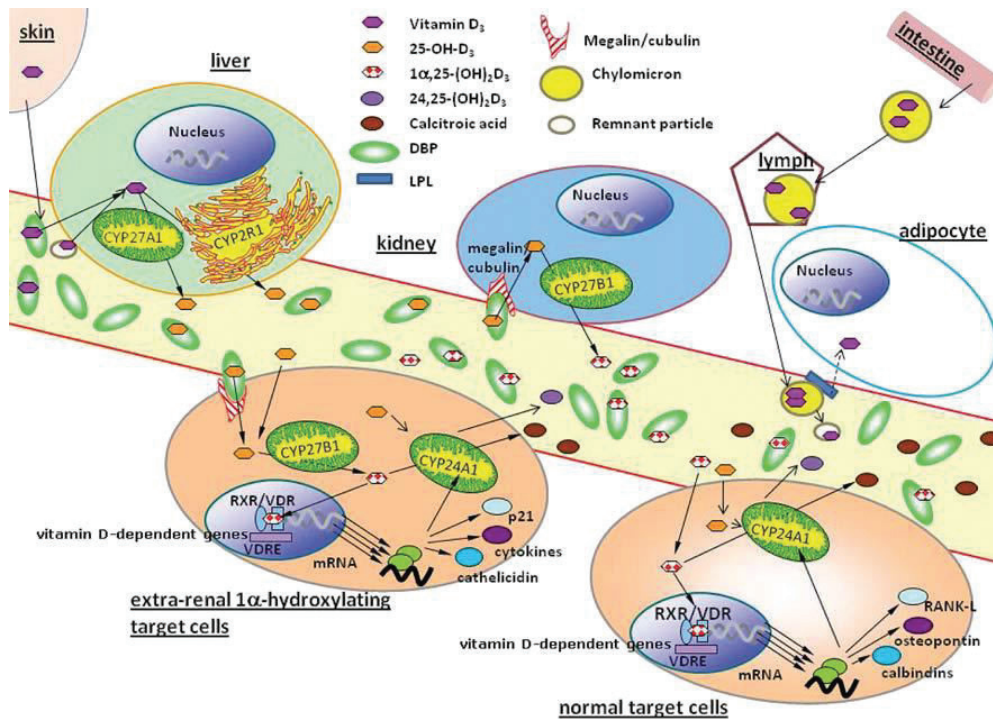
2.6 Η VDBP

Η πρωτεΐνη δέσμευσης της βιταμίνης D (VDBP) είναι μια 58 kDa άλφασφαιρίνη που παράγεται κυρίως από το ήπαρ. Είναι μια πολυλειτουργική πρωτεΐνη που βρίσκεται στο πλάσμα, ασκитικό υγρό, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και στην επιφάνεια πολλών τύπων κυττάρων. Δεσμεύει τη βιταμίνη D και τους μεταβολίτες της στο πλάσμα και τους μεταφέρει σε ιστούς-στόχους. Ενώ αρχικά ήταν γνωστή ως Gc-σφαιρίνη, έχει μετονομαστεί για την ικανότητά της να δεσμεύει την συντριπτική πλειοψηφία (>85%) της κυκλοφορούσας 25(OH)D. Είναι ένα μέλος της ίδιας οικογένειας πρωτεϊνών με την αλβουμίνη και παράγεται σε σχετικά σταθερά επίπεδα σε όλη τη ζωή, αν και υψηλά οιστρογόνα όπως π.χ. στην εγκυμοσύνη, μπορεί να προωθήσουν την αύξηση της παραγωγής. Ενώ είναι καλύτερα γνωστή για τις ιδιότητες δέσμευσης της βιταμίνης D, μπορεί να έχει ρόλους και σε άλλες βιολογικές διεργασίες. Πρόσθετες δράσεις που αποδίδονται στην VDBP περιλαμβάνουν δέσμευση της εξωκυτταρικής ακτίνης και μεταφορά των λιπαρών οξέων. Φαίνεται επίσης ότι προστατεύει τον παράγοντα συμπληρώματος C5a από πρωτεολυτική αποικοδόμηση, ενισχύοντας αποτελεσματικά τη δράση της ως χημειοτακτικής πρωτεΐνης. Με βάση τα χαρακτηριστικά αυτής της δέσμευσης και τις πιθανές συνέπειές της στην οστική απορρόφηση, έχει δημιουργηθεί μεγάλο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα, γύρω από τις πιθανές δράσεις της VDBP στον μεταβολισμό των οστών και την υγεία. Τροφοδότηση αυτού του ενδιαφέροντος έδωσε η ανακάλυψη σημαντικών ατομικών διαφορών

στα επίπεδα VDBP. Νεότερα δεδομένα επισημαίνουν συσχετίσεις μεταξύ των διαφορών στις τιμές VDBP και της πυκνότητας των οστών. Ενώ ορισμένες ατομικές διαφορές μπορεί να εξηγηθούν με βάση τα κλινικά χαρακτηριστικά, μια μέτρια διακύμανση τόσο σε επίπεδα όσο και σε δράση φαίνεται να οδηγείται από γενετικούς πολυμορφισμούς [12].

2.6.1 VDBP και βιοδιαθεσιμότητα βιταμίνης D

Το μεγαλύτερο ποσοστό των 25(OH)D και 1,25(OH)₂D κυκλοφορεί σε μεγάλο μέρος δεσμευμένο στην VDBP (85-90%). Ένα μικρότερο κλάσμα δεσμεύεται ασθενώς με αλβουμίνη, ενώ λιγότερο από 1% κυκλοφορεί σε ελεύθερη μορφή. Μελέτες σε ζώα δείχνουν ότι η VDBP χρησιμεύει για την προστασία της 25(OH)D από την αποικοδόμηση, παρατείνοντας την ημίσεια ζωής της και προφυλάσσοντας τον οργανισμό από την ανεπάρκειά της. Εκτός από την διατήρηση σταθερών συγκεντρώσεων βιταμίνης D, η VDBP φαίνεται ότι επιβραδύνει τη δράση της βιταμίνης D στο έντερο και μειώνει την πρόσληψη από το ήπαρ. Επιπροσθέτως, άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η VDBP μειώνει τη δράση της βιταμίνης D σε ιστούς στόχους όπως τα μονοκύτταρα και τα κερατινοκύτταρα. Τα ευρήματα αυτά έχουν υποστηρίξει την εφαρμογή της υπόθεσης της ελεύθερης ορμόνης για τη βιταμίνη D. Αυτό το μοντέλο προϋποθέτει ότι μόνο οι ορμόνες που δεν είναι συνδεδεμένες με τις πρωτεΐνες φορείς είναι ελεύθερες να εισέλθουν στα κύτταρα και να προκαλέσουν βιολογικές δράσεις. Οι αντιπαραθέσεις για την ερμηνεία των επιπέδων VDBP παραμένουν. Οι δοκιμασίες δεν είναι τυποποιημένες και μπορεί να δώσουν διαφορετικά αποτελέσματα, είτε λόγω διαφορετικού ποσοστού δέσμευσης σε διαφορετικές ισομορφές VDBP είτε λόγω μη ειδικότητας του προσδιορισμού. Ενώ οι περισσότερες μελέτες για την ελεύθερη ή βιοδιαθέσιμη βιταμίνη D έχουν στηριχθεί στις υπολογισμένες τιμές που βασίζονται σε συντελεστές, πιο



Εικ. 5. Μεταβολισμός, μεταφορά και αποθήκευση της βιταμίνης D. (Τροποποιημένη από BRANNON 2012 [15]).

ακριβείς μέθοδοι για την αξιολόγηση της VDBP αναπτύσσονται. Παρά τα υψηλότερα επίπεδα VDBP κατά την εγκυμοσύνη, ωστόσο, η μετρούμενη ελεύθερη 25(OH)D δεν διέφερε σε έγκυες γυναίκες. Επιπλέον δοκιμασίες για την άμεση αξιολόγηση της ελεύθερης και της βιοδιαθέσιμης βιταμίνης D είναι υπό ανάπτυξη και στο μέλλον θα απαιτηθεί επιπλέον επικύρωση και σύγκριση με τα κλινικά αποτελέσματα για τον προσδιορισμό της βέλτιστης δοκιμασίας [12].

2.7 Μηχανισμός δράσης της βιταμίνης D

Η ενεργός μορφή της βιτ. D δρα μέσω ενός γενικού μηχανισμού, κοινού για όλες τις στεροειδείς ορμόνες. Η ορμόνη εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων στόχων μέσω διάχυσης και συνδέεται στον πυρήνα με έναν πυρηνικό υποδοχέα **VDR (Vitamin D Receptor)**. Ο VDR είναι μέλος της οικογένειας των θυρεοειδικών-βιταμίνης D-ρετινοειδικών υποδοχέων. Αποτελείται από ένα τμήμα που συνδέεται με το DNA (DNA binding-domain-C) και από ένα τμήμα που δεσμεύει το συνδέτη (ligand binding-domain-E) καθώς και από άλλα τμήματα A/B, D, F (Εικόνα 4). Οι πυρηνικοί υποδοχείς συνήθως ενεργούν ως παράγοντες μεταγραφής και επάγουν ή καταστέλλουν τη μεταγραφή ορισμένων γονιδίων-στόχων. Ο VDR εκφράζεται σε κλασικά όργανα στόχους (έντερο, οστά, νεφροί, παραθυρεοειδείς) και σε όργανα που δεν εμπλέκονται στην ομοίωση του ασβεστίου. Στην περίπτωση του VDR, η 1,25(OH)₂D₃ συνδέεται με τον υποδοχέα. Η σύνδεση αυτή προκαλεί φωσφορυλίωση του υποδοχέα

και μεταβολές στη διαμόρφωσή του. Στη συνέχεια ο VDR ετεροδιμερίζεται με μία ή περισσότερες ισομορφές του υποδοχέα του ρετινοϊκού X (Retinoid X Receptor-RXR). Από την στερεοειδική αυτή σύνδεση σχηματίζεται ετεροδιμερές σύμπλοκο VDR-RXR που δρα στους VDRE (Vitamin D Response Elements) υποδοχείς των γονιδίων στόχων ξεκινώντας διεργασίες μεταγραφής. Τελικό αποτέλεσμα της δράσης της βιτ. είναι η επαγωγή ή ο περιορισμός της σύνθεσης πρωτεϊνών στα γονίδια στόχους [13].

2.8 Ρύθμιση του μεταβολισμού του ασβεστίου και του φωσφόρου από τη βιταμίνη D

Οι κλασικές δράσεις της 1,25(OH)₂D₃ αφορούν ρύθμιση του ασβεστίου και του φωσφόρου σε τρεις ιστούς στόχους: **οστό, έντερο και νεφρό**. Ωστόσο, ο υποδοχέας για την 1,25(OH)₂D₃ (VDR) είναι ευρέως διαδεδομένος και δεν περιορίζεται σε αυτούς τους κλασικούς ιστούς στόχους. Ο κατάλογος των ιστών που δεν περιέχουν τον VDR είναι πιθανώς μικρότερος από τον κατάλογο των ιστών που περιέχουν τον VDR. Ένας αριθμός αυτών των ιστών εκφράζουν CYP27B1 και ως εκ τούτου, μπορούν να ρυθμίσουν την τοπική παραγωγή της 1,25(OH)₂D₃.

Η βιολογική σημασία αυτών των παρατηρήσεων βρίσκεται στο μεγάλο αριθμό των μη κλασικών δράσεων της βιταμίνης D συμπεριλαμβανομένων των επιπτώσεων στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, στη ρύθμιση της έκκρισης ορμονών, και στην ανοσοποιητική διαφοροποίηση.

Τουλάχιστον για τις κλασσικές δράσεις της βιταμίνης D, η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ δρα σε συνεργασία με δύο πεπτιδικές ορμόνες, **PTH** (παραθορμόνη) και **FGF-23**. Η PTH είναι ο κύριος διεγέρτης της παραγωγής της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στο νεφρό. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ με τη σειρά της καταστέλλει την παραγωγή της παραθορμόνης άμεσα με ένα μεταγραφικό μηχανισμό και έμμεσα με την αύξηση των επιπέδων ασβεστίου στον ορό. Το ασβέστιο δρα μέσω του υποδοχέα ασβεστίου (CasR) στον παραθυρεοειδή αδένα για να καταστείλει την απελευθέρωση της παραθορμόνης. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ αυξάνει τα επίπεδα του CasR του παραθυρεοειδούς αδένα ακριβώς όπως το ασβέστιο αυξάνει τον υποδοχέα (VDR) της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στον παραθυρεοειδή αδένα, ενισχύοντας περαιτέρω την αρνητική επίδραση του ασβεστίου και της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ σχετικά με την έκκριση της PTH. Ο FGF-23, από την άλλη πλευρά, αναστέλλει την παραγωγή $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ από τους νεφρούς, αυξάνοντας παράλληλα την έκφραση του CYP24, ενώ η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ διεγείρει την παραγωγή του FGF-23. Ο διαιτητικός φωσφόρος ρυθμίζει τα επίπεδα του FGF-23. Ο FGF-23 εκφράζεται σε έναν αριθμό από ιστούς συμπεριλαμβανομένου του παραθυρεοειδούς αδένα, αλλά η μεγαλύτερή του έκφραση είναι σε οστεοκύτταρα, επενδυματικά κύτταρα των οστών και ενεργούς οστεοβλάστες. Έτσι, κατά την εξέταση των μηχανισμών δράσης της βιταμίνης D και του ενεργού μεταβολίτη της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in vivo, οι ρόλοι της PTH και του FGF-23 πρέπει επίσης να εξετάζονται [16].

2.8.1 Κλασικοί ιστοί στόχοι

2.8.1.1 Οστά

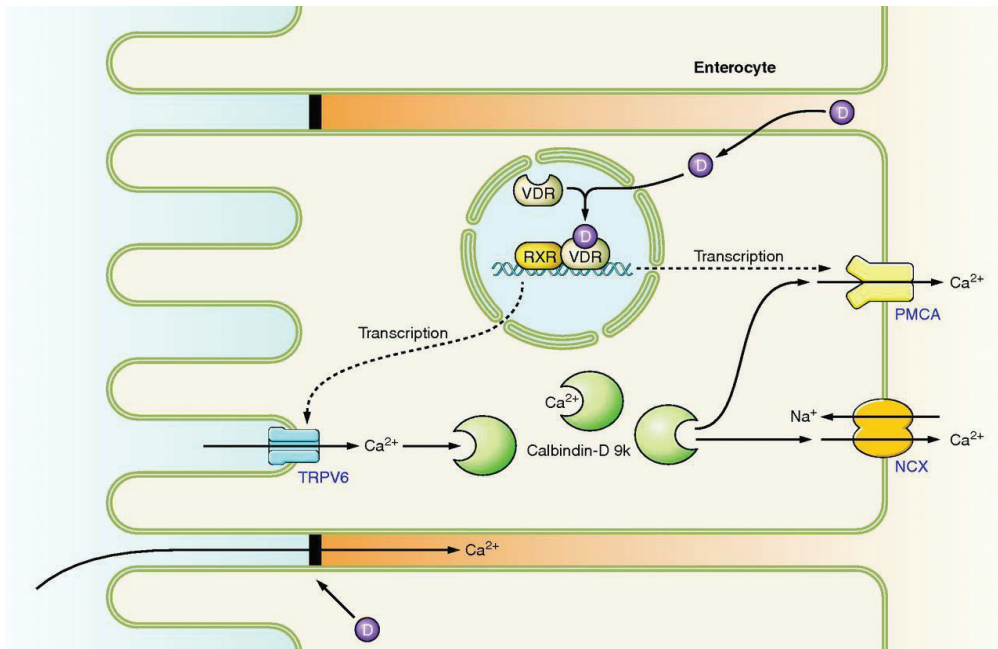
Οι παρατηρήσεις ότι η $25(\text{OH})\text{D}$ του ορού συσχετίζεται με τον όγκο δοκιδωδους ή φλοιώδους οστού έχουν οδηγήσει κάποιους να προτείνουν ότι η $25(\text{OH})\text{D}$ μπορεί να έχει άμεση βιολογική δράση στα κύτταρα των οστών, ωστόσο, μόνο σε επίπεδα $25(\text{OH})\text{D}$ 500 nmol/L ή περισσότερο, μπορεί αυτή η προορμόνη να ενεργοποιήσει τον VDR. Είναι σημαντικό όμως το ότι κάθε ένα από τα κύρια είδη των οστικών κυττάρων, οστεοβλάστες και οστεοκύτταρα, είναι ικανό να μεταβολίζει $25(\text{OH})\text{D}$ σε $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ προκαλώντας βιολογικές δραστηριότητες. Η $25(\text{OH})\text{D}$ μειώνει επίσης τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, διεγείρει την ωρίμανση των οστεοβλαστών και μειώνει την επιμετάλλωση in vitro [17]. Στα οστά επάγει την οστική απορρόφηση. Ασκεί άμεση δράση στα κύτταρα της οστεοβλαστικής σειράς τα οποία εκφράζουν υποδοχείς της ορμόνης. Οι οστεοκλάστες δεν εκφράζουν υποδοχείς της βιτ. D επηρεάζονται έμμεσα, μέσω των οστεοβλαστών. Η βιτ. D τροποποιεί τη σύνθεση τοπικών παραγόντων από τους οστεοβλάστες που επιδρούν παρακρινικά στους οστεοκλάστες προάγοντας την απορρόφηση οστού. Ιδιαίτερη επίδραση φαίνεται να έχει στο σύστημα RANK-L /RANK/OPG καθώς ενεργοποιεί τη σύνθεση RANK-L και καταστέλλει τη σύνθεση της οστεοπροτεγερίνης OPG.

Υπάρχει κάποια απόδειξη ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ μπορεί να έχει άμεσες επιδράσεις επί του σχηματισμού του οστού. Ο VDR εκφράζεται σε οστεοβλάστες, οστεοκλάστες, και χονδροκύτταρα. Οι περισσότερες από τις άμεσες επιδράσεις της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ πιστεύεται πως μεσολαβούνται από τους οστεοβλάστες. Έχει δειχθεί ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ προάγει τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών από μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα και ότι ρυθμίζει την σύνθεση διαφόρων πρωτεϊνών, όπως οστεοκαλσίνη, αλκαλική φωσφατάση, κολλαγόνο τύπου I, οστεοποντίνη και RANKL [18].

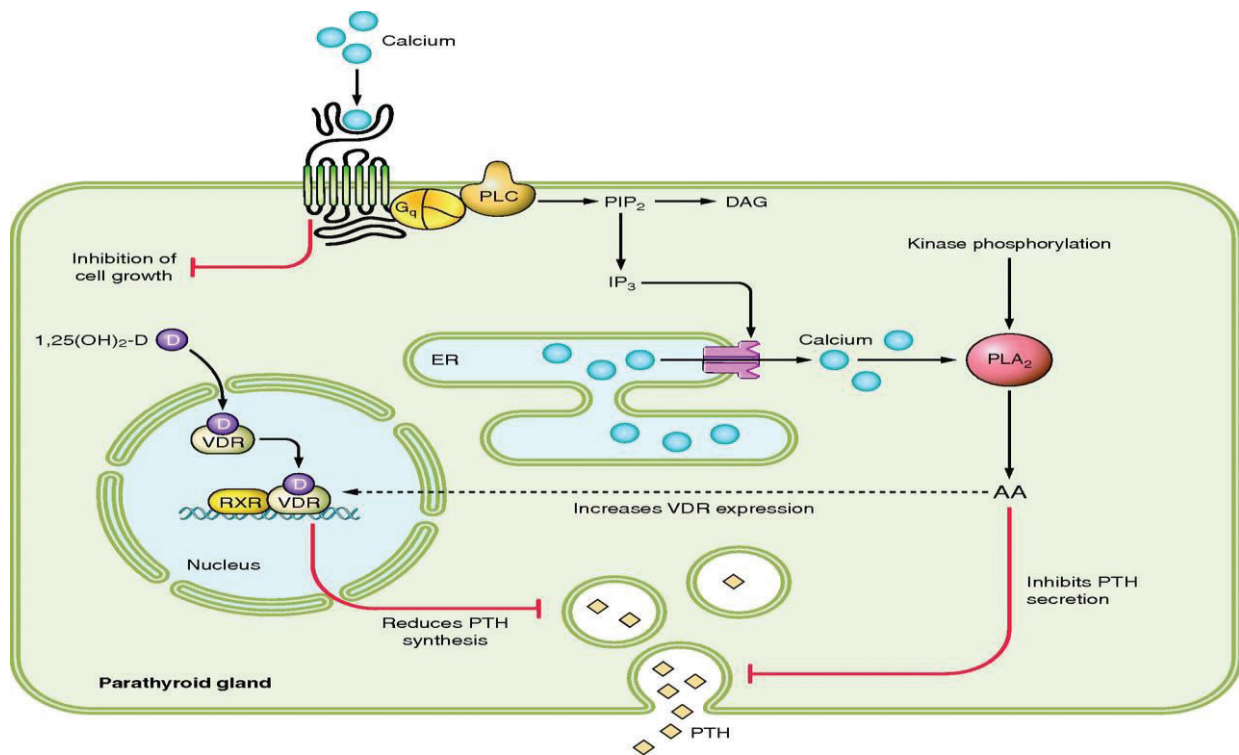
Σε γενικές γραμμές, ωστόσο, οι επιδράσεις της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ στην ωρίμανση των οστεοβλαστών και την πρωτεϊνική σύνθεση είναι πλειοτροπικές και εξαρτώνται από τη διάρκεια της έκθεσης και του σταδίου διαφοροποίησης κατά το οποίο η οστεοβλάστη εκτίθεται [8].

2.8.1.2 Έντερο

Το έντερο είναι μία από τις κύριες θέσεις στόχους της $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Κύρια δράση της είναι η διέγερση της απορρόφησης Ca από τον αυλό του εντέρου αντίθετα προς την κλίση συγκέντρωσης. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ βρίσκεται στους πυρήνες των λαχνών του εντέρου και των κυττάρων των κρυπών όπου δρα πάνω στην ψηκτροειδή παρυφή. Η εντερική απορρόφηση αυξάνεται ως απόκριση στην ελάττωση πρόσληψης του ασβεστίου από την τροφή. Ο ενεργός μεταβολίτης $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ διεγείρει την ενεργό μεταφορά ασβεστίου διαμέσω του εντερικού τοιχώματος. Ο ενεργός μεταβολίτης δεσμεύεται στον υποδοχέα της βιτ. D στο εντερικό επιθηλιακό κύτταρο, ακολούθως σχηματίζεται η ασβεστιοδεσμευτική πρωτεΐνη CaBP-9K και ενεργοποιούνται τα κανάλια ασβεστίου TRPV6 και TRPV5. Το ασβέστιο μπορεί να εισέλθει στα κύτταρα από τον εντερικό αυλό και μεταφέρεται μέσω των κυττάρων με την ασβεστιοδεσμευτική πρωτεΐνη και φτάνει στο διάμεσο χώρο με ένα μηχανισμό που απαιτεί ATP (Εικόνα 6). Αυτός ο μηχανισμός ενεργούς μεταφοράς έχει ένα μέγιστο. Εκτός από αυτόν τον τρόπο, παρακυτταρική μεταφορά λαμβάνει χώρα με διάχυση. Η παρακυτταρική μεταφορά εξαρτάται από την κλίση του ασβεστίου. Σε περίπτωση έλλειψης βιτ. D η ενεργός μεταφορά είναι χαμηλότερη και η διάχυση καθίσταται πιο σημαντική ιδιαίτερα όταν η πρόσληψη ασβεστίου είναι υψηλή [19]. Επίσης η εντερική απορρόφηση του P ρυθμίζεται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Με την αύξηση της ποσότητας του ασβεστίου που απορροφάται, η $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ αυξάνει άμεσα τα επίπεδα ασβεστίου στον ορό. Αυτό αντιπροσωπεύει έναν από τους τελικούς συνδέσμους στη ρυθμιστική αλυσίδα της ομοίωσης ασβεστίου η οποία αρχίζει με ανίχνευση χαμηλών επιπέδων ασβεστίου από τον παραθυρεοειδή αδένα και τελειώνει με αυξημένη σύνθεση της $1,25$ βιταμίνης D από τα νεφρά. Η σημασία της $1,25$ -βιταμίνης D για την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου απεικονίζεται από ασθενείς με ανεπάρκεια αυτής, οι οποίοι απορροφούν έως και 80% λι-



Εικ. 6. Διακυτταρική και παρακυτταρική απορρόφηση ασβεστίου στο έντερο. (Τροποποιημένη από Koric, 2013 [8]).



Εικ. 7. Η δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ στο παραθυρεοειδικό κύτταρο. (Τροποποιημένη από Koric, 2013 [8]).

γότερο ασβέστιο από το γεύμα τους σε σύγκριση με υγιή άτομα. Μία από τις πιο ενδεικτικές παρατηρήσεις έχουν γίνει σε ζώα με απάλειψη VDR. Απώλεια του VDR συσχετίζεται με μαζικά μειωμένη ικανότητα απορρόφησης του ασβεστίου του εντέρου με

αποτέλεσμα χαμηλά επίπεδα ασβεστίου στο πλάσμα και υπερπαραθυρεοειδισμό. Εν κατακλείδι, είναι αναμφισβήτητο ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ και ο υποδοχέας της είναι οι κύριοι ρυθμιστές της εντερικής απορρόφησης του ασβεστίου [8].

2.8.1.3 Νεφρός

Ιστό στόχο αποτελεί και ο νεφρός. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, ενισχύει τη δράση της PTH στη μεταφορά ασβεστίου στο άπω σωληνάριο, διεγείρει επίσης τη σύνθεση της καλβιδίνης. Ένας κορυφαίος δίαυλος ασβεστίου, TRPV5, ο οποίος συνεντοπίζεται με την καλβιδίνη και επάγεται από την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ έχει εντοπιστεί στο άπω σωληνάριο. Έτσι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, επηρεάζει τη μεταφορά ασβεστίου στο άπω σωληνάριο ενισχύοντας την δράση της PTH και επάγοντας TRPV5 και καλβιδίνη. Ένα άλλο σημαντικό αποτέλεσμα της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ στο νεφρό είναι η αναστολή του ενζύμου 1-α-υδροξυλάση (CYP27B1) και η επαγωγή του ενζύμου 24-υδροξυλάση (CYP24). Εκτός από τη μεταφορά του ασβεστίου στο άπω νεφρώνα και τη διαμόρφωση της $25(\text{OH})\text{D}$ υδροξυλάσης, έχει προταθεί η δράση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ επί της επαναπορρόφησης φωσφορικού στο εγγύτατο σωληνάριο. Η βιταμίνη D αυξάνει ή μειώνει τη νεφρική επαναρρόφηση φωσφορικού ανάλογα με την κατάσταση του παραθυρεοειδούς [16].

Ο FGF-23 αναστέλλει τη νεφρική επαναρρόφηση φωσφόρου, αναστέλλει τη νεφρική 1α-υδροξυλάση, και αυξάνει την δραστηριότητα 24-υδροξυλάσης (CYP24). Ο FGF-23 αυξάνεται καθώς μειώνεται η νεφρική λειτουργία. Η ανεπάρκεια της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ μπορεί να προκληθεί από FGF-23, καθώς ο FGF-23 αρχίζει να αυξάνεται ήδη στο CKD_3 [20].

2.8.1.4 Παραθυρεοειδείς αδένες

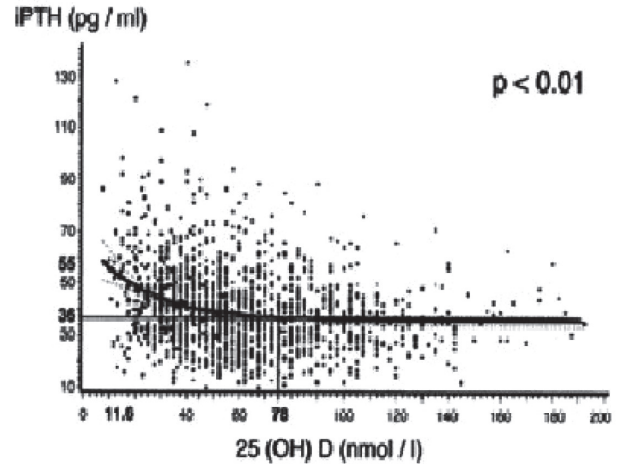
Το ασβέστιο συνδέεται στην μεμβράνη των παραθυρεοειδικών κυττάρων και δεσμεύεται με τον CaSR καταστέλλοντας την έκκριση της PTH. Ο ενεργός μεταβολίτης $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ δεσμευμένος με τον πυρηνικό υποδοχέα VDR επίσης καταστέλλει την PTH. Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ αυξάνει το ασβέστιο στον ορό μέσω της αύξησης της απορρόφησης αυτού από το έντερο και οι αυξημένες συγκεντρώσεις ασβεστίου καταστέλλουν την PTH (Εικόνα 7).

Σε κλινικές δοκιμές συχνά ανευρίσκεται μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ $25(\text{OH})\text{D}$ και PTH (Εικόνα 8). Αυτό υποδεικνύει ένα αρνητικό μηχανισμό αλληλο-ρύθμισης της $25(\text{OH})\text{D}$ στο παραθυρεοειδικό κύτταρο. Αυτό μπορεί να είναι πιθανό εάν η $25(\text{OH})\text{D}$ υδροξυλιώνεται περαιτέρω στο παραθυρεοειδικό κύτταρο σε $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Η 1-α υδροξυλάση έχει περιγραφεί σε πολλά είδη κυττάρων και πιθανόν να παρουσιάζεται και στον παραθυρεοειδή. Αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει την αρνητική συσχέτιση μεταξύ $25(\text{OH})\text{D}$ και PTH [19].

2.9 Εξωσκελετικές δράσεις της βιταμίνης D

2.9.1 Βιταμίνη D και καρδιαγγειακή νόσος

Η επίδραση της βιταμίνης D στην αρτηριακή πίεση θα μπορούσε να είναι ένας από τους πιθανούς μηχανισμούς που διέπουν το σύνδεσμο μεταξύ της βιταμίνης D και των καρδιαγγειακών παθήσεων. Το ένζυμο 1α-υδροξυλάση εκφράζεται σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού



Εικ. 8. Η συσχέτιση $25(\text{OH})\text{D}$ και PTH. (Τροποποιημένη από Chapuy, 1997 [21]).

τοιχώματος τα οποία έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη γένεση της υπέρτασης.

Μελέτες in vitro αλλά και μελέτες σε ζώα έδειξαν ότι η βιταμίνη D φαίνεται να έχει αντιυπερτασική και αγγειοπροστατευτική επίδραση μέσω πολλαπλών μονοπατιών.

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι μία πρόιμη αγγειακή παθολογία που χαρακτηρίζεται από μεταβολές στις ιδιότητες του ενδοθηλίου που οδηγούν σε μειωμένη αγγειοδιαστολή και τη δημιουργία μιας προφλεγμονώδους και προθρομβωτικής κατάστασης. Η ενδοθηλιακή λειτουργία διαδραματίζει ρόλο σημαντικό στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης καθώς και την αύξηση της αρτηριακής ακαμψίας. Υπάρχουν πολλοί πιθανοί μηχανισμοί που μεσολαβούν στην επίδραση της βιταμίνης D στην ενδοθηλιακή λειτουργία. Η βιταμίνη D μπορεί να βελτιώσει την ενδοθηλιακή λειτουργία έμμεσα μέσω της μείωσης της VDBP, η οποία μπορεί με τη σειρά της να οφείλεται σε καταστολή του συστήματος ρενίνης-αγγειοστασίνης ή/και σε μείωση της αγγειακής αντίστασής του. Ο αγγειακός λείος μυς και τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκφράζουν VDR, καθώς και 1-υδροξυλάση, επιτρέποντας την αυτοκρινή παραγωγή της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, η οποία μπορεί να ενεργεί σε τοπικό επίπεδο για να διαμορφώνει τις επιδράσεις των φλεγμονωδών κυτοκινών στο αγγειακό σύστημα. Τέτοιες είναι η μείωση των ενδοθηλιακών μορίων προσκόλλησης, η αύξηση της παραγωγής νιτρικού οξειδίου καθώς και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί που συνδέουν την βιταμίνη D με την υγεία των αγγείων περιλαμβάνουν τη μείωση του οξειδωτικού στρες, την εξασθένηση του NP-κΒ, καθώς και τη μείωση της PTH. Η ανεπάρκεια βιταμίνης D επίσης σχετίζεται με υψηλότερες συγκεντρώσεις της μεταλλο-πρωτεΐνης-9 που ελέγχει την αγγειακή αναδιαμόρφωση του αγγειακού τοιχώματος [22].

2.9.2 Βιταμίνη D και λειτουργία του ανοσοποιητικού

Υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις για ένα κεντρικό ρόλο της βιταμίνης D στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η καλσιτριόλη είναι σε θέση να επάγει την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων. Επιπλέον, αυξάνει τη δραστηριότητα των μακροφάγων και διευκολύνει την κυτταροτοξική δράση τους. Τα μακροφάγα αποτελούν την πρώτη μη ειδική γραμμή άμυνας του ανοσοποιητικού συστήματος. Είναι καλά γνωστό, ότι η επικράτηση λοιμώξεων όπως η πνευμονία είναι συχνή σε βρέφη με ραχίτιδα. Η χρήση της βιταμίνης D (ή μουρουνέλαιο) για τη θεραπεία των λοιμώξεων έχουν εφαρμοστεί για πάνω από 150 χρόνια. Οι ασθενείς με φυματίωση έχουν γενικά χαμηλότερες τιμές 25(OH)D σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες. Διάφορες μελέτες υποστηρίζουν επίσης τον προληπτικό ρόλο της βιταμίνης D στον τομέα της γρίπης. Δεδομένου ότι η βιταμίνη D είναι ένας ρυθμιστής κλειδί διαφόρων κυτταρικών μεταβολικών οδών, είναι σημαντική για την κυτταρική ωρίμανση, διαφοροποίηση και απόπτωση.

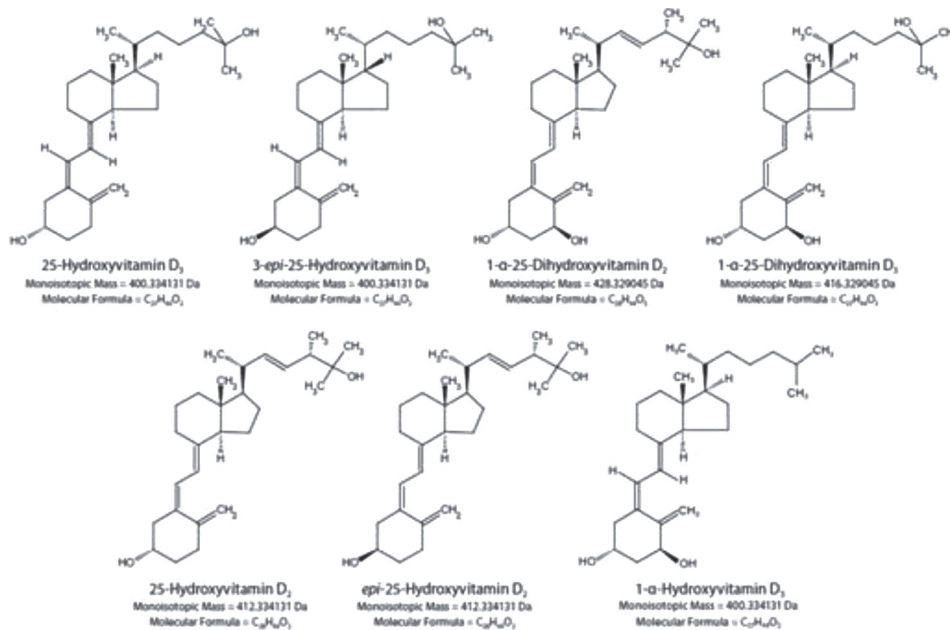
Υπάρχει μια αυξημένη συχνότητα εμφάνισης αυτοάνοσων ασθενειών όπως ο διαβήτης τύπου 1, η σκλήρυνση κατά πλάκας (MS) και η νόσος του Crohn σε γεωγραφικές περιοχές με υψηλότερο γεωγραφικό πλάτος. Αυτό το φαινόμενο πιθανόν να σχετίζεται με τη μείωση της 25(OH)D εξαιτίας της μειωμένης υπεριώδους ηλιακής ακτινοβολίας. Μελέτες παρατήρησης αλλά όχι παρέμβασης, περιγράφουν μείωση της συχνότητας εμφάνισης της MS με αύξηση των επιπέδων 25(OH)D. Η χορήγηση βιταμίνης D μειώνει τον κίνδυνο ανάπτυξης σκλήρυνσης στις γυναίκες και διαβήτη τύπου 1 στα παιδιά κατά 80%. Τα μακροφάγα όπως και τα T κύτταρα εκφράζουν τόσο 1α-υδροξυλάση όσο και VDR, και έτσι είναι άμεσοι στόχοι της 1,25(OH)₂D [23]. Σε γενετικό επίπεδο, συγκεκριμένοι απλότυποι γονιδίου VDR φαίνεται να προστατεύουν έναντι του διαβήτη και πολυμορφισμοί στο γονίδιο CYP27B1 έχει επίσης αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την προδιάθεση για διαβήτη [24]. Μελέτες *in vitro* αλλά και *in vivo* δείχνουν ότι η βιταμίνη D μπορεί να αποτρέψει την καταστροφή των παγκρεατικών βήτα-κυττάρων και να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης του αυτοάνοσου διαβήτη σε παιδιά. Αυτό μπορεί, τουλάχιστον εν μέρει, να οφείλεται σε καταστολή των προφλεγμονωδών κυτοκινών όπως ο παράγοντας νέκρωσης όγκων (TNF)-α. Το 2007 οι Pittas και συν. πραγματοποίησαν μια συστηματική ανασκόπηση και μετανάλυση για μελέτες παρατήρησης και κλινικές μελέτες σε ενήλικες με αποτελέσματα που σχετίζονται με την ομοιόσταση της γλυκόζης στο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Οι μελέτες παρατήρησης έδειξαν μία σχετικά σταθερή συσχέτιση μεταξύ χαμηλής βιταμίνης D και διαβήτη τύπου 2. Η κατάσταση της βιταμίνης D κατά τη διάρκεια της περιόδου της πρόωρης ζωής είναι σημαντική για την αιτιοπαθογένεια της νόσου. Η δραστηριότητα της νόσου δείχνει αντίστροφες διακυμάνσεις, ανάλογα με την εποχή και τα επίπεδα της βιτ. D [25].

Υπάρχουν αυξανόμενα επιδημιολογικά στοιχεία που συνδέουν την έλλειψη της βιταμίνης D με αυτοάνοσες ασθένειες, συμπεριλαμβανομένων της σκλήρυνσης κατά πλάκας (MS), τη ρευματοειδή αρθρίτιδα (RA), το σακχαρώδη διαβήτη (DM), την ασθένεια φλεγμονώδους εντέρου και τον συστηματικό ερυθηματώδη λύκο (SLE). Τα παιδιά γυναικών με χαμηλότερη πρόσληψη βιταμίνης D κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης, είναι υποψήφια για μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης αυτοάνοσων και στατιστικά αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης παγκρεατικής αυτοάνοσας. Η βιταμίνη D έχει πολυάριθμα αποτελέσματα επί των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων B και μπλοκάρει τη διαφοροποίηση των B κυττάρων και την έκκριση ανοσοσφαιρίνης [26]. Ο ρόλος του VDR στο ενδοκρινικό σύστημα και η παρουσία και η λειτουργία του σε πάνω από 30 ιστούς και όργανα έχει εξεταστεί. Έχει δείχθει ότι εμπλέκεται στην σηματοδότηση του ινσουλίνο αυξητικού παράγοντα (IGF), στη φλεγμονή και στην ενεργοποίηση και ρύθμιση της βιταμίνης D και του ασβεστίου. Η συμμετοχή του VDR σε πολλαπλά μονοπάτια και σημεία σύγκλισης εντός αυτών των οδών υποδεικνύει την πιθανή σημασία του VDR στην αιτιολογία του καρκίνου [27].

Μυαλγίες είναι γενικά η πρώτη εκδήλωση της ανεπάρκειας της βιταμίνης D. Σοβαρή ανεπάρκεια βιταμίνης D με αντίστοιχες αυξήσεις της PTH αναφέρθηκαν σε ποσοστό 88% των γυναικών και παρουσιάζονται με μυϊκούς πόνους και αδυναμία. Τα συμπληρώματα βιταμίνης D μειώνουν τον κίνδυνο των πτώσεων, πιθανότατα λόγω της βελτιωμένης λειτουργίας των μυών και την αύξηση της δύναμης. Η μυαλγία, το πιο κοινό ενόχλημα που αναφέρθηκε από ασθενείς που λαμβάνουν θεραπεία με στατίνες, μπορεί να είναι τουλάχιστον εν μέρει προκαλούμενη από την υποκείμενη ανεπάρκεια βιταμίνης D [28].

Οι συγκεντρώσεις του TNFα ή της CRP στον ορό συσχετίζονται αντίστροφα με τις συγκεντρώσεις 25(OH)D. Ως εκ τούτου, η φλεγμονή πιθανολογείται ως ο κοινός παρονομαστής μεταξύ των περισσότερων μη σκελετικών δυσλειτουργιών και της χαμηλής 25(OH)D. Επίσης χαμηλή 25(OH)D παρατηρείται σε άτομα με καταθλιπτικά συμπτώματα [29].

Μερικοί έχουν προτείνει ότι η εποχικότητα των λοιμώξεων του αναπνευστικού είναι συνδεδεμένη με τη χειμερινή υποβιταμίνωση D. Η ανεπάρκεια βιτ. D έχει κατηγορηθεί ως μία από τις αιτίες της αυξημένης συχνότητας του άσθματος τις τελευταίες δεκαετίες. Η βιταμίνη έχει πολύπλοκες επιπτώσεις στη βιολογία των πνευμονικών κυττάρων και στην ανοσία με επίπτωση στην φλεγμονή, την άμυνα του ξενιστή, την επούλωση πληγών, την επιδιόρθωση και άλλες διαδικασίες. Βρέθηκε ότι οι VDR παραλλαγές σχετίζονται με το άσθμα σε ομάδες ασθενών [30]. Τα επίπεδα της βιταμίνης D έχουν ενοχοποιηθεί ως παράγοντας κινδύνου στην ανάπτυξη PA. Η έλλειψη ή ανεπάρκεια είναι πιο κοινή σε ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες και



Εικ. 9. Η χημική δομή των μεταβολιτών της βιταμίνης D [33].

μπορεί να είναι από τις αιτίες οδηγούν στην ανάπτυξη ή επιδείνωση της νόσου [31].

2.9.3 Βιταμίνη D και καρκίνος

Η βιταμίνη D συνδέεται επίσης με την ανάπτυξη νεοπλασίας. Ανώτερα επίπεδα συνδέονται με χαμηλότερο κίνδυνο αδενώματος του παχέος εντέρου. Μελέτες απέδειξαν ότι η έλλειψη βιταμίνης D σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο καρκίνου του παχέος εντέρου, του μαστού και του καρκίνου του προστάτη. Επιπλέον, αυξημένη έκθεση σε ηλιοφάνεια συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο non Hodgkin λεμφώματος. Οι VDR πολυμορφισμοί σχετίζονται με αδενοκαρκίνωμα σε κόλον, ωθήκη, μαστό, προστάτη, νεφρικό καρκίνωμα και μελάνωμα. Σε σχέση με το ήπαρ, μια ποικιλία πολυμορφισμών VDR συνδέεται με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Ωστόσο, παραμένει ασαφές, αν η ανεπάρκεια βιταμίνης D σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο HCC [23].

2.9.4 Βιταμίνη D και χρόνια ηπατική νόσος

Το ήπαρ είναι ένα κεντρικό όργανο στη σύνθεση της βιταμίνης D. Είναι η τοποθεσία όπου λαμβάνει χώρα η 25-υδροξυλίωση και όπου συντίθεται η συντριπτική πλειοψηφία της VDBP. Σε άτομα με χρόνια ηπατική νόσο η επικράτηση της ανεπάρκεια βιταμίνης D (<75 nmol/L) είναι σχεδόν καθολική ενώ η έλλειψη βιταμίνης D (<50 nmol/L) ανευρίσκεται περίπου στα δύο τρίτα των ασθενών. Σε ασθενείς με κίρρωση, η επικράτηση της σοβαρής έλλειψης βιταμίνης D (<25 nmol/L) αυξάνει με την αύξηση της συνθετικής ηπατικής δυσλειτουργίας. Αρκετές μελέτες in vitro

δείχνουν ότι η βιταμίνη D αναστέλλει την αντιγραφή του ιού της ηπατίτιδας C (HCV) με έναν δοσοεξαρτώμενο τρόπο [23].

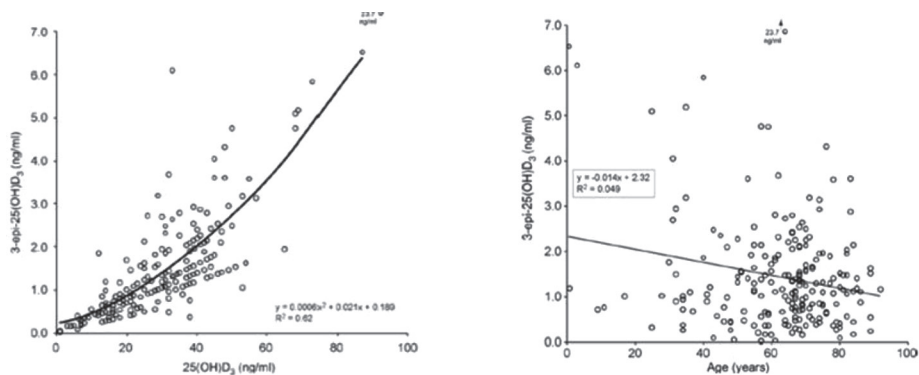
2.9.5 Βιταμίνη D, πτώσεις και καταγματικός κίνδυνος

Τα κατάγματα εξαιτίας πτώσης συνδέονται με υψηλότερη νοσηρότητα και θνησιμότητα και ιδιαίτερα σημαντικό οικονομικό κόστος. Δεδομένα που συγκεντρώθηκαν από την αρχική δημοσίευση των Charuy et al. (1992) σχετικά με τα αποτελέσματα της χορήγησης συμπληρωμάτων βιταμίνης D έδειξαν μείωση των πτώσεων και των ποσοστών οστικών καταγμάτων. Κατά συνέπεια, η χορήγηση βιταμίνης D και ασβεστίου φαίνεται να είναι μια χαμηλού κόστους, αποτελεσματική στρατηγική για τη μείωση των πτώσεων και των καταγμάτων [32].

Χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D επίσης συνδέονται με αστάθεια. Το πώς η βιταμίνη D μειώνει ειδικά την πιθανότητα των πτώσεων σε κυτταρικό επίπεδο δεν έχει ακόμα πλήρως διαλευκανθεί αλλά υπάρχουν διάφορες θεωρίες. Έχει υποστηριχθεί ότι η μειωμένη σύνδεση και έκφραση VDR τελικά καταλήγει στην σαρκοπενία που παρατηρείται στην προχωρημένη ηλικία. Πολλά φάρμακα (ειδικά καρβαμαζεπίνη, φαινοϊνίνη, και φαινοβαρβιτάλη) μπορεί να αυξήσουν το μεταβολισμό της βιταμίνης D μέσω της επαγωγής του συστήματος CYP450 [32].

2.10 Οι μεταβολίτες της βιταμίνης D

Πολλοί μεταβολίτες της βιταμίνης D έχουν περιγραφεί (Εικόνα 9), αλλά το ενδιαφέρον για συγκεκριμένες ενώσεις συνδέεται με την κλινική τους σημασία και μεθοδολογικά θέματα. Στον ορό τα επίπεδα



Εικ. 10. Η συσχέτιση του C-3 επιμερούς με την 25(OH)D και με την ηλικία. (Τροποποιημένη από Lensmeyer, 2012 [35]).

χοληκαλσιφερόλης (βιταμίνη D₃) και εργοκαλσιφερόλης (βιταμίνη D₂) είναι κακοί δείκτες μέτρησης καθώς και οι δύο μορφές γρήγορα υδροξυλιώνονται στο ήπαρ για να σχηματίσουν 25(OH)D₃ και 25(OH)D₂, αντίστοιχα. Αν και η κύρια πηγή της βιταμίνης D είναι ενδογενής (D₃), η διαίτα μπορεί επίσης να είναι μια σημαντική πηγή ιδίως όταν χρησιμοποιείται η βιταμίνη D₂ για φαρμακολογική θεραπεία και εμπλουτισμό των τροφίμων (π.χ. ΗΠΑ), οπότε και οι δύο μεταβολίτες συνυπάρχουν στον ορό. Επιπλέον και οι δύο μορφές μπορούν να μεταβολιστούν στο αντίστοιχο παράγωγο 1,25(OH)₂D στο νεφρό. Ωστόσο, η 1,25(OH)₂D δεν θεωρείται χρήσιμος δείκτης της διατροφικής κατάστασης λόγω της βραχείας ημιζωής της (<15 ώρες), τα πολύ χαμηλά επίπεδά της στο πλάσμα (περίπου 1.000 φορές χαμηλότερα από τους προδρόμους της) και την έλλειψη ανταπόκρισης κάτω από διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις. Έτσι, η ολική 25(OH)D [το άθροισμα της 25(OH)D₃ και 25(OH)D₂] που αποτελεί την κύρια μορφή στην κυκλοφορία θεωρείται ευρέως ως ο καλύτερος δείκτης εκτίμησης της διατροφικής κατάστασης της βιταμίνης D λόγω της μεγαλύτερης ημιζωής της στο πλάσμα (2-4 εβδομάδες), του συσχετισμού της με διαφορετικές νοσηρές καταστάσεις και της ανταπόκρισής της στα συμπληρώματα [1].

Από μία κλινική και αναλυτική προοπτική, δύο άλλοι κυκλοφορούντες μεταβολίτες έχουν πρόσφατα προσελκύσει πολλή προσοχή και θεωρούνται σημαντικοί για την τυποποίηση της βιταμίνης D. Η **24,25(OH)₂D**, ένας σημαντικός μεταβολίτης 25(OH)D, αντιπροσωπεύει το 10-15% των συγκεντρώσεων 25(OH)D και μπορεί να είναι φυσιολογικά ενεργός. Τα επίπεδα της 24,25(OH)₂D στον ορό αυξάνουν με τις αυξανόμενες συγκεντρώσεις της 25(OH)D. Πρόσφατα δεδομένα υποδεικνύουν ότι αμφότερα η **24,25(OH)₂D** αλλά επίσης και η αναλογία **24,25(OH)₂D:25(OH)D** μπορεί να έχουν κλινική χρησιμότητα ως δείκτες της κάθαρσης (clearance) της D₃ και ως προγνωστικοί δείκτες της ανταπόκρισης του ορού, εντοπίζοντας fast-D [υψηλά επίπεδα 24,25(OH)₂D] και low-D «μεταβολίζοντες»

(metabolizers). Έχει προταθεί ότι η 24,25(OH)₂D μπορεί να έχει ένα ρόλο αναβολικό στην επούλωση κατάγματος. Επίσης, οι αλλαγές των επιπέδων της στον ορό έχουν συσχετιστεί με χρόνια νεφρική νόσο, με ιδιοπαθή βρεφική υπερασβεστιαμία, με το ρυθμό πειραματικής διήθησης και με αυξημένο κίνδυνο μικροαλβουμινουρίας σε διαβητικούς τύπου 1 [1].

Το ενδιαφέρον για το 3-epi-25(OH)D έχει επίσης αυξηθεί ουσιαστικά και στην πραγματικότητα, αρκετά χρωματογραφικά kit έχουν ήδη κυκλοφορήσει στο εμπόριο. Το 3-epi-25(OH)D₃ είναι παρόν σε όλα τα άτομα και μπορεί να ευθύνεται για ένα σημαντικό ποσοστό της κυκλοφορούσας 25(OH)D₃ σε βρέφη (μέχρι 60%). Υπάρχει ακόμα περιορισμένη πληροφορία σχετικά με τον πιθανό ρόλο του in vivo και τη σημασία του (εάν υπάρχει) στην κλινική πράξη. Ωστόσο, η διάκριση μεταξύ 25(OH)D₃ και C-3 επιμερούς θεωρείται ότι έχει βιολογική σημασία λόγω της επικράτησής του σε ενήλικες και βρέφη αλλά και ως δυνητική πηγή αναλυτικού σφάλματος [34].

Η ποικιλία των μεταβολιτών της βιταμίνης D στην κυκλοφορία ενισχύεται περαιτέρω από δύο φυσικές διαδικασίες: επιμερισμό και λακτονίωση (lactonisation). Ο επιμερισμός των μεταβολιτών της D είναι η διαδικασία της ενζυματικής μετατροπής γύρω από το ασύμμετρο άτομο άνθρακα, κατά την οποία δεν αλλάζει το μοριακό βάρος και η ακολουθία των ατόμων αλλά η μόνη διαφορά ανευρίσκεται στην στερεοδιαμόρφωση. Το C-3 άτομο άνθρακα είναι ένα πιθανό κέντρο επιμερισμού για 25(OH)D, 1,25(OH)₂D και άλλους μεταβολίτες βιταμίνης D. Οι C-3β-υδροξυλ-μεταβολίτες της βιταμίνης D που συντίθενται στη φύση μετατρέπονται στα αντίστοιχα C-3α-υδροξυλ-επιμερή (C3-επιμερή) με ειδικές επιμεράσεις που εντοπίζονται στο κυτταροπλασματικό κλάσμα του ήπατος και τοπικά σε ορισμένα κύτταρα (π.χ. κερατινοκύτταρα, μακροφάγα). Ο επιμερισμός επηρεάζει την χημική και βιολογική δραστηριότητα των μεταβολιτών της βιταμίνης D [36]. Τόσο τα α όσο και τα β C-3 επιμερή της βιταμίνης D μπορεί να υδροξυλιώνονται περαιτέρω στο νεφρό [37]. Μια άλλη δομική αλλαγή της βιταμίνης D είναι

Πίν. 1. Χαρακτηριστικά της βιταμίνης D₃ και των μεταβολιτών της. (Τροποποιημένος από Bartoszewicz, 2013 [38]).

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	D ₃	25(OH)D ₃	1,25(OH) ₂ D ₃
Συγέντρωση στο πλάσμα	0.4-2.8 ng/mL	8-56 ng/mL (winter up to 24 ng/mL)	16-65 pg/mL
Χρόνος ημιζωής στο πλάσμα	36-78 hr	15-25 days	3.5-21 hr
Συγγενεία με καλσιπρικό οξύ		Ka = 500-700 uM-1	Ka = 40 uM-1
Συγγενεία με αλβουμίνη		Ka = 0.6 uM-1	Ka = 0.054 uM-1
Δέσμευση με VDBP (%)		85-99%	60-85%
Δέσμευση με αλβουμίνη (%)		13-15%	38%
Ελεύθερο κλάσμα (%)		0.03-0.4%	0.4-2%
Συγγενεία με VDR		Ka = 0,6 uM-1	Ka = 104-105 uM-1

η λακτονοποίηση (lactonisation), με τον σχηματισμό πρόσθετης δομής δακτυλίου μεταξύ C-23 και C-26. Η πλευρική αλυσίδα τροποποιημένων λακτονών δρά ως μερικός αγωνιστής του υποδοχέα (VDR), και μπορεί να διαμορφώνει την δραστηριότητα του [38]. Λόγω της υψηλής υδροφοβικότητας, οι μεταβολίτες είναι ελάχιστα διαλυτοί σε υδατικά μέσα και μεταφέρονται στο αίμα σε δεσμευμένη μορφή, ως επί το πλείστον σε ειδική πρωτεΐνη φορέα VDBP και χαλαρά με λευκωματίνη. Οι ελεύθερες μορφές 25(OH)D₃ και 1,25(OH)₂D₃ στην κυκλοφορία αναλογούν σε περίπου 0,03-0,4% και 0,4-2% του συνολικού μεταβολίτη αντίστοιχα (εικ.10). Το επίπεδο της αδέσμευτης 1,25(OH)₂D συσχετίζεται καλά με τη βιολογική δραστηριότητα της, γεγονός που υποδηλώνει ότι η υπόθεση των ελεύθερων ορμονών μπορεί να ισχύει για το σύστημα της βιταμίνης D. Ωστόσο, μέθοδοι που να επιτρέπουν την άμεση μέτρηση των ελεύθερων κλασμάτων 25(OH)D ή 1,25(OH)₂D για διαγνωστικούς σκοπούς δεν είναι γνωστές [38].

2.10.1 Η βιταμίνη D₂ έναντι της βιταμίνης D₃

Η φυσική μορφή της βιταμίνης D σε όλα τα ζώα και η μορφή με την οποία συντίθεται στο ανθρώπινο δέρμα κατά την έκθεση στο ηλιακό φως είναι η χοληκαλσιφερόλη, (βιταμίνη D₃). Η εργοκαλσιφερόλη (βιταμίνη D₂) είναι ένα συνθετικό προϊόν που προέρχεται από την ακτινοβολία των φυτικών στερολών / εργοστερόλη. Μέχρι πολύ πρόσφατα, οι δύο μορφές της βιταμίνης θεωρούνταν ότι είναι ανταλλάξιμες και ισοδύναμες. Ωστόσο, δεδομένης της διαθεσιμότητας της μέτρησης της 25(OH)D ως δείκτη λειτουργικής κατάστασης της βιταμίνης D, έχει καταστεί σαφές ότι η βιταμίνη D₂ είναι ουσιαστικά λιγότερο ισχυρή από τη βιταμίνη D₃. Οι δύο φαίνεται να απορροφώνται από το έντερο και να υδροξυλιώνονται στη θέση 25 στο ήπαρ με την ίδια απόδοση ωστόσο, η βιταμίνη D₂ φαίνεται ασκεί θετική ρύθμιση σε αρκετές 24-υδροξυλάσεις, οδηγώντας σε αυξημένη μεταβολική αποικοδόμηση τόσο της χορηγούμενης D₂ όσο και της ενδογενούς D₃. Έτσι, αν και είναι σίγουρα εφικτή η θεραπεία ασθενών σε ικανοποιητικό βαθμό με βιταμίνη D₂, η εργοκαλσιφερόλη φαίνεται

να μην έχει κανένα πλεονέκτημα σε σχέση με την D₃ (χοληκαλσιφερόλη), που, όπως σημειώνεται, είναι η φυσική μορφή της βιταμίνης [39].

3. Πότε θα πρέπει να μετράμε τις συγκεντρώσεις 25(OH)D στην κλινική πράξη

Ο προσδιορισμός της 25(OH)D δεν είναι ένα εργαλείο ελέγχου (screening tool)! Θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση ασθενών που πάσχουν από διάφορες χρόνιες ασθένειες (πχ. οστεοπορωτικοί, CKD, ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση κλπ) για τους οποίους ο στόχος έχει σαφώς καθοριστεί σύμφωνα με διάφορες μελέτες. Ο στόχος αυτός μπορεί να διαφέρει ανάλογα με τη νόσο.

3.1 Ενδείξεις μέτρησης της βιταμίνης D

Σε ποιούς ασθενείς μια «λογικά» τεκμηριωμένη συκέντρωση στόχος πρέπει να επιτυγχάνεται ή/και να διατηρείται; Κατ' αρχάς, πρέπει να αναγνωρίσουμε ότι, αν και άφθονα, τα πολλά αποδεικτικά στοιχεία σχετικά με τις διάφορες πιθανές εξωσκελετικές δράσεις της βιταμίνης D βασίζονται ως επί το πλείστον σε παρατηρήσεις και μελέτες. Πράγματι, πολλές προοπτικές μελέτες έχουν δείξει ότι τα άτομα στην υψηλότερη ποσοτική κατανομή των συγκεντρώσεων 25(OH)D (συνήθως 70 έως 80 nmol/L) έχουν μικρότερο σχετικό κίνδυνο για πολλές ασθένειες από εκείνα στη χαμηλότερη ποσοτική κατανομή (συνήθως 30 έως 40 nmol/L) [40]. Ωστόσο, η παρατηρητική φύση αυτών των μελετών δεν επιτρέπει την τεκμηρίωση σχέσης αιτίου-αιτιατού μεταξύ χαμηλής βιταμίνης D και των ασθενειών αυτών, και έτσι αποτρέπει τον καθορισμό σαφούς τιμής cut-off(s) για τη βελτιστοποίηση αυτών των πιθανών επιπτώσεων. Πολλοί συγγραφείς συνιστούν τη μέτρηση της 25(OH)D ως γενική πρακτική σε μια μυριάδα ιατρικών καταστάσεων, όπως η εγκυμοσύνη, σε ασθενείς με καρκίνο, αυτοάνοσα νοσήματα, καρδιαγγειακές ασθένειες, υπέρταση, διαβήτη. Οι Cavalier και συν. δεν δίνουν ωστόσο την ίδια συμβουλή σχετικά με την ανάγκη να μετρηθεί βιταμίνη

D σε αυτούς τους ασθενείς. Έχει καταστεί σαφές ότι η πρόσληψη 2.000 IU/ημέρα βιταμίνης D (και ακόμη περισσότερο), είναι απόλυτα ασφαλής ακόμη και αν χορηγείται σε άτομα που έχουν συγκέντρωση 25(OH)D στο υψηλότερο τεταρτημόριο του γενικού πληθυσμού (συνήθως στο διάστημα 70-90 nmol/L), υποθέτοντας ότι δεν έχουν καμία κοκκιωματώδη νόσο (σαρκοείδωση, φυματίωση) ή υπερευαισθησία στη βιταμίνη D λόγω κάποιου γενετικού ελαττώματος [41]. Ωστόσο, δεν συνιστάται μια συστηματική αξιολόγηση της κατάστασης της βιταμίνης D πια σε ασθενείς με/ή κίνδυνο καρδιαγγειακών παθήσεων, αυτοάνοσων νόσων, καρκίνου, μολύνσεων, ή σε έγκυες ή θηλάζουσες γυναίκες. Αναγνωρίζουμε ωστόσο ότι η παροχή αυτού του είδους των συστάσεων ή προτάσεις που βασίζονται σε δημοσιευμένα δεδομένα και εμπειρία, και η κατάσταση του γιατρού ο οποίος πρέπει να αποφασίσει αν θα μετρηθεί ή όχι η συγκέντρωση 25(OH)D σε έναν δεδομένο ασθενή, είναι δύο πολύ διαφορετικά πράγματα. Γνωρίζουμε ότι σε κάποιες χώρες (Γαλλία και Βέλγιο), τουλάχιστον, πολλοί γιατροί εξακολουθούν να διστάζουν να συνταγογραφήσουν τα συμπληρώματα βιταμίνης D αν προηγουμένως δεν γνωρίζουν την μέτρηση της βιταμίνης D των ασθενών τους. Ομοίως, ορισμένοι ασθενείς δεν θα συμφωνούσαν να πάρουν μια θεραπεία βιταμίνης D εάν η ανεπάρκεια αυτής δεν είχε τεκμηριωθεί κατάλληλα από μια αντίστοιχη χαμηλή εργαστηριακή τιμή 25(OH)D.

Η Ενδοκρινολογική Εταιρεία προτείνει, ότι η έλλειψη βιταμίνης D αντιστοιχεί σε συγκεντρώσεις 25(OH)D μικρότερες των 50 nmol/L, και η ανεπάρκεια σε συγκεντρώσεις από 50 έως 75 nmol/L [42]. Στην κλινική πρακτική, είναι επιθυμητό οι ασθενείς που λαμβάνουν εξωγενώς βιτ. D να πετύχουν ένα επαρκές επίπεδο συγκέντρωσης-στόχου πάνω από 75 nmol/L. Η συγκέντρωση αυτή cut-off είναι μόνο «λογικά τεκμηριωμένη» για την υγεία του μυοσκελετικού και του οστικού μεταβολισμού (πρόληψη της ραχίτιδας/οστεομαλακίας, αυξημένα επίπεδα της παραθορμόνης, οστεοπορωτικά κατάγματα και πτώσεις στους ηλικιωμένους).

Πράγματι, στις RCT μελέτες που παρουσιάζουν θετικές επιδράσεις της βιταμίνης D σε μη σπονδυλικά κατάγματα και πτώσεις τα άτομα στην «ομάδα βιταμίνης D» είχαν γενικά συγκεντρώσεις 25(OH)D άνω των 75 nmol/L, ενώ αυτά στις «placebo ομάδες» είχαν συγκεντρώσεις 30-60 nmol/L. Συνεπώς με αυτά, τα δεδομένα βιοψίας οστού έδειξαν ότι ιστομορφογενετικά σημάδια οστεομαλακίας δεν ανιχνεύονται σε άτομα με συγκέντρωση 25(OH)D στον ορό πάνω από 75 nmol/L, ενώ είναι παρόντα, όπως ορίζεται από το πλέον συντηρητικό κατώτατο όριο της αναλογίας OV/BV του 2%, σε περίπου 10% των ατόμων με τιμές 25(OH)D μεταξύ 50 και 75 nmol/L. Επιπλέον, Ιάπωνες ασθενείς με 25(OH)D μέχρι 70 nmol/L μείωσαν την συγκέντρωση PTH όταν τους δόθηκε βιταμίνη D (χωρίς ασβέστιο) ενώ όσον αφορά στη σχέση μεταξύ 25(OH)D και παραθορμόνης σε διάφορους πληθυσμούς,

όπως αναφέρεται σε μερικές μελέτες, η συγκέντρωση PTH μπορεί να αυξηθεί όταν η 25(OH)D είναι κάτω από 75-80 nmol/L. Λόγω της αβεβαιότητας των μετρήσεων (συγκρινόμενη με εκείνη της μέτρησης των άλλων στεροειδών ορμονών), μια καλύτερη εκτίμηση της τιμής 75 nmol/L επιτρέπει ένα διάστημα αβεβαιότητας μεταξύ 60 και 90 nmol/L [43].

Μεταξύ των ασθενών στους οποίους προτείνεται να μετρείται η 25(OH)D, θα πρέπει να περιλαμβάνονται:

- 1) Ασθενείς με ραχίτιδα / οστεομαλακία.
- 2) Ασθενείς με οστεοπόρωση (με και χωρίς κάταγμα). Σε αυτούς τους ασθενείς συνιστάται μέτρηση 25(OH)D κατά τη διάγνωση, ως μέρος μιας πιο εκτεταμένης αξιολόγησης των πιθανών δευτερογενών αιτιών χαμηλής οστικής μάζας (συμπεριλαμβανομένων μετρήσεων των συγκεντρώσεων ασβεστίου του ορού, φωσφόρου, PTH, γενική αίματος, ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών, CRP). Αν η συγκέντρωση είναι 75 nmol/L προτείνεται να συνταγογραφηθεί βιταμίνη D. Μετά από αυτό το πρώτο στάδιο (με στόχο την αύξηση της συγκέντρωσης 25(OH)D σε μια τιμή 75 nmol/L) η θεραπεία «συντήρησης» (με στόχο τη διατήρηση της συγκέντρωσης της 25(OH)D πάνω από 75 nmol/L) πρέπει να ξεκινήσει (για παράδειγμα 1.500-2.000 IU/ημέρα ή το ισοδύναμό του δοσμένο σε εβδομαδιαίες, μηνιαίες ή διμηνιαίες δόσεις). Προτείνεται για την παρακολούθηση της συγκέντρωσης της 25(OH)D κατά τη διάρκεια αυτής της αγωγής «συντήρησης» η μέτρηση 25(OH)D μετά από 4-6 μήνες στην περίπτωση ημερήσιας θεραπείας, και στην περίπτωση της διαλείπουσας θεραπείας, μετά 6 μήνες (λίγο πριν δοθεί η δόση) και η προσαρμογή της δοσολογίας ανάλογα με τη μετρούμενη τιμή.
- 3) Ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο για οστεοπόρωση/οστική απώλεια, επειδή λαμβάνουν ειδικές θεραπείες, όπως γλυκοκορτικοειδή χρονίως σε δόση 7,5 mg πρεδνιζόνης ή περισσότερο για οποιαδήποτε αιτία, ανάλογα της GnRH για τον καρκίνο του προστάτη, ή θεραπεία με αναστολείς αρωματάσης για τον καρκίνο του μαστού. Σε αυτούς τους ασθενείς, η 25(OH)D μέτρηση μπορεί να διενεργείται 4-6 μήνες μετά από θεραπεία με βιταμίνη D (1500-2000 IU/ημέρα) και γίνεται για την προσαρμογή της δοσολογίας.
- 4) Ασθενείς με κίνδυνο οστεοπόρωσης/απώλειας οστού επειδή έχουν σύνδρομο δυσαπορρόφησης (κοιλιοκάκη, φλεγμονώδη νόσο του εντέρου, κυστική ίνωση, ή νόσο του Crohn) στους οποίους απαιτούνται γενικά υψηλότερες δόσεις βιταμίνης D. Ομοίως, μέτρηση της 25(OH)D μπορεί να διενεργείται 4-6 μήνες μετά από θεραπεία με βιταμίνη D (3.000-4.000 IU/ημέρα) και γίνεται για την προσαρμογή της δοσολογίας.
- 5) Ασθενείς που έκαναν βαριατρική χειρουργική, ειδικά γαστρική παράκαμψη. Οι παχύσαρκοι ασθενείς έχουν συνήθως ανεπάρκεια βιταμίνης αλλά δεν είναι οστεοπορωτικοί. Ωστόσο, μετά από γαστρική παράκαμψη έχουν επιταχυνόμενη οστική

απώλεια. Αυτοί οι ασθενείς έχουν δύο λόγους για την ύπαρξη της ανεπάρκειας βιταμίνης D:

- α) ακόμη και αν έχουν χάσει 50 κιλά ή περισσότερο, είναι συνήθως ακόμα παχύσαρκοι και αποθηκεύουν βιταμίνη D στη λιπώδη μάζα τους,
 - β) έχουν δυσαπορρόφηση λόγω της χειρουργικής διαδικασίας. Συνήθως χρειάζονται δόσεις βιταμίνης D πολύ υψηλότερες από ό,τι οι άλλοι ασθενείς.
- 6) Ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο (XNN) σταδίου 3-5 καθώς και λήπτες νεφρικών μοσχευμάτων. Η μέτρηση των συγκεντρώσεων 25(OH)D σε ασθενείς με XNN και η θεραπεία της έλλειψης/ανεπάρκειας βιταμίνης D όπως στο γενικό πληθυσμό είναι σύσταση των κατευθυντήριων οδηγιών KDIGO [44]. Η σύσταση αυτή είναι στην πραγματικότητα μόνο μία πρόταση αφού ο δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της XNN, με διάφορες συνέπειες. Πρέπει να υπογραμμιστεί ότι, μέχρι πρόσφατα, οι νεφρολόγοι χρησιμοποιούσαν για τη θεραπεία των ασθενών τους ενεργό βιταμίνη D (ανάλογα, καλσιτριόλη), για τον έλεγχο της έκκρισης παραθορμόνης. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι η συμπλήρωση με χοληκαλσιφερόλη ή εργοκαλσιφερόλη ήταν σε θέση να μειώσει σε κάποιο βαθμό αλλά όχι σημαντικά τις συγκεντρώσεις PTH σε ασθενείς σε αιμοκάθαρση και σε ασθενείς με μεταμόσχευση. Επιπλέον, αρκετές μη τυχαιοποιημένες επεμβατικές μελέτες έχουν συνδέσει την ανεπάρκεια βιταμίνης D με αυξημένη θνησιμότητα από XNN επιταχυνόμενη από την πτώση του GFR και την αλβουμινουρία. Κατά συνέπεια, η συμπλήρωση με βιταμίνη D είναι μια επιταχυνόμενη πρακτική σε ασθενείς με XNN. Τα μηνιαία συμπληρώματα με 100.000 IU βιταμίνης D₃ μειώνουν την PTH και είναι επαρκή για τη διατήρηση της 25(OH)D στους περισσότερους αιμοκαθαρόμενους και στους ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού πάνω από 75 nmol/L, ενώ 100.000 IU κάθε δύο μήνες απέτυχαν να διατηρήσουν αυτή τη συγκέντρωση στους μισούς περίπου αποδέκτες μοσχεύματος νεφρού.
- 7) Ασθενείς με πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό (PHPT). Αυτοί οι ασθενείς συχνά έχουν ανεπάρκεια βιταμίνης D και είναι οστεοπορωτικοί, αλλά είναι επίσης υπερασβεστιαϊκοί. Θεραπεία υπερασβεστιαϊκών ασθενών με ένα μόριο που αυξάνει την απορρόφηση του ασβεστίου και το οποίο μπορεί, όταν δίνεται σε εξαιρετικά μεγάλες δόσεις να προκαλεί υπερασβεστιουρία και εξωσκελετικές αποπιτανώσεις αντιμετωπίστηκε με καχυποψία από τους περισσότερους γιατρούς. Δείχθηκε το 2005, ότι η χορήγηση μεγάλων δόσεων χοληκαλσιφερόλης σε ασθενείς με PHPT και συγκέντρωση ασβεστίου στον ορό 3 mmol/L δεν αυξάνει το ασβέστιο ή φωσφόρο ορού και μειώνει την παραθορμόνη σημαντικά. Αυτό ακολουθήθηκε από παρόμοια δημοσιευμένα αποτελέσματα έτσι ώστε η ομάδα εμπειρογνομόνων για τη διάγνωση/διαχείριση των ασυμπτωματικών PHPT να συνιστά να

θεραπεύεται κάθε ασθενής PHPT με συγκέντρωση 25(OH)D 50 nmol/L με βιταμίνη D. Συνιστάται επίσης όλοι οι ασθενείς με PHPT να λαμβάνουν βιταμίνη D (και ασβέστιο) αμέσως μετά την χειρουργική αγωγή. Αυτό θα επιτρέψει την αύξηση της οστικής πυκνότητας και την πρόληψη συμπτωματικής υπασβεστιαϊμίας που οφείλεται στο "hungry bone syndrome". Συγκεντρώσεις 25(OH)D 75 nmol/L (και μερικές φορές περισσότερο) πρέπει να αποτελούν επιθυμητό στόχο μετά την παραθυρεοειδεκτομή [43].

- 8) Ασθενείς με κοκκιωματώδη διαταραχές όπως σαρκοειδωση ή φυματίωση. Σε αυτούς τους ασθενείς είναι συνετό ο στόχος για τη συγκέντρωση 25(OH)D να είναι περίπου 50 nmol/L για την αποφυγή υπερασβεστιαϊμίας / υπερασβεστιουρίας λόγω της ανεξέλεγκτης σύνθεσης καλσιτριόλης από τη μία πλευρά, και σοβαρής ανεπάρκειας βιταμίνης D, η οποία είναι συχνή σε αυτούς τους ασθενείς, από την άλλη πλευρά. Για τους ασθενείς της παραπάνω κατηγορίας η τήρηση για τα συμπληρώματα βιταμίνης D αποτελεί μια ανησυχία. Επομένως, δεν είναι ρεαλιστικό να μετρούνται επίπεδα 25(OH)D κατά διαστήματα σε αυτούς τους ασθενείς. Είναι λογικό να μετρηθεί η 25(OH)D στο θεωρητικό ναδίρ, δηλαδή κατά τους χειμερινούς μήνες, αν είναι δυνατόν, και λίγο πριν από τη λήψη μιας δόσης, σε περίπτωση διαλείπουσας δοσολογίας που χορηγείται σε διαστήματα ενός μηνός ή περισσότερο.
- 9) Ασθενείς με συμπτώματα συμβατά με σοβαρή ανεπάρκεια βιταμίνης (όπως εκείνα με διάχυτο πόνο ή ηλικιωμένα άτομα που συχνά πέφτουν), ή με δηλητηρίαση από βιταμίνη D (όπως εκείνα με εξωσκελετικές αποπιτανώσεις, νεφροασβέστωση ή νεφρικούς λίθους), συμπτώματα που είναι παρόντα και εξακολουθούν να υφίστανται χωρίς σαφή εξήγηση. Ασθενείς που έχουν μια ασθένεια, όπως ηπατική ανεπάρκεια, ή λαμβάνουν θεραπείες που μπορεί να τροποποιήσουν το μεταβολισμό της βιταμίνης D, όπως ορισμένα αντιπασμωδικά ή κετοκοναζόλη μπορεί να περιλαμβάνονται στην κατηγορία αυτή. Σε αυτούς τους ασθενείς δεν υπάρχει ειδικό εύρος τιμών 25(OH)D που να συνιστάται αν και είναι λογικό να εξεταστεί το ενδεχόμενο των 50-150nmol / L.

Εκτός οστεοπορωτικών ασθενών στους οποίους ο στόχος είναι να αποκλειστεί μια δευτερεύουσα αιτία της χαμηλής οστικής μάζας ή/και καταγμάτων, θα πρέπει να συνταγογραφείται σε ασθενείς με νεφρική λιθίαση, χονδροασβέστωση, και σε περίπτωση επιμονής (χωρίς εξήγηση) του συμπτώματος αμφοτέρων των υπερ- ή υπο-ασβεστιαϊμίας. Σε τέτοιες περιπτώσεις, είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γνωρίζουμε την συγκέντρωση 25(OH)D όταν μια υψηλή συγκέντρωση της παραθορμόνης είναι ανιχνεύσιμη σε ασθενείς με κατά τα άλλα φυσιολογικές συγκεντρώσεις ασβεστίου και φωσφόρου. Η συγκέντρωση

25(OH)D μπορεί να βοηθήσει μια διαφοροποίηση μεταξύ δευτεροπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού, και του λεγόμενου «νορμασβεστιαϊκού» ΡΗΡΤ. Αυτό αναγνωρίζεται πλέον ως μία ξεχωριστή και αρκετά συχνή οντότητα, η οποία πιθανώς απαιτεί την ίδια μεταχείριση όπως ο υπερασβεστιαϊκός ΡΗΡΤ όταν οστεοπόρωση, νεφρική λιθίαση ή νεφρική βλάβη είναι παρούσες [43].

4. Προαναλυτικό στάδιο

4.1 Τα προαναλυτικά σφάλματα

Οι περισσότερες μελέτες έχουν γενικά επικεντρωθεί στη κυκλοφορούσα 25(OH)D, θεωρώντας την ως το ιδανικό βιοδείκτη για την αξιολόγηση της κατάστασης του οργανισμού όσον αφορά τη βιταμίνη D. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά σχετικά με την επίδραση των συνήθων εργαστηριακών πρακτικών στις συγκεντρώσεις της 25(OH)D. Έχουν διατυπωθεί ανησυχίες σχετικά με το αν οι πρακτικές αυτές επηρεάζουν τη συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων σε όλες τις μελέτες. Επιπλέον, εάν οι πρακτικές προετοιμασίας του δείγματος θα πρέπει να διαφέρουν ανάλογα με την κατάσταση της νόσου.

Στην εργασία των Chu-Ling Yu και συν. δείγματα αίματος από 20 υγιείς εθελοντές υποβλήθηκαν σε εναλλακτικές εργαστηριακές διαδικασίες: τέσσερις φορές φυγοκέντρηση (2, 24, 72 και 96 ώρες μετά την συλλογή του αίματος) με τρεις τύπους σωληνίων συλλογής (σωληνάριο ορού χωρίς αντιπηκτικό, δύο διαφορετικά σωληνάρια πλάσματος με αντιπηκτικό που περιέχουν ηπαρίνη ή EDTA) και δύο τύπους δοκιμασιών (DiaSorin ραδιοανοσοπροσδιορισμός [RIA] και ανοσοδοκιμασία [CLIA/LIAISON®]). Οι δύο εμπορικές 25(OH)D δοκιμασίες που χρησιμοποιήθηκαν, CLIA/LIAISON® και DiaSorin RIA, έδωσαν συγκρίσιμα αποτελέσματα και μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα μεταξύ συλλογής του αίματος και φυγοκέντρησης δεν επηρέασαν τις συγκεντρώσεις 25(OH)D. Υπήρχαν κάποιες ενδείξεις ότι οι συγκεντρώσεις 25(OH)D στο πλάσμα με ηπαρίνη μπορεί να είναι υψηλότερες από ό,τι σε ορό ή πλάσμα EDTA, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται CLIA/LIAISON®, αλλά η διαφορά δεν ήταν σημαντική εντός των φυσιολογικών χρονικών πλαισίων μεταξύ συλλογής και φυγοκέντρησης. Η μελέτη υποδηλώνει ότι δεν υπάρχει ανάγκη να απαιτείται άμεση επεξεργασία των δειγμάτων αίματος μετά τη συλλογή ή την επιλογή μιας συγκεκριμένης δοκιμασίας 25(OH)D ή σωληναρίου συλλογής αίματος. Μελλοντικές μελέτες με ένα ευρύτερο φάσμα συγκεντρώσεων 25(OH)D και μεγαλύτερα μεγέθη δειγμάτων θα μπορούσε να είναι χρήσιμες για την επιβεβαίωση των ευρημάτων αυτών [45].

Οι Colak και συν. έχουν επίσης ερευνήσει διάφορες συνθήκες αποθήκευσης: 4 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, 24 ώρες στους 2-8°C και -20°C, 7 ημέρες στους -20°C και 3 μήνες στους -80°C. Η συγκέντρωση 25(OH)D δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές κατά την εξέταση σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα

και θερμοκρασίες. Βρήκαν ότι η βιταμίνη αυτή είναι ένας σταθερός αναλύτης, συμπέρασμα συνεπές και με άλλες μελέτες. Αυτή ήταν η πρώτη μελέτη που αξιολόγησε επίσης την επίδραση της θερμοκρασίας φυγοκέντρησης στη συγκέντρωση της βιταμίνης D. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ ψυκτικής φυγοκέντρησης στους 2-8°C και φυγοκέντρησης σε θερμοκρασία δωματίου. Καθυστερήσεις στη φυγοκέντρηση ερευνήθηκαν από μια άλλη μελέτη και δεν αναφέρθηκαν σημαντικές διαφορές έως 96 ώρες μετά τη συλλογή του αίματος. Φαίνεται ότι η βιταμίνη D δεν απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή από την άποψη της φυγοκέντρησης.

Η μελέτη αυτή διερεύνησε δείγματα τόσο στον ορό όσο και στο πλάσμα και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο τύπος του δείγματος δεν επηρεάζει τη σταθερότητά του. Και τα δύο (ορός και πλάσμα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση. Η διαφορά στις συγκεντρώσεις 25(OH)D ανάλογα με τον τύπο του σωλήνα σε μερικές αναλύσεις αναφέρθηκε από μια άλλη μελέτη για ηπαρινισμένο πλάσμα. Συμπερασματικά, τα δεδομένα αυτής της μελέτης επιβεβαίωσαν ότι η βιταμίνη D είναι σταθερή υπό κοινές συνθήκες αποθήκευσης. Δεν υπάρχει καμία σημαντική διαφορά μεταξύ ορού και πλάσματος και η θερμοκρασία φυγοκέντρησης δεν έχει καμία επίδραση στην συγκέντρωση της βιταμίνης D [46].

Μια άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε με δείγματα από 8 ασθενείς τα οποία συλλέχθηκαν σε πλαστικά δοχεία συλλογής αίματος χωρίς αντιπηκτικό. Οι αρχικές συγκεντρώσεις 25(OH)D₃ κυμαίνονταν από 35-110 nmol/L. Κλάσματα ορού μοιράστηκαν σε πωματισμένους πλαστικούς σωλήνες και καταψύχθηκαν αμέσως στους -20°C μέχρι την ανάλυση. Οι συνθήκες αποθήκευσης εξετάστηκαν όταν επεκτάθηκαν σε κοινές συνθήκες εργαστηριακές συνθήκες: αποθήκευση του ορού στους 6°C, σε θερμοκρασία δωματίου (περίπου 20°C) στο σκοτάδι και στον πάγκο κάτω από συνθήκες συνθήκες τεχνητού φωτός και αποθήκευση ολικού αίματος χωρίς αντιπηκτικά σε θερμοκρασία δωματίου στον πάγκο.

Επιπλέον, εξετάστηκε η επίδραση των πολλαπλών κύκλων ψύξης-απόψυξης. Οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε αναλυτή Cobas E601 (Roche). Δείγματα από κάθε πείραμα αναλύθηκαν και μετά αποθηκεύθηκαν σε καταψύκτη στους -20°C. Τα CVs για τις αναλύσεις ορού (κατεψυγμένα δείγματα) ήταν 6,9% σε 25,5 nmol/L 25(OH)D₃ και 3,2% σε 72,5 nmol/L 25(OH)D₃. Η έκθεση σε 4 κύκλους ψύξης-απόψυξης δεν είχε σημαντική επίδραση στις συγκεντρώσεις 25(OH)D₃ οι τιμές για το μέσο όρο των 8 δειγμάτων αυξήθηκαν κατά 2,6% σε σχέση με τις αρχικές τιμές. Αυτή η μικρή αύξηση μπορεί να αποδοθεί σε εξάτμιση ή ξήρανση σε διαδικασίες κατάψυξης, αλλά ίσως υπάρχει επίσης ένα μικρό θετικό αποτέλεσμα που οφείλεται στην αυξημένη θολερότητα των δειγμάτων μετά από κύκλους ψύξης-απόψυξης. Μια μείωση 4,0% στη μέση συγκέντρωση παρατηρήθηκε μετά από αποθήκευση στους -20°C για έως 2 μήνες.

Σημειώθηκε μέση μείωση 2,3% μετά από 72 ώρες παραμονής πλήρους αίματος στον πάγκο σε θερμοκρασία δωματίου, και μέση μείωση 3,4% μετά από 24 ώρες και 8,5% μετά από 7 ημέρες παραμονής ορού στον πάγκο στο φως της ημέρας. Μέση μείωση 4,5% μετά από 3 ημέρες και 8,1% μετά από 7 ημέρες αποθήκευσης του ορού στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου παρατηρήθηκαν, ενώ μέση μείωση κατά 1,8% παρατηρήθηκε μετά από 7 ημερών αποθήκευση του ορού στο ψυγείο. Βρέθηκε λοιπόν ότι οι συγκεντρώσεις της 25(OH)₃D₃ στη φυσική της κατάσταση συνδεδεμένη με την VDBP είναι πολύ σταθερές σε θερμοκρασία δωματίου, ακόμη και για το πλήρες αίμα. Για μεταποιημένα ή μη δείγματα, η καθυστέρηση αρκετών ωρών πριν από την ανάλυση έχει επιπτώσεις αμελητέες. Ακόμα και «ξεχασμένα» δείγματα ή τα δείγματα που λαμβάνονται σε κατεψυγμένη κατάσταση φαίνεται να είναι κατάλληλα για την ανάλυση, επειδή οι μειώσεις που σημειώνονται μετά από 3 ημέρες υπό συνθήκες συνθήκες εργαστηρίου σε θερμοκρασία δωματίου ήταν μικρότερες από την αναλυτική ακρίβεια μεταξύ μεθόδων. Φαίνεται να μην υπάρχει καμία ανάγκη για κατάψυξη του ορού κατά τις μεταφορές, καθώς το ολικό αίμα θα μπορούσε να είναι ακόμη και το δείγμα επιλογής για τους χρόνους μεταφοράς μέχρι και 3 ημέρες. Συνθήκες αποθήκευσης του ορού στους 4°C για τουλάχιστον 7 ημέρες και μέχρι 4 κύκλους ψύξης-απόψυξης είναι ανεκτές. Φαίνεται λοιπόν ότι οι συγκεντρώσεις 25(OH)₃D₃ είναι «σταθερές σαν βράχος» σε θερμοκρασία δωματίου και υπό τις κοινές προαναλυτικές συνθήκες που επικρατούν στα περισσότερα ιατρικά εργαστήρια [47].

Η δέσμευση στα συστατικά του αίματος εξασφαλίζει στους μεταβολίτες της D υψηλή σταθερότητα στον ορό και το πλάσμα [47]. Είναι σταθεροί ακόμη και για αρκετές ημέρες όταν φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου ή αυξημένη θερμοκρασία, και δεν επηρεάζονται είτε από τις εγκαταστάσεις φωτός είτε από πολλαπλούς κύκλους ψύξης απόψυξης, αλλά προσοχή πρέπει να δοθεί όταν η βιταμίνη D απελευθερώνεται από την VDBP και διαχωρίζεται από το αίμα, επειδή αυτά τα δείγματα είναι ευαίσθητα και στη θερμοκρασία και στο φως [48]. Αυτό ισχύει και για ορισμένα πρότυπα της βιταμίνης D και δείγματα που εκχυλίζονται για ανάλυση HPLC και LC-MS/MS τα οποία θα πρέπει να διατηρούνται σε σωλήνες πορτοκαλί ή σκούρα γυάλινα φιαλίδια στους -70°C.

4.1.1 Σωληνάρια συλλογής αίματος

Μέχρι πρόσφατα, είχε δοθεί εκπληκτικά λίγη προσοχή στην επίδραση των αντιπηκτικών ή της γέλης διαχωρισμού στις δοκιμασίες 25(OH)D. Οι κατασκευαστές συχνά ισχυρίζονται ότι τα Kit των προσδιορισμών τους είναι κατάλληλα για ορό ή πλάσμα χωρίς όμως ειδική υποστήριξη από πειραματικά δεδομένα. Τα σωληνάρια που περιέχουν ειδική γέλη διαχωρισμού έχουν ανεπιθύμητες επιδράσεις σε ορισμένες

δοκιμασίες για στεροειδή, συμπεριλαμβανομένων των μεθόδων HPLC για 25(OH)D. Η επίδραση της γέλης διαχωρισμού ορού και ενός αντιπηκτικού που χρησιμοποιείται συνήθως (EDTA) στα αποτελέσματα ερευνήθηκε από το DEQAS τον Ιούλιο του 2009. Οι ανοσολογικές δοκιμασίες δεν επηρεάστηκαν σημαντικά από τη γέλη διαχωρισμού, αλλά περίπου το ένα τρίτο των χρηστών HPLC και δύο χρήστες LC-MS/MS ανέφεραν ψευδώς υψηλά αποτελέσματα. Ορός από σωληνάρια Sarstedt MonovetteTM βρέθηκε πρόσφατα ότι προκαλεί καταστολή ιόντος του εσωτερικού προτύπου σε μια δοκιμασία LC-MS/MS, οδηγώντας σε σημαντικά αυξημένα επίπεδα 25(OH)₃D₃. Αίμα για μέτρηση 25(OH)D είναι μάλλον καλύτερο να συλλέγεται σε απλά σωληνάρια χωρίς αντιπηκτικά ή γέλη διαχωρισμού, που έχουν ελεγχθεί για την καταλληλότητά τους [45].

5. Αναλυτικό στάδιο

5.1 Οι δυσκολίες της ανάλυσης της 25(OH)D

Ο προσδιορισμός της 25(OH)D δεν είναι καθόλου εύκολη υπόθεση. Οι κυριότερες δυσκολίες και αναλυτικές προκλήσεις της μέτρησης αυτής είναι οι ακόλουθες:

- 1) Το μείζων πρόβλημα στη μέτρηση οφείλεται στο ίδιο το μόριο. Είναι πολύ λιπόφιλη η φύση του μορίου (μη ειδική παρεμβολή από άλλα λιπίδια). Η 25(OH)D είναι ίσως η πιο υδρόφοβη ένωση που μετράται με δέσμευση πρωτεΐνης (CPBA ή RIA). Η λιπόφιλη αυτή φύση της την καθιστά ευάλωτη σε αντιδράσεις υποστρώματος δηλ. παρεμβολές από οποιαδήποτε ουσία που πιθανόν υπάρχει στο δείγμα (matrix effects), συμπεριλαμβανομένων των λιποπρωτεϊνών. Οι επιδράσεις του υποστρώματος μπορεί να συμβούν ακόμη σε ουραιμικά δείγματα και στις έγκυες γυναίκες. Όταν συμβαίνει αυτό μειώνεται σημαντικά η εγκυρότητα της ανάλυσης. Από τη φύση τους οι επιδράσεις της μήτρας είναι απρόβλεπτες και ποικίλλουν από δείγμα σε δείγμα. Το πρόβλημα αυτό είναι εμφανές και σε πολλές από τις συγκρίσεις μεθόδων, όπου ακόμη και οι καλές συσχετίσεις δεν μπορούν να αποκρύψουν μεγάλες διαφορές στις μεθόδους που σχετίζονται με μεμονωμένα δείγματα.
- 2) Υπάρχει ανάγκη να αποδεσμευθεί ο αναλύτης από την VDBP (παραδοχή ότι είναι 100%, αλλά χωρίς αποδείξεις). Είναι ισχυρά δεσμευμένη με πρωτεΐνες κυρίως με την πρωτεΐνη πρόσδεσης βιταμίνης D (VDBP) αλλά και με την αλβουμίνη στον ορό και ως εκ τούτου απαιτεί μια αρχική εκχύλιση ή βήμα διάσπασης. Διάφοροι κατασκευαστές παρουσίασαν μεθόδους που χρησιμοποιούν παράγοντες που αποδεσμεύουν την 25(OH)D από την πρωτεΐνη δέσμευσης VDBP, με διαφορετικό βαθμό επιτυχίας η καθεμιά. Η ανάγκη να εκτοπίσει ανεπανόρθωτα τον αναλύτη από τη δεσμευτική πρωτεΐνη του στην περίπτωση των σφικτά δεσμευμένων 25(OH)D, περιλαμβάνει διάσπαση της VDBP,

συνήθως με μια αλλαγή του pH. Πρόσφατα δεδομένα προτείνουν ότι οι μέθοδοι που εφαρμόζουν τέτοιες τεχνικές μπορεί να επηρεαστούν από μεταβολές των συγκεντρώσεων της VDBP πιθανόν εξαιτίας της αυξημένης συγγένειας της 25(OH)D με ορισμένες παραλλαγές της VDBP. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα αξιολογούμενες παρεκκλίσεις των αποτελεσμάτων. Αυτές οι διαφορές στις συγκεντρώσεις χρησιμεύουν για να δώσουν έμφαση σε μερικά από τα προβλήματα της προτύπωσης των τρωινών (αλλά και προηγούμενων) μεθόδων.

- 3) Η 25(OH)D μπορεί να κυκλοφορεί ως 25(OH)D₂ και ως 25(OH)D₃ που διαφέρουν στην χημική τους δομή καθώς και στη συγγένεια τους με αντισώματα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμασίες και πρέπει να αναγνωρίσουμε τις δύο μορφές.
- 4) Διασταυρούμενες αντιδράσεις με ενώσεις που σχετίζονται δομικά με την 25(OH)D συμπεριλαμβανομένων 1,25(OH)₂D₂, 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D, λακτόνες τους και C-3 επιμερή D₂, D₃, οι οποίες σε μεμονωμένους ασθενείς μπορεί να οδηγήσουν ακόμη και σε λανθασμένα αποτελέσματα της βιταμίνης D.
- 5) Βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, στο εύρος picomolar για 25(OH)D₂ και 25(OH)D₃ και σε επίπεδα picomolar για 1,25(OH)₂D₃ [49].
- 6) Ένα άλλο πρόβλημα, κοινό για τις δοκιμασίες εκχύλισης και μη εκχύλισης, έγκειται στην προετοιμασία των προτύπων. Λόγω των υδρόφοβων ιδιοτήτων της 25(OH)D, τα διαλύματα stock παρασκευάζονται σε έναν οργανικό διαλύτη, συνήθως αιθανόλη. Τα εμπορικά σκευάσματα των 25(OH)D₃ και 25(OH)D₂ είναι άμεσα διαθέσιμα, αλλά μπορεί να περιέχουν προσμίξεις ή να διαφέρουν στην κρυσταλλική δομή τους. Ευτυχώς, οι ενώσεις έχουν ένα καλά χαρακτηρισμένο φάσμα απορρόφησης (AMAX στα 265 nm και AMIN στα 228 nm), αν και, περιέργως, εξακολουθεί να υπάρχει αβεβαιότητα σχετικά με τους συντελεστές, μοριακής απορρόφησης ιδιαίτερα της 25(OH)D₂. Τα πρότυπα διαλύματα θα πρέπει να βαθμονομούνται μετρώντας την απορρόφηση στο AMAX και η καθαρότητα ελέγχεται υπολογίζοντας την αναλογία AMAX:AMIN η οποία, εάν είναι μικρότερη από 1,5 δείχνει ότι το πρότυπο θα πρέπει να καθαριστεί εκ νέου ή να αντικατασταθεί. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας στις περισσότερες εμπορικές δοκιμασίες συχνά περιγράφονται ως «με βάση τον ανθρώπινο ορό» και παρασκευάζονται με προσθήκη μικρών όγκων ενός προτύπου διαλύματος σε ορό από τον οποίο η ενδογενής 25(OH)D έχει αφαιρεθεί. Μια τεχνική που χρησιμοποιείται συχνά για την αφαίρεση στεροειδών από πρωτεΐνες είναι η ανάμιξη του ορού με ενεργό άνθρακα. Ωστόσο, λόγω της σφικτής της σύνδεσης με την VDBP, η 25(OH)D δεν μπορεί να αφαιρεθεί με άνθρακα εκτός εάν ο ορός έχει προηγουμένως οξεινωθεί. Τόσο η αύξηση της οξύτητας όσο και η κατεργασία με άνθρακα δημιουργεί μια μήτρα (matrix) η οποία, παρόλο

που προέρχεται από ανθρώπινο ορό, διαφέρει σημαντικά από τα δείγματα ασθενών[50].

- 7) Ένα άλλο πιθανό πρόβλημα σε δοκιμασίες μη εκχύλισης είναι ότι ορισμένες μέθοδοι μπορεί να δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα σε δείγματα στα οποία έχει προστεθεί 25(OH)D in vitro. Φαίνεται ότι η εξωγενής 25(OH)D δεν ανακτάται πλήρως από τη διάσπαση της DBP, πιθανώς επειδή ένα μέρος συνδέεται εκλεκτικά με άλλα συστατικά ορού, όπως λιποπρωτεΐνες. Εν πάση περιπτώσει, η εξωγενής προσθήκη της 25(OH)D δεν φαίνεται να εισέρχεται και να ισορροπεί με το ενδογενές διαμέρισμα, και αυτό έχει επιπτώσεις στην παρασκευή των προτύπων και στα in vitro πειράματα ανάκτησης, τα αποτελέσματα των οποίων βασίζονται στην πεποίθηση ότι τα εμβολιασμένα δείγματα συμπεριφέρονται πανομοιότυπα με εκείνα που περιέχουν μόνο ενδογενή 25(OH)D. Αυτό μπορεί επίσης να είναι ένα πρόβλημα για εκείνα τα σχήματα ελέγχου της επάρκειας των εργαστηρίων τα οποία διανέμουν τακτικά δείγματα που περιέχουν εξωγενή 25(OH)D [50].

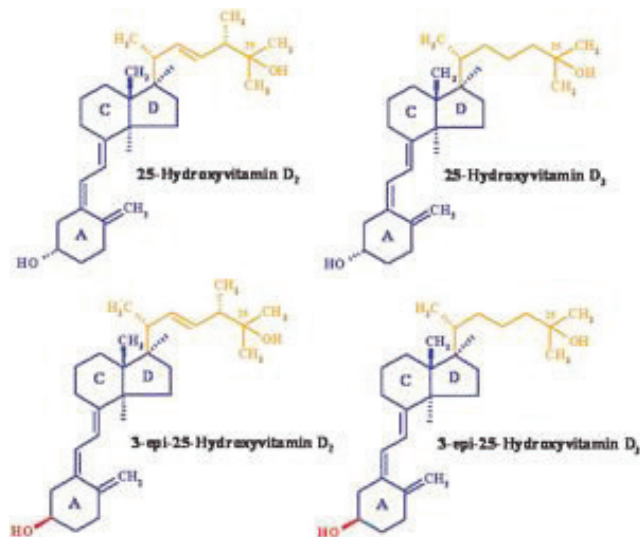
5.2 Η αναγνώριση της 24,25(OH)₂D από τις ανοσοδοκιμασίες

Η παραγωγή της συνδέεται με την ενεργοποίηση του CYP24A1 [24-(OH)άσης] στο νεφρό για την απενεργοποίηση της βιταμίνης D. Βρίσκεται υπό αυστηρή ρύθμιση από την PTH και τον FGF-23 γεγονός που αποτελεί κάτι παραπάνω από μια απλή διαδικασία καταβολισμού. Μπορεί να είναι παρούσα σε διάφορες συγκεντρώσεις μέχρι περίπου 10% (υψηλότερη στην υψηλότερη κλίμακα). Δεν δίνει παρεμβολές με μεθόδους LC-MS/MS μπορεί όμως να δώσει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έως 100% με κάποιες ανοσοδοκιμασίες. Αποτελεί σαφώς έναν δυνητικό παράγοντα σύγχυσης για τις ανοσολογικές δοκιμασίες.

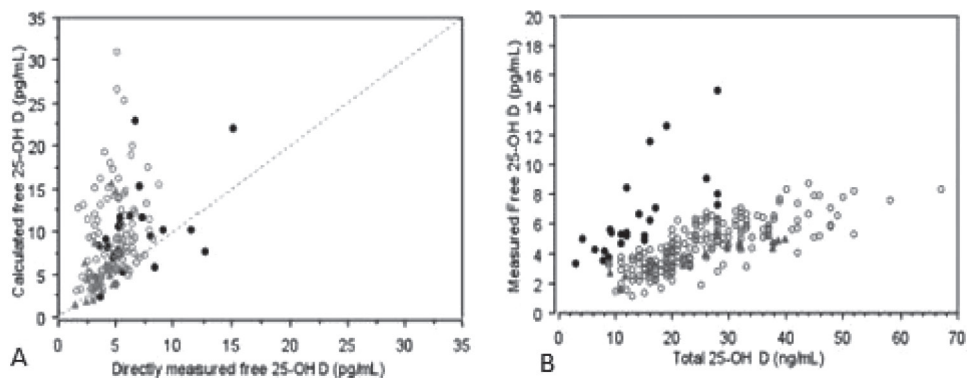
5.3 Η βιοδιαθέσιμη βιταμίνη D

Αν και η μέτρηση των επιπέδων της VDBP (κύρια πρωτεΐνη φορέας για τη βιταμίνη D), σε συνδυασμό με την ολική 25(OH)D θα μπορούσε ενδεχομένως να είναι μια χρήσιμη μέθοδος για την εκτίμηση της βιοδιαθέσιμης 25(OH)D, εντούτοις απαιτείται περισσότερη έρευνα σχετικά με τις μεθόδους για την μέτρηση και την ερμηνεία της βιοδιαθέσιμης 25(OH)D. Η μέτρηση της VDBP δεν αποτελεί μέρος της τρέχουσας καθιερωμένης κλινικής πρακτικής [52].

Η 25(OH)D είναι ένα στεροειδές και κυκλοφορεί συνδεδεμένο με VDBP, με αλβουμίνη αλλά και ως ελεύθερη 25(OH)D σε ποσότητες pg/ml. Η βιοδιαθέσιμη 25(OH)D είναι ίση με την 25(OH)D που είναι συνδεδεμένη με την αλβουμίνη συν την ελεύθερη 25(OH)D. Οι πολυμορφισμοί της VDBP και η συγγένισή αυτής μπορεί να έχουν αντίκτυπο στα επίπεδα ελεύθερης και βιοδιαθέσιμης 25(OH)D. Ορισμένες μελέτες έχουν δείξει ότι η βιοδιαθέσιμη 25(OH)



Εικ. 11. Ο επιμερισμός στη θέση C-3 [51].



Εικ. 12A. A) Σύγκριση μετρήσιμης και B) υπολογιζόμενης ελεύθερης 25(OH)D σε κλινικούς πληθυσμούς. (Τροποποιημένη από Schwartz, 2014 [54]).

D συσχετίζεται καλύτερα με την BMD σε νεαρούς υγιείς ενήλικες [52].

Μελέτες έχουν δείξει ότι η μέτρηση της 25(OH)D από μόνη της μπορεί να μην είναι αρκετή για να κατανοηθεί η σχέση μεταξύ της έκθεσης στην βιταμίνη D και των επιπτώσεων στην υγεία. Ως αποτέλεσμα, η προσοχή έχει στραφεί σε άλλες πτυχές της βιολογίας της βιταμίνης D. Περίπου το 90-95% της 25(OH)D είναι σφικτά συνδεδεμένο με την VDBP, η οποία σχετίζεται δομικά με την αλβουμίνη του ορού. Από το εναπομείναν ποσό 25(OH)D, περίπου το 1% είναι αδέσμευτο και το υπόλοιπο χαλαρά συνδεδεμένο με την αλβουμίνη του ορού.

Μια υπόθεση είναι ότι οι ελεύθερες και οι δεσμευμένες με την λευκωματίνη χαρακτηριστικές ομάδες είναι υπεύθυνες για την παροχή της 25(OH)D στο κύτταρο με την 25(OH)D την δεσμευμένη με VDBP να λειτουργεί ως δεξαμενή του μεταβολίτη.

Στους ανθρώπους, κοινοί γενετικοί πολυμορφισμοί παράγουν 3 κύριες παραλλαγές της VDBP στην κυκλοφορία (Gc1F, Gc2, και Gc1S), οι οποίες διαφέρουν στη συγγένειά τους με την 25(OH)D. Η επικράτηση αυτών των πολυμόρφων έχει αποδειχθεί ότι ποικίλλει αρκετά μεταξύ διαφορετικών εθνοτήτων και πληθυσμών, με την παραλλαγή Gc1F να είναι γενικά συχνότερη μεταξύ των ατόμων αφρικανικής καταγωγής. Σε μια πρόσφατη μελέτη που δημοσιεύεται στο *New England Journal of Medicine* [52] οι Rowe και συν. διερεύνησαν την επικράτηση των διαφορετικών φαινοτύπων VDBP (Gc1F, Gc2, και Gc1S) σε μια ομάδα μαύρων και λευκών Αμερικανών και εξετάστηκε η σχέση με τις συγκεντρώσεις 25(OH)D καθώς και με άλλες παραμέτρους. Σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες, η μελέτη αυτή περιλάμβανε μετρήσεις της συγκέντρωσης του VDBP στον ορό. Οι μαύροι Αμερικανοί βρέθηκαν να έχουν μια υπε-

ροχή του φαινοτύπου υψηλής συγγένειας για Gc1F, με τους ομοζυγώτες να έχουν περίπου το μισό της συγκέντρωσης της συνολικής VDBP που βρίσκεται σε λευκούς, στους οποίους η παραλλαγή Gc1S κυριαρχούσε. Η μέση συγκέντρωση της ολικής 25(OH)D ήταν επίσης χαμηλότερη σε μαύρους παρά σε λευκούς. Μια επιπρόσθετη πτυχή της μελέτης των Powe και συν. ήταν η εκτίμηση της «βιοδιαθέσιμης» 25(OH)D για τους ομοζυγώτες, χρησιμοποιώντας τις μετρούμενες συγκεντρώσεις της 25(OH)D και της VDBP και τις τιμές της βιβλιογραφίας για τις συγγένειες δέσμησης τους με την αλβουμίνη ή με συγκεκριμένες παραλλαγές της VDBP. Η βιοδιαθέσιμη 25(OH)D μετρήθηκε επίσης σε ένα υποσύνολο αυτών των δειγμάτων χρησιμοποιώντας μία ανταγωνιστική RIA δοκιμασία πρόσδεσης.

Με βάση τα αποτελέσματα τους, οι συγγραφείς βρήκαν ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις VDBP που βρέθηκαν σε μαύρους Αμερικανούς έχουν ως αποτέλεσμα συγκεντρώσεις της βιοδιαθέσιμης 25(OH)D που είναι παρόμοιες με εκείνες που βρέθηκαν στους λευκούς (υπολογιζόμενες τιμές 2.9 ng/mL και 3,1 ng/mL αντίστοιχα). Αυτό μπορεί να εξηγήσει το γιατί οι μαύροι Αμερικανοί μπορεί να έχουν προφανώς καλή υγεία των οστών τους παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων ολικής 25(OH)D. Αν αυτό αληθεύει, τα ευρήματα αυτά θα μπορούσαν να έχουν σοβαρές συνέπειες στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων της 25(OH)D. Οι ισχύουσες κατευθυντήριες γραμμές, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που δημοσιεύθηκαν πρόσφατα από το US Institutes of Medicine, δεν κάνουν διαχωρισμό μεταξύ των εθνοτήτων. Εάν τα αποτελέσματα της μελέτης των Powe και συν. επιβεβαιωθούν, οι κατευθυντήριες αυτές γραμμές θα πρέπει να επανεξεταστούν και μια νέα προσέγγιση για την αξιολόγηση της κατάστασης της βιταμίνης θα πρέπει πιθανόν να αναπτυχθεί, ενδεχομένως περιλαμβάνοντας τη μέτρηση της VDBP σε συνδυασμό με μια άμεση εκτίμηση της βιοδιαθέσιμης 25(OH)D [53].

5.4 Παρεμβολές matrix

Στην κλινική χημεία ο όρος matrix effect αναφέρεται στην επίδραση των υπολοίπων (εκτός της προς ανάλυση ουσίας) συστατικών ενός βιολογικού υλικού στην ποιότητα του εργαστηριακού αποτελέσματος. Το matrix effect είναι γνωστό ότι είναι ένα πρόβλημα στους ανοσοπροσδιορισμούς που μπορεί να οδηγήσει σε ψευδώς υψηλά αποτελέσματα [55]. Ο πιο σημαντικός τύπος του matrix effect είναι εκείνος που λαμβάνει χώρα μεταξύ της μήτρας σε βαθμονομητές και δείγματα ασθενών. Η λιπόφιλη φύση της 25(OH)D την καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτη στην παρουσία άλλων λιπιδίων στον ορό ή πλάσμα με αλλαγή στην ικανότητα του παράγοντα σύνδεσης να συνδεθεί με την 25(OH)D στο δείγμα και το πρότυπο με ισοδύναμο τρόπο. Ένα περαιτέρω πρόβλημα είναι ότι η 25(OH)D δεν μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια εκτός αν απελευθερωθεί από την ειδική πρωτεΐνη συνδέσεως της [56].

Πολλές από τις προηγούμενες διαδικασίες και ανοσοδοκιμασίες ανταγωνιστικής δέσμησης πρωτεΐνης, ενσωματώνουν ένα βήμα εκχύλισης διαλύτη για να απελευθερώσουν την 25(OH)D και να αφαιρέσουν τη δεσμευτική πρωτεΐνη. Οι HPLC και LC-MS/MS μέθοδοι χρησιμοποιούν είτε διαλύτη είτε εκχύλισης στερεάς φάσης. Πολλές σύγχρονες εμπορικές ανοσοδοκιμασίες χρησιμοποιούν αποδιατακτικό παράγοντα «in situ».

Υπάρχουν ενδείξεις ότι οι προγενέστερες CPB δοκιμασίες ήταν πιο επιρρεπείς σε επιδράσεις υποστρώματος από τις δοκιμασίες οι οποίες χρησιμοποιούν αντισώματα [56]. Άλλοι, όμως, υποστηρίζουν ότι οι σημερινές ανοσολογικές δοκιμασίες είναι επίσης επιρρεπείς σε matrix effect ιδιαίτερα εκείνες σε αυτοματοποιημένες πλατφόρμες. Οι CPB διαδικασίες δεν είναι οι μόνες που παρουσιάζουν προβλήματα matrix. Για την LC-MS/MS η καταστολή του ιόντος μπορεί να μειώσει την απόδοση του ανιχνευτή μάζας. Η καταστολή του ιόντος μπορεί να προκληθεί από την παρουσία μη πηκτικών ενώσεων, όπως άλατα, παράγοντες σύζευξης ιόντος, ενδογενείς ενώσεις και από ναρκωτικά ή μεταβολίτες. Matrix effects που σχετίζονται με τη συλλογή των δειγμάτων σε σωλήνες πηκτής για διαχωρισμό ορού από τα ερυθρά κύτταρα έχει πρόσφατα τεκμηριωθεί σε μια διαδικασία LC-MS/MS [57]. Προβλήματα matrix συνήθως μπορούν να ελαχιστοποιηθούν με την τροποποίηση των αντιδραστηρίων ή των χρωματογραφικών συνθηκών ή τη δυνατότητα επιλογής της μετάπτωσης ιόντων για την μέτρηση [58].

5.5 Οι κυριότερες μέθοδοι μέτρησης 25(OH)D

5.5.1 Ιστορική ανασκόπηση

Η ανάπτυξη των μεθόδων για τη μέτρηση της βιταμίνης D ξεκίνησε σχεδόν τέσσερις δεκαετίες πριν. Μια σύντομη ανασκόπηση των μεθόδων αυτών μπορεί να μας βοηθήσει να κατανοήσουμε τις σημερινές μεθοδολογικές δυσκολίες:

1971: Ο Haddad [59] ανέπτυξε μία ανταγωνιστική δοκιμασία σύνδεσης (CPBA) χρησιμοποιώντας την δεσμευτική πρωτεΐνη της βιταμίνης D (VDBP) ως αρχικό συνδετικό παράγοντα και την ^3H -25(OH) D_3 ως ιχνηθέτη. Η χρήση της περιορίστηκε μόνο στο εργαστήριο έρευνας. Οι CPBAs έχουν σοβαρά αναλυτικά προβλήματα λόγω της «επίδρασης μήτρας» που μπορεί να επηρεάσει την σύνδεση με την VDBP (χρησιμοποιείται εκχύλισμα αιθανόλης) και λόγω της ανάγκης να εφαρμοστεί μια προηγούμενη χρωματογραφία για καθαρισμό. Οι CPBAs ανιχνεύουν 25(OH) D_2 και 25(OH) D_3 , δηλαδή, μετρούν την συνολική βιταμίνη. Η 25(OH)D αφαιρείται από τον ορό χρησιμοποιώντας εκχύλιση με αιθέρα και διαχωρίζεται από άλλα λιπίδια με χρωματογραφία σε πυριτικό οξύ. Απώλειες κατά τη διαδικασία διορθώνονται με την προσθήκη τριτιωμένης 25(OH) D_3 σε κάθε δείγμα ως εσωτερικό πρότυπο. Ένα πλεονέκτημα αυτής της δοκιμασίας είναι ότι είναι συνειδι-

κή για 25(OH)D₃ και 25(OH)D₂, γεγονός που κάνει τη χρήση της κατάλληλη για την παρακολούθηση των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με ergocalciferol. Τα στάδια εκχύλισης διαλύτη και χρωματογραφίας καθιστούν τη μέθοδο λιγότερο επιρρεπή σε μη ειδική παρεμβολή από άλλα συστατικά ορού, ιδιαίτερα λιπίδια. Ωστόσο, η δοκιμασία είναι χρονοβόρα, απαιτεί δαπανηρό υγρό σύστημα μέτρησης σπινθηρισμού, και διάθεση των δύο ραδιενεργών και χημικών αποβλήτων.

1977: Ο Eisman[60]. εισήγαγε μια άμεση μέθοδο HPLC με ανίχνευση UV, η οποία συχνά δεν ήταν κατάλληλη για τα κλινικά εργαστήρια.

1985: Ο Hollis [61] ανέπτυξε ένα αντίσωμα που ήταν συνειδικό για 25(OH)D₂ και 25(OH)D₃ και σχεδίασε μια απλή μέθοδο εκχύλισης ακολουθούμενη από μη χρωματογραφική ποσοτικοποίηση.

1992: Αυτή η δοκιμασία περαιτέρω τροποποιήθηκε για να ενσωματώσει ¹²⁵I-επισημασμένο ιχνηθέτη και βαθμονομητές σε μια μήτρα ορού. Είναι εμπορικά διαθέσιμη σαν DiaSorin RIA [62].

2001: Η εταιρεία Nichols Διαγνωστικά εισήγαγε τη δοκιμασία ADVANTAGE. Αυτή ήταν μία CPBA που δεν απαιτούσε προηγούμενη εκχύλιση και χρησιμοποιούσε VDBP ως συνδετική ουσία. Αν και σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η δοκιμή ανίχνευσε τόσο 25(OH)D₂ και 25(OH)D₃, ήταν σε θέση να ανιχνεύσει 25(OH)D₃ μόνο [63]. Η εταιρεία απέσυρε τη δοκιμασία από την αγορά το 2006.

2004: η αέρια ή υγρή χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GC/LC-MS) υποτίθεται ότι είναι η πιο ακριβής μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιταμίνης D. Αυτή είναι η μέθοδος επιλογής από διάφορα εργαστήρια αναφοράς, αλλά η προετοιμασία των προτύπων και αντιδραστήριων δεν είναι τυποποιημένη, κι αυτό οδηγεί σε αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ εργαστηρίων. Αυτή η μέθοδος απαιτεί υψηλά εκπαιδευμένο προσωπικό και δεν είναι η πιο κατάλληλη για τα κλινικά εργαστήρια.

2004: Η DiaSorin Corporation παρουσίασε την αυτοματοποιημένη μέθοδο χημειοφωταύγειας LIASON 25(OH)D Total assay.

2008: Η Roche Diagnostic εισήγαγε μια αυτοματοποιημένη δοκιμασία ηλεκτροχημειοφωταύγειας για ειδική μέτρηση της 25(OH)D₃ στους Elecsys και Cobas αναλυτές [64].

Δεν ήταν παρά μέχρι το έτος 2000 που οι μέθοδοι μέτρησης της βιταμίνης D άρχισαν να αναπτύσσονται σε αυτοματοποιημένες πλατφόρμες, για κλινική εργαστηριακή χρήση. Πολλές μεθοδολογικές πτυχές ακόμη παραμένουν να καθοριστούν, συμπεριλαμβανομένων, (αλλά χωρίς να περιορίζονται σε αυτά), τη μέθοδο αναφοράς, τα διεθνή πρότυπα, την ιχνηλασιμότητα με βάση τα διεθνή πρότυπα, την ειδικότητα, δημιουργώντας τις μεγάλες διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται.

Έτσι, κάνοντας μια αναδρομική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας βρισκόμαστε διαφορές μεταξύ των απο-

τελεσμάτων από ορισμένους συγγραφείς, οι οποίοι χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθόδους μέτρησης. Το 1984, δημοσιεύτηκε μια διεθνή μελέτη 19 συμμετεχόντων εργαστηρίων συγκρίνοντας προσδιορισμούς για τη μέτρηση της 25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃ και 1,25(OH)₂D₃ σε πλάσμα, και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι: «Οι τιμές από διαφορετικά εργαστήρια προφανώς δεν μπορεί να συγκριθούν χωρίς να γίνει μια πραγματική σύγκριση των διαδικασιών προσδιορισμού. Επιπλέον, στην περίπτωση των κλινικών εφαρμογών αυτών των προσδιορισμών, καθένα εργαστήριο θα πρέπει να καθορίσει τις δικές του τιμές αναφοράς και πρέπει να χρησιμοποιεί συνεχώς ένα εσωτερικό δείγμα αναφοράς για την αξιολόγηση της ακρίβειας των διαδικασιών» [65].

Σήμερα υπάρχει ένας αρκετά μεγάλος αριθμός διαθέσιμων μεθόδων για τη μέτρηση της 25(OH)D σε ορό ή πλάσμα οι οποίες είναι δοκιμές δέσμησης πρωτεΐνης (CPB), ανοσοδοκιμές και άμεσες μέθοδοι ανίχνευσης.

Οι κυριότερες από αυτές είναι οι ακόλουθες:

- Ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA).
- Ενζυμική ανοσοδοκιμασία (EIA).
- Χημειοφωταύγεια.
- Ηλεκτροχημειοφωταύγεια.
- Υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC).
- Υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (LC/MS).
- LC/MS/MS.

5.5.2 Προδιαγραφές για την ακρίβεια των αναλύσεων

Τον Ιούνιο του 2009, οι Stöckl, Hondt D; και Thienpont [66] δήλωσαν σε μια δημοσίευση για την αναλυτική ποιότητα των μετρήσεων 25(OH)D σε ορό ή πλάσμα, ότι ήταν αναγκαίο να καθοριστούν προδιαγραφές για την πιστότητα και την ακρίβεια ενός συστήματος μέτρησης αναφοράς.

Αυτοί οι συγγραφείς συστήνουν για διαδικασίες ρουτίνας συντελεστή διακύμανσης (%CV) κάτω του 10% και απόκλιση κάτω από 5%. Η ECLIA πληροί αυτές τις αναλυτικές προδιαγραφές, (CV 8-10% και απόκλιση <2,0%). Η βιολογική μεταβλητότητα της βιταμίνης D μεταξύ ιδιωτών (BV₆) κυμαίνεται από 40% στο γενικό, μη επιλεγμένο πληθυσμό [67]. έως περίπου 20% σε στρωματοποιημένους πληθυσμούς (ηλικία, φύλο, κ.λπ.) με 8% ενδοατομική BV (BV₁)[68].

5.5.3 Ανοσολογικές μέθοδοι

Οι τρέχουσες εμπορικές ανοσολογικές δοκιμασίες παρέχονται ως κιτ που μπορεί να εφαρμόζονται χειροκίνητα ή σε αυτόματους αναλυτές. Με την αύξηση της κλινικής ζήτησης για δοκιμασίες 25(OH)D, οι γρήγοροι αυτοματοποιημένοι αναλυτές είναι προτιμώμενοι.

Οι κυριότερες ανοσολογικές αναλυτικές διαδικασίες που εφαρμόστηκαν στο παρελθόν και αυτές που εφαρμόζονται σήμερα καθώς επίσης και πληροφορίες για τις επιδόσεις της κάθε ανοσολογικής δοκιμής περιγράφονται παρακάτω.

5.5.3.1 *DiaSorin RIA*

5.5.3.1.1 *Αρχή της μεθόδου*

Η δοκιμασία DiaSorin 25(OH)D RIA αποτελείται από μία διαδικασία δύο σταδίων. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την ταχεία εκχύλιση 25(OH)D και άλλων υδροξυλιωμένων μεταβολιτών από ορό ή πλάσμα με ακετονιτρίλιο. Μετά την εκχύλιση, σε ένα δεύτερο στάδιο το επεξεργασμένο δείγμα αναλύεται με ανταγωνιστική RIA χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα με ειδικότητα σε 25(OH)D. Το δείγμα, το αντίσωμα και ο ιχνηθέτης επώαζονται για 90 λεπτά σε 20-25°C. Διαχωρισμός φάσης επιτυγχάνεται μετά από επώαση 20 λεπτών σε 20-25°C με ένα δεύτερο σύμπλοκο αντισώματος καθίζησης. Για να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα μετά από αυτήν την επώαση και πριν από την φυγοκέντρηση.

5.5.3.1.2 *Χαρακτηριστικά επίδοσης*

Σε δημοσευμένα δεδομένα του DEQAS το 2004, οι διοργανωτές του σχήματος σχολίασαν ότι η DiaSorin RIA είχε λιγότερο από 1% σφάλμα σε σχέση με όλα τα εργαστήρια που συμμετείχαν [63]. Από το 2004-2008 το μέσο ετήσιο σφάλμα σε DEQAS κυμαίνονταν -1,1 έως -5,4%. Την ίδια περίοδο η μέση κατά μέσο όρο διακύμανση μεταξύ των εργαστηρίων (CV%) κυμάνθηκε μεταξύ 16 και 20,5%. Η μέθοδος είχε μειωθεί σε δημοτικότητα, το 2001 αντιπροσώπευε το 60% των συμμετοχών DEQAS και αυτό έπεσε στο 7% το 2009. Δημοσιευμένες λεπτομερείς πληροφορίες που να τεκμηριώνουν τον ισχυρισμό του κατασκευαστή για όριο ανίχνευσης 4 nmol/L δεν ήταν διαθέσιμες. Το ένθετο στο kit του κατασκευαστή προτείνει ανάκτηση 100% τόσο για 25(OH)D₃ όσο και για 25(OH)D₂. Σε σύγκριση με την HPLC, ο Hollis αναφέρει ότι η DiaSorin RIA έχει ανάκτηση 91-100% για 25(OH)D₂ και για 25(OH)D₃ [69]. Άλλες μελέτες, πάντως, δείχνουν ότι DiaSorin RIA υποτιμά την 25(OH)D₂ σε σχέση με την HPLC. Σε ένα πείραμα ανάκτησης DEQAS πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο του 2005, χρησιμοποιώντας ορούς στους οποίους προστέθηκε 25(OH)D, αναφέρθηκε μια μέση ανάκτηση του 82% για την 25(OH)D₃ και 83% για την 25(OH)D₂ [70]. Οι ενημερωτικές εκθέσεις αξιολόγησης kit των κατασκευαστών δίνουν ακρίβεια <12 και <11% εντός και μεταξύ παρτίδων. Ακρίβεια σε αυτό το εύρος έχει επιβεβαιωθεί από ένα αριθμό μελετών. Μελέτες σύγκρισης της DiaSorin RIA με άλλες μεθόδους, συμπεριλαμβανομένης της HPLC (n=10), LC-MS/MS, η IDS-RIA, IDS-EIA και DiaSorin Liaison έχουν γίνει. Τα συμπεράσματα κυμαινόταν ανάλογα με το βαθμό συμφωνίας με την LC-MS/MS. Ορισμένες μελέτες διαπίστωσαν συσχετίσεις περίπου 0,91 ή 0,96. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα σε 551 δείγματα από το National Health and Nutrition Examination Study (NHANES), η DiaSorin RIA έδωσε χαμηλότερες τιμές από την LC-MS/MS σε χαμηλές συγκεντρώσεις και υψηλότερες τιμές σε υψηλές συγκεντρώσεις, με την LC-MS/MS δίνοντας μια μέση τιμή 13% υψη-

λότερη [71]. Σε μία σύγκριση με HPLC οι Turpeinen και συν. βρήκαν λογική συνολική συμφωνία (r 0.82, κλίση 1,02) αν και αρκετά δείγματα έδειξαν μεγάλες διαφορές [72]. Δύο μελέτες που συνέκριναν DiaSorin RIA και Liaison απέδωσαν διαφορετικά συμπεράσματα. Οι Souberbielle και συν βρήκαν ότι το Liaison δίνει χαμηλότερες τιμές από την DiaSorin RIA σε χαμηλές συγκεντρώσεις αλλά υψηλότερες σε υψηλές συγκεντρώσεις [73], ενώ οι Ibrahim και συν. διαπίστωσαν το αντίστροφο [74].

5.5.3.2 *Immunodiagnosics (IDS) RIA*

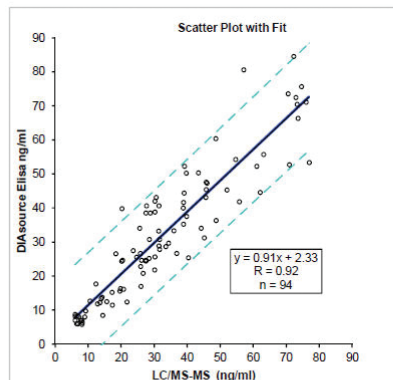
5.5.3.2.1 *Αρχή της μεθόδου*

Το kit IDS 25(OH)D RIA είναι μια πλήρης διαδικασία για την εκχύλιση και ποσοτικοποίηση της 25(OH)D και άλλων υδροξυλιωμένων μεταβολιτών σε ορό ή πλάσμα. Προσθήκη δύο αντιδραστηρίων σε δείγματα και βαθμονομητές προκαλεί καθίζηση των πρωτεϊνών του ορού και εκχύλιση της 25(OH)D. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, κατόπιν τα τμήματα του υπερκείμενου επώαζονται με ¹²⁵I-σημασμένη 25(OH)D (ιχνηθέτης) και με ένα αντίσωμα προβάτου πολύ ειδικό προς 25(OH)D. Διαχωρισμός του δεσμευμένου με το αντίσωμα ιχνηθέτη από το ελεύθερο επιτυγχάνεται με μια σύντομη επώαση με Sac-Cel[®] που ακολουθείται από φυγοκέντρηση και καθίζηση. Η δεσμευμένη ραδιενέργεια είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της 25(OH)D.

5.5.3.2.2 *Χαρακτηριστικά επίδοσης*

Από το 2004-2008 το μέσο ετήσιο σφάλμα DEQAS κυμαίνονταν από -10,5% έως +8,6%. Κατά την ίδια περίοδο η μέση διακύμανση των εργαστηρίων (CV%) κυμάνθηκε μεταξύ 13,1% και 15,2%. Το 2009 αυτή τη μέθοδο αντιπροσώπευε μόνο το 5% των συμμετοχών DEQAS. Καμία λεπτομερής δημοσιευμένη πληροφορία δεν ήταν διαθέσιμη για να τεκμηριώσει τον ισχυρισμό για όριο ανίχνευσης 3 nmol/L. Ένθετο του kit του κατασκευαστή προτείνει ανάκτηση 100% για 25(OH)D₃ και 75% για 25(OH)D₂. Εντούτοις στα πειράματα του DEQAS που πραγματοποιήθηκαν τον Ιούλιο του 2005 καταγράφηκε ανάκτηση 54% για 25(OH)D₃ και 29% για την 25(OH)D₂ [70]. Εφόσον η ανάκτηση από εξωγενώς προετοιμασμένες δεξαμενές ορών έχει αμφισβητηθεί για τις ανοσολογικές δοκιμές τα αποτελέσματα αυτά θα πρέπει να αντιμετωπίζονται με προσοχή. Ο Hollis ανέφερε ανάκτηση 92-95% για 25(OH)D₃ και 21-29% για 25(OH)D₂ [69]. Πληροφορίες αξιολόγησης των kit του κατασκευαστή αναφέρουν ακρίβεια εντός και μεταξύ παρτίδων <6,1% και <8,2%. Άλλες μελέτες αναφέρουν CV% μεταξύ προσδιορισμών 7-8%, <10% και 12% [69]. Οι Roth et al. ανέφεραν σφάλμα της τάξεως του -15% σε σύγκριση με LCMS [75]. Ενώ οι Carter et al. ανέφεραν σφάλμα -5% στο DEQAS το 2004. Οι Glendenning et al. δείχνουν ασθενή συσχέτιση με HPLC (R=0.6) και η κλίση του 0,64 με θετικό σφάλμα στις χαμηλές συγκεντρώσεις και αρνητικό σφάλμα στις υψηλές συγκεντρώσεις.

The DIAsource® 25-Hydroxyvitamin D Total ELISA is calibrated against the reference method ID-LC/MS-MS*



A correlation was performed with 94 serum samples comparing the DIAsource® 25-Hydroxyvitamin D Total ELISA to LC/MS-MS. The regression analysis demonstrated a slope of 0.91, an intercept of 2,33 ng/mL and a correlation of R= 0.92

* Candidate Reference Measurement Procedures for Serum 25-Hydroxyvitamin D₃ and 25-Hydroxyvitamin D₂ by Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (ID-LC/MS-MS), Clinical chemistry, 2011, Vol 57, 3, pag 411 - 44

Εικ. 12B. Βαθμονόμηση της διαδικασίας 25(OH) D Total ELISA [81].

Ο κατασκευαστής αναφέρει αναλυτικό εύρος από 1,6 έως 160,0 ng/ml, intra-assay precision [συντελεστής μεταβλητότητας (CV)] από 5,0% έως 6,1% για τιμές μεταξύ 10,6 και 60,4 ng/ml, και inter-assay precision (CV) 7.3-8.2% σε τιμές μεταξύ 7,84 και 54,4 ng/ml. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα αναφέρεται ότι είναι 75% για 25(OH)₂ και 100% για 25(OH)₃ [76]. Οι Barake και συν. χρησιμοποιώντας δείγματα 10 ασθενών, υπολόγισαν την intra-assay precision (CV) (αναλύθηκαν εις διπλούν) 4.62-2,9%, και την inter-assay precision 5,9% [77].

5.5.3.3 IDS ανοσοδοκιμασία ενζύμου (EIA)

5.5.3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Το IDS 25(OH)D EIA κιτ είναι μια **ενζυμική** ανοσοδοκιμή για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 25(OH)D και άλλων υδροξυλιωμένων μεταβολιτών σε ορό ή πλάσμα. Οι βαθμονομητές, οι μάρτυρες και τα δείγματα αραιώνονται με βιοτίνη επισημασμένη με 25(OH)D. Ένα κατάλληλο ρυθμιστικό αντιδραστήριο χρησιμοποιείται για την αποσύνδεση της 25(OH)D από τη δεσμευτική της πρωτεΐνη. Τα αραιωμένα δείγματα επωάζονται σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης τα οποία είναι επικαλυμμένα με υψηλής ειδικότητας αντίσωμα προβάτου 25(OH)D για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου πριν από την αναρρόφηση και πλύση. Το ένζυμο (horseradish peroxidase) σημασμένο με αβιδίνη, προστίθεται και δεσμεύεται επιλεκτικά σε σύμπλοκα βιοτίνης και, μετά από ένα ακόμη στάδιο πλύσης, αναπτύσσεται χρώμα χρησιμοποιώντας ένα χρωμογόνο υπόστρωμα (TMB). Η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη υδροχλωρικού οξέος και οι απορροφήσεις των δειγμάτων της αντίδρασης με-

Πίν. 2. Χαρακτηριστικά επίδοσης της IDS 25(OH)D EIA. (Τροποποιημένος από <http://www.idsplc.com> [76]).

ΟΡΙΟ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ	5nmol/L
ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ	25(OH)D ₃ 100% 25(OH)D ₂ 75%
ΕΥΡΟΣ ΤΙΜΩΝ	66-360 nmol/L
ΑΚΡΙΒΕΙΑ	CVs within run <8% CVs between run <10%

τρώνται σε ειδικό φωτόμετρο. Η ένταση του χρώματος που αναπτύσσεται είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συγκέντρωση της 25(OH)D.

5.5.3.3.2 Χαρακτηριστικά επίδοσης

Από το 2004-2006 το μέσο ετήσιο σφάλμα DEQAS έχει κυμανθεί από +5.7 έως +23%. Η δοκιμασία επαναβαθμονομήθηκε το 2006 με σημαντική μείωση του θετικού σφάλματος σε περίπου 5%. Μεταξύ 2004 και 2008 η μέση διακύμανση (CV%) κυμάνθηκε μεταξύ 14,1 και 18,4%. Το 2009 η μέθοδος αυτή αντιπροσώπευε το 19% των συμμετοχών DEQAS. Δεν δημοσιεύονται αναλυτικά στοιχεία που να τεκμηριώνουν τον ισχυρισμό των κατασκευαστών για όριο ανίχνευσης 5 nmol/L. Αποτελέσματα από το DEQAS υποδεικνύουν μέτρια έως χαμηλή ανάκτηση για αυτή την ανάλυση (56% για 25OHD₂, 79% για 25OHD₃) χρησιμοποιώντας εξωγενώς προπαρασκευασμένες δεξαμενές ορών [70]. Σύμφωνα με τους Hyrrphen και συν. τα εντός της μεθόδου CVs κυμαινόταν από

Specificity



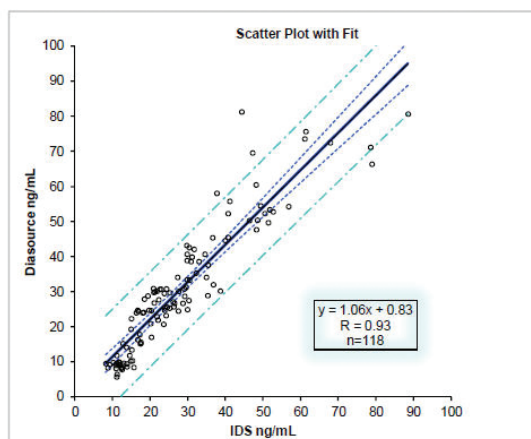
The percentage of cross reaction estimated by comparison of the concentration yielding a 50 % inhibition are respectively :

Compound	Cross-Reactivity (%)
25OH-Vitamin D ₃	100 %
25OH-Vitamin D ₂	83%
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃	50%
1,25(OH) ₂ -Vitamin D ₂	<0,2%
Vitamin D ₃	<0,2%
Vitamin D ₂	<0,2%
24,25(OH) ₂ -Vitamin D ₃	>= 100%
25,26(OH) ₂ -Vitamin D ₃	>= 100%
3-epi-25 hydroxyvitamin D ₃	<0,2%

The assay performance is not affected by hemolysis (5g/L hemoglobin tested), bilirubinemia (0,5g/L bilirubin tested) or triglycerides (5g/L tested).

Πίv. 3. Ειδικότητα της μεθόδου DIAsource® 25-HYDROXYVITAMIN D TOTAL ELISA [81].

Correlation with IDS ELISA



A correlation was performed with 118 serum samples comparing the DIAsource® 25-Hydroxyvitamin D Total ELISA to the IDS ELISA assay. The regression analysis demonstrated a slope of 1.06, an intercept of 0,83 ng/mL and a correlation of R= 0.93

Εικ. 13. Συσχέτιση της DIAsource® 25-HYDROXYVITAMIN D TOTAL ELISA με την IDS ELISA[81]

Accuracy (recovery)



RECOVERY TEST	
Added 25OH-Vit D3 (ng/mL)	Recovery (%)
0	100
25	95
50	92
Added 25OH-Vit D2 (ng/mL)	Recovery (%)
0	100
25	105
50	95

Πίv. 4. Ακρίβεια (ανάκτηση) της DIAsource® 25-HYDROXYVITA. MIN D TOTAL ELISA [81].

5,3% έως 7,4% και μεταξύ των μεθόδων τα CVs ήταν από 5,1% έως 11,7% ανάλογα με τη συγκέντρωση, με χαμηλότερα CVs σε υψηλές συγκεντρώσεις [78]. Σύμφωνα με αυτούς η IDS EIA έδωσε χαμηλότερες τιμές (13-15 nmol/L), είτε σε σχέση με DiaSorin RIA είτε με το DEQAS ALTM με σφάλμα που αυξάνεται με τη συγκέντρωση. Οι Kimball και Vieth ανέφεραν ότι η μέθοδος IDS EIA που τρέχει στον αναλυτή NEXgenis είναι απλούστερη, ταχύτερη και ασφαλέστερη από την RIA [79]. Η μελέτη των Roth και συν. αναφέρει ένα σημαντικό αρνητικό σφάλμα για την EIA σε σχέση με LC-MS/MS (-21%). Χρησιμοποιώντας διαφορετικό αναλυτή (Triturus), ο Knox ανέφερε ότι η IDS EIA συγκρίνεται καλά με LC-MS/MS ($r=0.96$) αν και ο συσχετισμός ήταν φτωχότερος σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της 25(OH)D (>125 nmol/L) όπου ο ανοσοπροσδιορισμός είχε θετικό σφάλμα [80].

5.5.3.4 DIAsource® 25-HYDROXYVITAMIN D TOTAL ELISA

Η DIAsource® 25-HYDROXYVITAMIN D TOTAL ELISA είναι μια ανταγωνιστική ELISA με ένα νέο βήμα προ-επεξεργασίας. Κατά τη διάρκεια της πρώτης επώασης 2 ωρών, σε θερμοκρασία δωματίου, η 25(OH)D (D_2 και D_3) που εμπεριέχεται στους βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και στα δείγματα διαχωρίζεται από τις δεσμευτικές πρωτεΐνες ορού και καθιλώνεται σε θέσεις πρόσδεσης ενός ειδικού μονοκλωνικού αντίσωμα (DIAsource πατέντα). Μετά από μια πλύση ένα σταθερό ποσό 25(OH)D επισημασμένο με βιοτίνη παρουσία υπεροξειδάσης ραπανιού (HRP), ανταγωνίζεται με μη σημασμένη 25(OH) D_2 και 25(OH) D_3 παρούσα στις θέσεις δέσμευσης του ειδικού μονοκλωνικού αντισώματος. Μετά από επώαση 30 λεπτών σε θερμοκρασία δωματίου, η πλάκα πλένεται για να σταματήσει η αντίδραση ανταγωνισμού. Το χρωμογόνο διάλυμα (TMB) προστίθεται και επωάζεται για 15 λεπτά. Η αντίδραση διακόπεται με την προσθήκη κατάλληλου διαλύματος και η πλάκα κατόπιν διαβάζεται στο κατάλληλο μήκος κύματος. Η ποσότητα του υποστρώματος καθορίζεται χρωματομετρικά μετρώντας την απορρόφηση, η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της 25(OH)D (D_2 και D_3).

5.5.3.4.1 Χαρακτηριστικά επίδοσης

(Εικόνες 12B, 13, Πίνακες 3, 4).

5.5.3.5 DiaSorin Liaison αυτοματοποιημένη ανοσολογική δοκιμή

5.5.3.5.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της 25(OH)D είναι άμεση, ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (CLIA) σε έναν αυτόματο αναλυτή. Ειδικό αντίσωμα της βιταμίνης D χρησιμοποιείται για την επικάλυψη μαγνητικών σωματιδίων (στερεά φάση) και η βιταμίνη D συνδέεται με ένα παράγωγο ισολουμινόλης. Κατά τη διάρκεια της επώασης, η 25(OH)D αποσυνδέεται από την πρωτε-

ΐνη δέσμευσής της και ανταγωνίζεται με την επισημασμένη βιταμίνη D για δεσμευτικές θέσεις του αντισώματος. Μετά την επώαση, το μη δεσμευμένο υλικό απομακρύνεται με έναν κύκλο πλύσεως. Στη συνέχεια τα αντιδραστήρια starter προστίθενται και μια αντίδραση χημειοφωταύγειας ενεργοποιείται. Το φωτεινό σήμα μετριέται με έναν φωτοπολλαπλασιαστή ως σχετικές μονάδες φωτός (RLUs) και είναι αντιστρόφως ανάλογο με τη συγκέντρωση της 25(OH)D που υπάρχει σε βαθμονομητές, μάρτυρες, ή δείγματα. Αυτή η μέθοδος καταργήθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια του 2008 και έχει σήμερα αντικατασταθεί από την DiaSorin Liaison Total assay.

5.5.3.5.2 Χαρακτηριστικά επίδοσης

Από το 2004-2008 το μέσο ετήσιο σφάλμα DEQAS κυμαίνονταν από -16,9 έως -7,9%. Κατά την ίδια περίοδο η μέση διακύμανση (CV%) κυμάνθηκε μεταξύ 17,6 και 21,6%. Οι κατασκευαστές ισχυρίζονται ότι η ακρίβεια εντός αλλά και μεταξύ παρτίδων είναι <11,3 και <14,6%, αντίστοιχα, σημαντικά χαμηλότερη από τις δημοσιευμένες τιμές. Τα CVs της μεθόδου κυμαίνονταν από 8-21% και τα CVs μεταξύ των μεθόδων ήταν μεταξύ 8-34% [75]. Οκτώ μελέτες συνέκριναν την DiaSorin Liaison με άλλες μεθόδους. Σύμφωνα με το DEQAS, η ανάκτηση χρησιμοποιώντας μεθόδους DiaSorin Liaison ήταν καλή (81% για 25(OH) D_3 και 89% για την 25(OH) D_2 σε συγκέντρωση 36 nmol/L [70]). Δύο μελέτες συνέκριναν την DiaSorin Liaison με την DiaSorin RIA. Οι Souberbielle και συν. ανέφεραν, ότι και οι δύο μέθοδοι έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα, αν και το Liaison είχε την τάση να δίνει χαμηλότερα αποτελέσματα σε χαμηλές συγκεντρώσεις και υψηλότερα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι Ibrahim και συν. ανέφεραν ότι η μέθοδος Liaison έδωσε υψηλότερα αποτελέσματα και στα δύο άκρα. Οι Ibrahim και συν. έδωσαν τιμές για τα μεταξύ προσδιορισμών CVs 15% στα 30 nmol/L και 5% στα 117 nmol/L [74]. Οι Kimball και Vieth σύγκριναν ένα πριν το 2007 Liaison με το IDS EIA και βρήκαν μια μέτρια συσχέτιση ($r 0,77$ [79]).

5.5.3.6 Diasorin Liaison Total Automated Immunoassay

5.5.3.6.1 Αρχή της μεθόδου

Το 2004, η DiaSorin εισήγαγε μια δοκιμή χημειοφωταύγειας για χρήση σε αναλυτή Liaison. Αυτή η δοκιμασία χρησιμοποίησε το ίδιο αντίσωμα όπως η RIA αλλά δεν περιλαμβάνει το στάδιο εκχύλισης του δείγματος. Η Liaison Total είναι μια δοκιμασία χωρίς εκχύλιση που χρησιμοποιεί μια δική της τεχνική για να εκτοπίσει την 25(OH)D από την πρωτεΐνη σύνδεσης. Σύμφωνα με τους κατασκευαστές, η μετατόπιση είναι πλήρης εντός της περιοχής μέτρησης του προσδιορισμού (10-375 nmol/L) [50].

Η δοκιμασία Liaison Total 25(OH)D είναι άμεση ανταγωνιστική ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας (CLIA) για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ολικής 25(OH)D σε ορό ή πλάσμα σε μια αυτοματοποιημένο πλατφόρμα. Είναι μια αναδιαμόρφωση της αρχικής

μεθόδου DiaSorin Liaison. Το ίδιο αντίσωμα χρησιμοποιείται και εδώ όμως τώρα σε μια διαδικασία επώασης δύο σταδίων. Κατά την πρώτη επώαση, η 25(OH)D διαχωρίζεται από τη δεσμευτική της πρωτεΐνη και δεσμεύεται σε ένα ειδικό αντίσωμα επί της στερεάς φάσεως. Μετά από 10 λεπτά ο ιχνηθέτης (βιταμίνη D συνδεδεμένη με ένα παράγωγο ισολουμινόλης) προστίθεται. Μετά τη δεύτερη διάρκεια 10 λεπτών επώαση, το μη δεσμευμένο υλικό απομακρύνεται με ένα κύκλο πλύσης. Στη συνέχεια, τα αντιδραστήρια starter προστίθενται για την έναρξη μιας αντίδρασης χημειοφωταύγειας. Το φωτεινό σήμα μετريέται με έναν φωτοπολλαπλασιαστή ως σχετικές μονάδες φωτός (RLUs) και είναι αντιστρόφως ανάλογο με τη συγκέντρωση της 25(OH)D σε βαθμονομητές, μάρτυρες, ή δείγματα.

5.5.3.6.2 Χαρακτηριστικά επίδοσης

Η μέθοδος αυτή αντικατέστησε τη μέθοδο DiaSorin Liaison από το 2007. Το μέσο ετήσιο σφάλμα DEQAS το 2008 ήταν 9% και η μεταξύ των εργαστηρίων ακρίβεια (%CV) ήταν 15,5. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά δημοφιλής και το 2009 αντιπροσώπευσε το 36% των συμμετοχών DEQAS. Ο κατασκευαστής αναφέρει ένα αναλυτικό εύρος 4-150 ng/ml, ενδοαναλυτική μεταβλητότητα 7.7-12.7% σε τιμές μεταξύ 5,8 και 35 ng/ml, και μεταβλητότητα inter-assay 11,6 έως 25% για τιμές μεταξύ 5,8 και 35 ng/ml. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα έχει αναφερθεί από τον κατασκευαστή ότι είναι 104% για 25(OH)D₂ και 100% για 25(OH)D₃ [82]. Ωστόσο, οι Barake και συν. στο εργαστήριο τους, την εκτίμησαν αντίστοιχα στο 90% για την 25(OH)D₃ και 67% για την 25(OH)D₂, με βάση την CAP Accuracy-Based Vitamin D survey 2011 [77].

Η ακρίβεια μεταξύ παρτίδων μικρότερη από 12,2% σύμφωνα με τους ισχυρισμούς των κατασκευαστών επαληθεύτηκε στη μελέτη των Roth και συν. Οι συγγραφείς έκαναν επίσης συγκριτική μελέτη μεταξύ της DiaSorin Liaison και της νεότερης Liaison Total και LC-MS/MS. Σε σύγκριση με την αρχική Liaison, οι Roth και συν ανέφεραν χαμηλότερα CVs (8-10% έναντι 13-15%), υψηλότερη συσχέτιση με LC-MS/MS (0,95 έναντι 0,90) και μικρότερο σφάλμα (-8% έναντι -21%) για το Liaison Total. Η DiaSorin Liaison Total παραμένει σήμερα η πιο δημοφιλής μέθοδος εντός του DEQAS. Σε σύγκριση με την αρχική Liaison, οι Roth και συν ανέφεραν ότι η Liaison Total έχει χαμηλότερα CVs, υψηλότερη συσχέτιση με LC-MS/MS (r 0.95) και μικρότερο σφάλμα (-8%) [75]. Οι αναλύσεις ισχυρίζονται συνειδικότητα για 25(OH)D₃ και 25(OH)D₂, το 3-επιμερές της 25(OH)D δηλώνεται ως μη ανιχνεύσιμο από κάθε δοκιμασία [50].

5.5.3.7 IDS ISYS Automated Immunoassay

5.5.3.7.1 Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή εισήχθη στις αρχές του 2009. Η δοκιμασία βασίζεται στην τεχνολογία χημειοφωταύγειας εκτελούμενη σε μια αυτοματοποιημένη πλατφόρμα. Τα δείγματα υποβάλλονται σε ένα στά-

Πίν. 5. Χαρακτηριστικά επίδοσης της IDS ISYS AUTOMATED IMMUNOASSAY.

Limit of Quantitation	5.5 ng/mL (13.75 nmol/L)
Dynamic Range	5 - 140 ng/mL (12.5-350 nmol/L)
Specificity	25-hydroxyvitamin D ₃ 100% 25-hydroxyvitamin D ₂ 100% 24,25-hydroxyvitamin D ₃ > 100% Cholecalciferol (D ₃) 2.7% Ergocalciferol (D ₂) 2.7%

<http://www.idsplc.com>

διο προ-επεξεργασίας για τη μετουσίωση της VDBP, η εκτόπιση της 25(OH)D από VDBP πιστεύεται ότι περιλαμβάνει μια αλλαγή του pH. Στη συνέχεια τα επεξεργασμένα δείγματα εξουδετερώνονται σε ρυθμιστικό διάλυμα και προστίθεται ένα ειδικό αντι-25(OH)D αντίσωμα επισημασμένο με ακριδίνιο. Μετά από ένα στάδιο επώασης, μαγνητικά σωματίδια που συνδέονται με την 25(OH)D προστίθενται. Μετά από ένα περαιτέρω στάδιο επώασης, το μαγνητικά σωματίδια «συλλαμβάνονται» χρησιμοποιώντας ένα μαγνήτη. Μετά την πλύση και προσθήκη των αντιδραστηρίων ενεργοποίησης, το φως που εκπέμπεται από το ακριδίνιο είναι αντιστρόφως ανάλογο προς τη συγκέντρωση της 25(OH)D στο αρχικό δείγμα.

5.5.3.7.2 Χαρακτηριστικά επίδοσης

Σύμφωνα με τους κατασκευαστές, η μέθοδος φαίνεται να είναι συνειδική για 25(OH)D₃ και 25(OH)D₂. Οι δοκιμασίες IDS δεν ανιχνεύουν 3-επι25(OH)D. Έχει λάβει έγκριση από τον FDA για διαγνωστική χρήση στις ΗΠΑ. Επιπλέον, στην έρευνα του DEQAS το 2008, οι δύο αναλύσεις IDS έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με την DiaSorin RIA σε δείγμα περιέχει ενδογενή 25(OH)D₂. Ο λόγος για αυτή την μεταβλητότητα στην ανάκτηση της 25(OH)D₂ είναι ασαφής, αλλά μπορεί να αντανακλά διαφορές μήτρας μεταξύ των δειγμάτων. Σε δύο σετ, τα πρότυπα παρασκευάζονται με προσθήκη εξωγενούς 25(OH)D₃ σε ανθρώπινο ορό ελεύθερο λιπιδίων. Οι τιμές έχουν τεθεί από ένα σύνολο πρωτογενών προτύπων αναφοράς που παρασκευάζονται από ένα μητρικό διάλυμα 25(OH)D βαθμονομημένο με φασματοφωτομετρία UV [50].

5.5.3.8 ROCHE COBAS VITAMIN D TOTAL

5.5.3.8.1 Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για μέθοδο δέσμευσης ηλεκτροχημειοφωταύγειας, προοριζόμενη για χρήση στους αυτόματους αναλυτές Elecsys και cobas e. Το δείγμα αρχικά επώαζεται με τα αντιδραστήρια προεπεξεργασίας και έτσι η δεσμευμένη 25(OH)D απελευθερώνεται από την VDBP. Ακολουθεί δεύτερη επώαση με την σημασμένη με ρουθίνιο πρωτεΐνη δεσμεύσεως

Analytical specificity

The specificity was assessed with the following analytes at 50 % binding of B₀

Cross-reactant	Cross-reactivity (%)
25-hydroxyvitamin D ₃	100
25-hydroxyvitamin D ₂	92
24,25-dihydroxyvitamin D ₃	149
C3-epimer of 25-hydroxyvitamin D ₃	91
1,25-dihydroxyvitamin D ₃	not detectable
1,25-dihydroxyvitamin D ₂	not detectable
Vitamin D ₃	not detectable
Vitamin D ₂	not detectable

Πίνακ. 6. Αναλυτική ειδικότητα της δοκιμασίας ROCHE COBAS VITAMIN D TOTAL [83].

Cross-Reactant	Concentration ng/mL	% Cross- Reactivity ^a
25-OH vitamin D ₃	100	105
Vitamin-D ₂ (Ergocalciferol)	1000	0.1
Vitamin-D ₃ (Cholecalciferol)	1000	0.3
24,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃	20	112
1,25-(OH) ₂ -vitamin D ₃	100	12.6
3-epi 25-OH vitamin D ₃	100	2.7
Paricalcitol (Zemplar)	24	0.4

$$^a \text{ \% Cross-Reactivity} = \frac{\text{Mean Value spiked (ng/mL)} - \text{Mean Value non spiked (ng/mL)}}{\text{Concentration of Cross-Reactant (ng/mL)}} \times 100$$

The 25-OH vitamin D₂ % Cross-Reactivity* has been determined using endogenous (non-spiked) serum samples. The samples were analyzed with a chromatographic method (LC-MS/MS) in order to determine 25-OH vitamin D₂ and 25-OH vitamin D₃ concentration. Samples have been included in the testing that showed a 25-OH vitamin D₂ to 25-OH vitamin D₃ ratio of ≥ 10 and 25-OH vitamin D₃ concentration < 5.0 ng/mL.

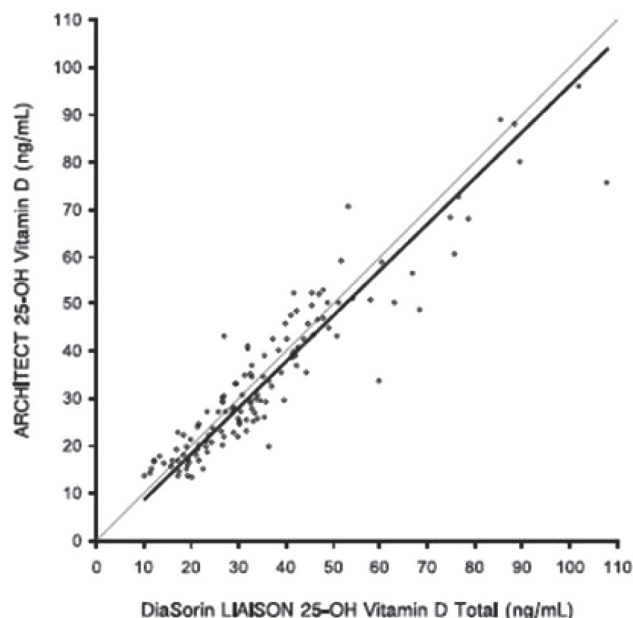
$$^* \text{ D}_2 \text{ \% Cross-Reactivity} = \frac{25\text{-OH vitamin Total (Arch)} - 25\text{-OH vitamin D}_3 \text{ (LC - MS/MS)}}{25\text{-OH vitamin D}_2 \text{ (LC - MS/MS)}} \times 100$$

The mean D₂ % Cross-Reactivity for ARCHITECT 25-OH Vitamin D was 82.

Πίνακ. 7. Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα της Abbott Architect Assay [84].

της βιταμίνης D και σχηματίζεται έτσι ένα σύμπλοκο μεταξύ αυτών των δύο. Μετά την προσθήκη μικροσφαιριδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη και 25(OH)D σημασμένης με βιοτίνη οι μη δεσμευμένες και σημασμένες με ρουθίνιο πρωτείνες δέσμευσης της βιταμίνης D δεσμεύονται. Σχηματίζεται έτσι ένα σύμπλοκο που αποτελείται από τη ρουθηνιλιωμένη πρωτεΐνη δέσμευσης και τη βοτινυλιωμένη 25(OH) D το οποίο δεσμεύεται στη στερεά φάση μέσω αλληλεπίδρασης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη. Το μείγμα αντίδρασης εισάγεται με αναρρόφηση στο θάλαμο μέτρησης, όπου τα μικροσφαιρίδια δεσμεύονται μαγνητικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι μη δεσμευμένες ουσίες απομακρύνονται. Η εφαρμογή τάσης στο ηλεκτρόδιο προκαλεί κατόπιν την εκπομπή χημειοφωταύγειας, η οποία μετράται

ARCHITECT 25-OH Vitamin D vs. DiaSorin LIAISON
25-OH Vitamin D Total (Passing-Bablok)



Εικ. 14. Σύγκριση Abbott Architect 25-OH Vitamin D με Diasorin LIAISON [84].

με φωτοπολλαπλασιαστή. Τα αποτελέσματα προσδιορίζονται από μια καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία παράγεται ειδικά για κάθε αναλυτή, μέσω μιας διαδικασίας βαθμονόμησης δύο σημείων και μιας πρότυπης καμπύλης που λαμβάνεται μέσω του γραμμικού κώδικα των αντιδραστηρίων.

5.5.3.8.2 Χαρακτηριστικά επίδοσης

Οι κατασκευαστές δίνουν αναλυτική ειδικότητα 100% για την 25(OH)D₃ και 92% για την 25(OH)D₂, η συσχέτιση με την LC-MS/MS σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων (n=903) είναι αρκετά υψηλή (r=0,894), η λειτουργική ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίστηκε ότι είναι 4 ng/mL. Το εύρος μέτρησης κυμαίνεται από

3.00-7.00 ng/mL (οριζόμενο από το όριο ανίχνευσης και το ανώτατο σημείο της πρότυπης καμπύλης).

5.5.3.9 ARCHITECT- ABBOTT 25-OH VITAMIN D

5.5.3.9.1 Αρχή της μεθόδου

Η εξέταση ARCHITECT 25(OH)D αποτελεί μία επιβραδυνόμενη μικροσωματιδιακή ανοσοεξέταση **χημειοφωταύγειας** (CMIA) ενός σταδίου, συμπεριλαμβανομένης της αυτόματης προεπεξεργασίας του δείγματος, για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιταμίνης D σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα. Η αυτόματη προεπεξεργασία του δείγματος απαιτείται για την απελευθέρωση του συμπλέγματος της βιταμίνης D από τη συνδεδεμένη πρωτεΐνη (VDBP) στο δείγμα. Αναλυτικότερα, το δείγμα επωάζεται με αραιωτικό διάλυμα και προκύπτει ελεύθερη βιταμίνη D. Προστίθενται παραμαγνητικά μικροσωματίδια επικαλυμμένα με αντισώματα βιταμίνης D έναντι της ανθρώπινης IgG (προβάτου, πολυκλωνικά). Μετά από επώαση προστίθεται συνδεδετικό σύμπλεγμα βι-οτινοποιημένης βιταμίνης D (ποντίκι, μονοκλωνικά) έναντι της βιοτίνης, με σήμανση ακριδίνης. Το σύμπλεγμα που σχηματίζεται συνδέεται με ελεύθερες θέσεις δέσμησης των αντισωμάτων βιταμίνης D. Ακολουθεί πλύσιμο για την απομάκρυνση των μη δεσμευμένων ουσιών. Τελικά με την προσθήκη διαλυμάτων ενεργοποίησης παράγεται φωτεινό σήμα που μετράται και σχετίζεται έμμεσα με τη συγκέντρωση βιταμίνης D στο δείγμα.

5.5.3.9.2 Χαρακτηριστικά επίδοσης

Αυτή η άμεση ανοσολογική δοκιμή χημειοφωταύγειας μικροσωματιδίων για τη μέτρηση της ολικής 25(OH)D εγκρίθηκε από το FDA στις 30 Νοεμβρίου 2011. Σύμφωνα με τους κατασκευαστές η μέθοδος αυτή ανιχνεύει και τις δύο μορφές (D_3 και D_2). Αναφέρεται ότι έχει διασταυρούμενη αντίδραση για 25(OH) D_3 , 25(OH) D_2 και 3-επι-25(OH) D_3 105%, 82% και 2,7% αντίστοιχα, η ακρίβεια (CV%) είναι 2,6%-4,6%, το αναλυτικό εύρος μέτρησης 13-96 ng/mL. Υπάρχει υψηλή συσχέτιση με τη μέθοδο LC-MS/MS χρησιμοποιώντας τη μέθοδο γραμμικής παλνδρόμησης Passing-Bablok (συντελεστής συσχέτισης 0,90 κλίση 1,01 και τεταγμένη -1,45). Εφαρμόζεται σε ορό ή πλάσμα:K-EDTA, ηπαρινικό λίθιο, ηπαρινικό νάτριο (σφάλμα -13% σε σχέση με τον ορό) [84].

5.5.3.10 SIEMENS CENTAUR XP THE CENTAUR2 DIRECT CHEMILUMINESCENT ASSAY FOR 25(OH) D

Αυτή η μέθοδος εφαρμόζεται στον αυτόματο αναλυτή Centaur XP και έχει εγκριθεί από τον Food and Drug Administration (FDA) τον Οκτώβριο 2011. Έχει αναφερθεί ότι δίνει διασταυρούμενη αντίδραση με 25(OH) D_3 , 25(OH) D_2 και 3-επι-25(OH) D_3 100,7%, 104,5% και 1,1%, αντίστοιχα. Έχει αναλυτικό εύρος μέτρησης 3,7 έως 150 ng/mL και run-to-run CVs από 4,8% έως 11,1% [85].

Crossreactant	Concentration (ng/mL)	Expected (Endogenous) Vitamin D Total (ng/mL)	Observed Vitamin D Total (ng/mL)	Cross-reactivity (%)
25-(OH)-Vit D_3	27	0	27	100
25-(OH)-Vit D_2	30	27	58	102
Vitamin D_2	100	27	28	0.04
Vitamin D_3	100	27	28	0.04
3-epi-25(OH) D_3	100	27	27	0.0

Πίν. 8A. Διασταυρούμενη ανηδραστικότητα της Siemens Assay.

5.5.4 Φασματομετρία

Οι αναλύσεις της κυκλοφορούσας 25(OH)D και των μεταβολιτών της είναι δυνατό να προσδιοριστούν επίσης με υγρή χρωματογραφία / φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) [87].

Όλες οι φασματοσκοπικές τεχνικές ανάλυσης βασίζονται στην ίδια θεμελιώδη αρχή: τα υπάρχοντα μόρια βρίσκονται αρχικά στη θεμελιώδη ενεργειακή στάθμη και όταν προσπέσει επάνω τους ποσότητα ενέργειας συγκεκριμένης συχνότητας, τα μόρια την απορροφούν και μεταβαίνουν σε υψηλότερες ενεργειακές στάθμες. Σε κάθε περίπτωση, τα μόρια επανέρχονται τελικά στη θεμελιώδη τους κατάσταση και η όλη διαδικασία μπορεί να επαναληφθεί.

Η **φασματομετρία μαζών** είναι μια μοναδική τεχνική ανάμεσα στις υπόλοιπες μεθόδους ανάλυσης των μορίων, αφενός μεν λόγω της αρχής μεθόδου στην οποία στηρίζεται, αφετέρου δε λόγω της χρησιμοποιούμενης οργανολογίας κατά την εφαρμογή της τεχνικής. Η φασματομετρία μαζών (MS) είναι μία μέθοδος μέτρησης της μάζας και συνεπώς του μοριακού βάρους ενός μορίου. Υπάρχουν αρκετά διαφορετικά είδη φασματομέτρων, αλλά το πιο διαδεδομένο είναι το όργανο ιονισμού ηλεκτρονίων με μαγνητικό τμήμα.

Μία μικρή ποσότητα δείγματος εισάγεται στο φασματομέτρο, όπου βομβαρδίζεται με μια δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Όταν ένα ηλεκτρόνιο υψηλής ενέργειας προσκρούσει σε κάποιο μόριο, εκτοπίζει ένα ηλεκτρόνιο από τη στιβάδα σθένους του μορίου, δημιουργώντας μία κατιοντική ρίζα, κατιοντική επειδή το μόριο έχει απωλέσει ένα ηλεκτρόνιο και ρίζα επειδή το μόριο διαθέτει περιττό αριθμό ηλεκτρονίων.

Ο βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια μεταφέρει τόσο μεγάλη ποσότητα ενέργειας στο μόριο, ώστε οι περισσότερες κατιοντικές ρίζες θραυσματοποιούνται μετά το σχηματισμό τους, προκύπτουν έτσι μικρά θραύσματα μερικά από τα οποία έχουν θετικό φορτίο, ενώ μερικά είναι ηλεκτρικώς ουδέτερα. Τα θραύσματα διέρχονται στη συνέχεια διαμέσου ενός καμπύλου σωλήνα που υφίσταται την επίδραση ενός ισχυρού μαγνητικού πεδίου, το οποίο τα εκτρέπει

	Abbott	DiaSorin	IDS	Roche	Siemens
Instrument	Architect	Liaison	iSYS	Elecsys/Modular/ Cobas DBP	Centaur/Centaur XP
Antibody	Sheep polyclonal	Goat polyclonal	Sheep polyclonal		Mouse monoclonal
Label	Acridinium	Isoluminol	Acridinium ester	Ruthenium	Acridinium ester
Sample volume (μL)	60	25	10	15	20
LoB	4.8	Not stated	4.5	5.0	4.0
LoD	7.8	Not stated	9.0	7.5	8.0
LoQ	20	10.0	13.8	12.5	8.8
Reportable range	20–400	10–375	12.5–350	12.5–150	9.3–375
Within-run CV (%)	≤3.7	≤7.7	≤12.1	≤7.2	≤7.0
Total CV (%)	<4.6	≤12.6	<16.9	≤12.6 ^a	≤11.1
Recovery of Vitamin D Metabolites (%)					
25-OHD ₃	105	100	100	100	101
25-OHD ₂	82	100	100	92	105
Vitamin D ₃	0.1	1.9	2.7	'Not detectable'	0.3
Vitamin D ₂	0.2	1.9	2.7	'Not detectable'	0.5
1,25-OH ₂ D ₃	Not stated	9.3	Not stated	'Not detectable'	1.0
1,25-OH ₂ D ₂	12.6	6.7	Not stated	'Not detectable'	4.0
3-epi-25-OHD ₃	2.7	1.3	Not stated	91	1.1
24,25-OH ₂ D ₃	112	Not stated	≥100	149	Not stated

^a Intermediate precision.

Πίν. 8B. Χαρακτηριστικά των κυριότερων μεθόδων [86].

Πίν. 9. Διασταυρούμενες αντιδράσεις (%) των μεταβολιτών βιταμίνης D₂ και D₃ σε διαγνωστικές ανοσοδοκιμασίες που χρησιμοποιούνται για 25(OH)D μέτρηση. Δεδομένα από τις οδηγίες των κατασκευαστών. Οι διασταυρούμενες αντιδράσεις με 1,25(OH)₂D₂ και 1,25(OH)₂D₃ δεν λήφθηκαν υπόψη [38].

Manufacturer (automatic system)	Roche Diagnostics (Elecsys, Cobas)	Roche Diagnostics (Elecsys, Cobas)	IDS (iSYS)	DiaSorin (Liaison)	Siemens (Advia, Centaur)	Abbott (Architect)	DiaSource	DiaSource	DiaSource	Immunodiagnostic	Immunodiagnostic
Test name	Vitamin D Total	Vitamin D ₃ (25-OH) (previous version)	25-OH Vitamin D	25-OH-vit D Total	Vitamin D Total	25-OH Vitamin D	25OH-vit D Total ELISA	25OH-vit D Total RIA-CT	25OH-vit D ₃ RIA-CT	25-OH Vitamin D direct ELISA	25-OH Vitamin D EIA
25(OH)D ₃	98	100	100	100	96,4	105	100	100	100	100	100
25(OH)D ₂	81	<10	75	100	106		83	95	<0,3	67,8	100
C3-epi-25(OH)D ₃	93			0	1	2,7	<0,2				
24,25(OH) ₂ D ₃	121	<20	>100			112	>100	>100	<0,8	>100	100
25,26(OH) ₂ D ₃							>100				
D ₃	5	<1	<0.01	1,1%	0.3	0,3	<0,2	<0,3	<0,03		<1
D ₂	6	<1	<0,03	1,4%	0,5	0,1	<0,2	<0,3	<0,03	0,3	<1

ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Τα ουδέτερα θραύσματα δεν επηρεάζονται από το μαγνητικό πεδίο και χάνονται στα τοιχώματα του σωλήνα, αλλά τα θετικώς φορτισμένα θραύσματα ταξινομούνται μέσω ενός ανιχνευτή (detector) ο

οποίος τα καταγράφει ως κορυφές στις διάφορες τιμές m/z. Δεδομένου ότι ο αριθμός των φορτίων z σε κάθε ιόν είναι συνήθως 1, η τιμή m/z του κάθε ιόντος είναι απλώς η μάζα m.

Το φάσμα μαζών μιας ένωσης παριστάνεται συ-

νήθως ως γράφημα, με τη μάζα (τιμές m/z) στον άξονα των x και την ένταση (αριθμός ιόντων δεδομένης τιμής m/z που φτάνουν στον ανιχνευτή) στον άξονα των y . Στην υψηλότερη κορυφή, που αποκαλείται βασική κορυφή, αποδίδεται αυθαίρετα ένταση 100%. Το φάσμα μαζών μιας ένωσης λειτουργεί σαν ένα είδος «δακτυλικού αποτυπώματος». Κάθε οργανικό μόριο θραυσματοποιείται με έναν και μοναδικό τρόπο, που εξαρτάται από τη δομή του, έτσι ώστε η πιθανότητα δύο ενώσεις να έχουν πανομοιότυπα φάσματα μαζών να είναι μικρή. Είναι λοιπόν δυνατό να αναγνωριστεί κάποια άγνωστη ένωση, αντιπαραβάλλοντάς μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή, το φάσμα μαζών της με κάποιο από τα φάσματα μαζών που έχουν καταχωρηθεί σε βάσεις δεδομένων [88].

Σε σχέση με τις τεχνικές ατομικής οπτικής φασματομετρίας, η φασματομετρία μαζών προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα, όπως όρια ανίχνευσης τουλάχιστον τρεις τάξεις μεγέθους χαμηλότερα από τις υπόλοιπες οπτικές μεθόδους, απλότητα φασμάτων και ευκολία στην ερμηνεία τους ακόμη και δυνατότητα μέτρησης ατομικών ισotόπων, αυξημένη ευαισθησία και υψηλή εξειδίκευση κατά την ταυτοποίηση ουσιών καθώς και την επιβεβαίωση της παρουσίας υπόπτων ουσιών σε ένα δείγμα.

5.5.5 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Οι διαδικασίες HPLC αναπτύχθηκαν επίσης και για τον προσδιορισμό της κυκλοφορούσας 25(OH)D [60]. Οι μέθοδοι HPLC είναι σε θέση να διαχωρίσουν και να ποσοτικοποιήσουν τα επίπεδα της 25(OH)D₂ και της 25(OH)D₃. Η HPLC ακολουθούμενη από ανίχνευση UV είναι ιδιαίτερα επαναλήψιμη και οι περισσότεροι ερευνητές θεωρούν ότι οι μέθοδοι HPLC είναι χρυσό πρότυπο (golden standard) [48].

Η χρωματογραφία είναι μέθοδος καθαρισμού και διαχωρισμού οργανικών ουσιών. Υπάρχουν διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές σε κοινή χρήση, που όλες βασίζονται στην ίδια αρχή: το προς διαχωρισμό μείγμα διαλύεται σε ένα διαλύτη που ονομάζεται κινητή φάση, και αφήνεται να διέλθει διαμέσου ενός προσροφητικού υλικού που ονομάζεται στατική φάση. Επειδή διαφορετικές ενώσεις προσροφώνται στη στατική φάση σε διαφορετική έκταση, μετακινούνται διαμέσου της φάσης με διαφορετικές ταχύτητες και διαχωρίζονται καθώς εξέρχονται (εκκλούνται) από το άκρο της χρωματογραφικής στήλης.

Η υγρή χρωματογραφία ή χρωματογραφία στήλης είναι ίσως η συχνότερα χρησιμοποιούμενη χρωματογραφική μέθοδος. Ένα μείγμα οργανικών ενώσεων διαλύεται στον κατάλληλο διαλύτη και προσροφάται σε μια στατική φάση. Στη συνέχεια περισσότερος διαλύτης διοχετεύεται μέσω της στήλης και οι διάφορες ενώσεις εκκλούνται σε διαφορετικό χρόνο.

Ο χρόνος έκλουσης μιας ένωσης επηρεάζεται άμεσα από την πολικότητά της. Μόρια με πολικές λειτουργικές ομάδες προσροφώνται σε γενικές γραμμές εντονότερα και συνεπώς μετακινούνται διαμέσου της στατικής φάσης βραδύτερα από τα άπολα μόρια.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high-performance liquid chromatography, HPLC) αποτελεί μια πρόσφατη παραλλαγή της τεχνικής της απλής στήλης, βασισμένη στην αποκάλυψη ότι οι χρωματογραφικοί διαχωρισμοί βελτιώνονται θεαματικά εάν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρά ισομεγέθη σφαιρικά σωματίδια. Το μικρό μέγεθος των σωματιδίων διασφαλίζει μεγαλύτερη συνολική επιφάνεια για καλύτερη προσρόφηση, ενώ το ομοιόμορφο σφαιρικό σχήμα επιτρέπει τη μέγιστη προσέγγισή τους και ομοιόμορφο γέμισμα της στήλης. Για να διέλθει ο διαλύτης μέσα από μία πυκνή στήλη HPLC απαιτούνται αντλίες υψηλής πίεσης, ενώ για την επισήμανση της εξόδου της ένωσης που εκκλύεται από τη στήλη χρησιμοποιούνται εξαιρετικά ευαίσθητοι ανιχνευτές [88].

5.5.6 Διασύνδεση συστημάτων υγρής χρωματογραφίας με φασματόμετρο μαζών

Η προσπάθεια συνδυασμού LC με MS ξεκίνησε το 1970. Οι επιδιώξεις της διασύνδεσης ήταν η ανάλυση θερμοευαίσθητων ουσιών που δεν μπορούσαν να αναλυθούν με GC-MS, η ανάλυση μη πτητικών ουσιών, η αυξημένη ευαισθησία του ανιχνευτή MS, η αξιολόγηση της καθαρότητας της χρωματογραφικής κορυφής και η ταυτοποίηση των αναλυόμενων ουσιών. Ο εν σειρά συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας (LC) με τη φασματομετρία μαζών (MS) εξελίσσεται συνεχώς με αποτέλεσμα η τεχνική αυτή να εφαρμόζεται πλέον σε πολλές αναλύσεις ρουτίνας καθώς και σε πιο σύνθετες αναλύσεις ανίχνευσης και ταυτοποίησης ουσιών.

Το φασματόμετρο μαζών δρα ως ανιχνευτής εξαιρετικής εκλεκτικότητας για το χρωματογραφικό σύστημα. Ο θερμοψεκασμός (Thermo Spray, TS), έχει πλέον αντικατασταθεί από το χημικό ιονισμό (Chemical Ionization, CI) και τον ηλεκτροψεκασμό (Electron Spray, ES) προάγοντας την ανάπτυξη της τεχνικής της διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (Tandem mass spectrometry, MS-MS), η οποία αποτελεί σήμερα την κυριότερη μέθοδο βιοανάλυσης των μορίων που απαντώνται σε βιολογικά δείγματα [89].

Οι εφαρμογές της υγρής χρωματογραφίας (LC) με τη φασματομετρία μαζών (MS) είναι ευρύτατες. Περιβαλλοντικές αναλύσεις, εγκληματολογικές αναλύσεις, ο έλεγχος φαρμακοδιέγερσης, ο προσδιορισμός της δομής μεγαλομορίων, θερμοευαίσθητων μη πτητικών ενώσεων, ταυτοποίηση δομής αγνώστων ενώσεων (π.χ. μεταβολιτών φαρμάκων, πεπτιδίων, πρωτεϊνών κ.ά.).

Προκειμένου να επιτευχθεί ο ιονισμός με την τεχνική LC-MS χρησιμοποιούνται δυο τύποι πηγών. Οι πηγές αέριας φάσης, όπου τα δείγματα εξαερώνονται και μετά ιονίζονται (πηγές πρόσκρουσης ηλεκτρονίων, Electron Impact, πηγές χημικού ιοντισμού, Chemical Ionization) και οι πηγές ηλεκτροψεκασμού ESI, βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας FAB, ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας, MALDI) [89].

5.5.7 HPLC και GC-MS

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μεταβολιτών της βιταμίνης D σε ερευνητικά πρωτόκολλα και όχι σε συνήθεις ιατρικές διαγνώσεις. Η HPLC απαιτεί χρονοβόρο αρχικό διαχωρισμό, συμπεριλαμβανομένων εκχύλιση υγρού-υγρού με οργανικούς διαλύτες και στερεά εκχύλιση φάσης (SPE) για τον καθαρισμό του δείγματος. Πολλές προσπάθειες έχουν γίνει για να ελαχιστοποιηθεί η χρονοβόρα εργασία και να αναπτυχθεί απευθείας σύνδεση δείγματος-απορρυπαντικού. Ωστόσο, όλα τα βήματα καθαρισμού πριν τον προσδιορισμό της βιταμίνης D μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα λόγω διαφορετικής ατομικής ανάκτησης των ισομορφών βιταμίνης D και των εσωτερικών προτύπων [90]. Για να αξιολογηθεί σωστά η συγκέντρωση διαφόρων μεταβολιτών της βιταμίνης D με την τεχνική HPLC, ο ακριβής διαχωρισμός τους από άλλους δομικά παρόμοιους αναλύτες σε στήλες χρωματογραφίας είναι απαραίτητος. Αυτό δεν είναι πάντα δυνατό, καθώς και ο πλήρης διαχωρισμός του α και β C3-επιμερή [91]. Μολονότι η GC-MS είναι μία πολύ ευαίσθητη μέθοδος, απαιτεί ένα επιπρόσθετο στάδιο με τη χρήση βλαβερών χημικών ουσιών για τη μετατροπή των μεταβολιτών της βιταμίνης D σε πτητικά παράγωγα. Η απόδοση αυτής της αντίδρασης εξαρτάται από τη χημική δομή της ένωσης και μπορεί να μην είναι η ίδια για όλους τους μεταβολίτες της βιταμίνης D. Το βασικό πρόβλημα, το οποίο δεν έχει επιλυθεί πλήρως είτε στην HPLC είτε στην GC-MS, είναι η ακριβής τυποποίηση της μεθόδου [38]. Η αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας (GC-MS) εφαρμόστηκε σε μετρήσεις 25(OH)D στη δεκαετία του 1970 και 1980, και μπορεί να θεωρηθεί ως η πρωτότυπη οριστική μέθοδος για 25(OH)D. Οι μέθοδοι GC-MS είναι σχετικά πολύπλοκες και χρονοβόρες (συνήθως απαιτούν παραγοντοποίηση του αναλυτή) και σπάνια χρησιμοποιούνται πλέον. Ωστόσο, ένα σημαντικό πλεονέκτημα της GC-MS είναι ότι οι περισσότερες στήλες GC (συνήθως 15-30 μέτρα σε μήκος) είναι πολύ μεγαλύτερες από ότι οι στήλες LC και έχουν καλύτερη διακριτική ικανότητα. Αυτό θα μπορούσε να είναι επωφελές στον διαχωρισμό των μορίων (π.χ. 3-επι-25(OH)D₃) της ίδιας μάζας με την 25(OH)D και με παρόμοια πρότυπα θραυσματοποίησης (και θα μπορούσε να προκαλέσει παρεμβολές σε δοκιμασίες LC-MS/MS [50].

5.5.8 Υγρή χρωματογραφία – Φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS)

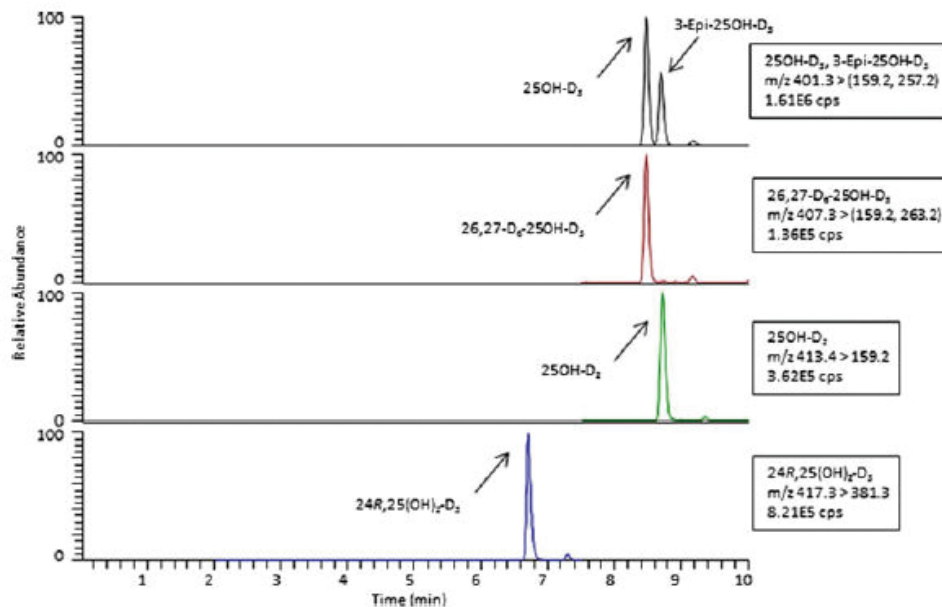
Λόγω της υψηλής πολυπλοκότητας των ενόργανων εγκαταστάσεων και των υψηλών απαιτήσεων για εξειδικευμένο προσωπικό στο διαγνωστικό εργαστήριο, η LC-MS/MS έχει χρησιμοποιηθεί κατά κύριο λόγο ως μέθοδος αναφοράς, αν και η μεγάλη πρόοδος που έχει σημειωθεί στον εξοπλισμό αυ-

τοματοποίησης, η αναβάθμιση των προσόντων του προσωπικού και η διαδεδομένη χρήση των μεθόδων φασματομετρίας μάζας σε άλλες περιοχές έχουν οδηγήσει σε αυξημένο ενδιαφέρον για LC-MS/MS κατά τις συνήθεις ιατρικές διαγνώσεις [92].

Οι μετρήσεις της 25(OH)D σε ανθρώπινο ορό χρησιμοποιώντας ανταγωνιστικές ανοσολογικές δοκιμασίες είναι δύσκολες λόγω της λιπόφιλης φύσης και της σφιχτής συνδέσεως με την πρωτεΐνη δέσμευσης (VDBP), ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις στον ορό. Επιπλέον, στους ανοσοπροσδιορισμούς για 25(OH)D έχουν αναφερθεί διασταυρούμενες αντιδράσεις με 24,25(OH)₂D₃. Πολλές εμπορικές ανοσολογικές δοκιμασίες μπορούν να μετρήσουν μόνο 25(OH)D₃ και δεν είναι κατάλληλες για την παρακολούθηση της τροφικής αναπλήρωσης με βιταμίνη D₂, η οποία προέρχεται από φυτικές πηγές και χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλές χώρες για εμπλουτισμό των τροφίμων. Ως εκ τούτου, η ανάλυση LC-MS / MS είναι προτιμώμενη αλλά έχει δείχθει ότι επίσης υποβάλλεται σε παρεμβολές.

Η ιδιαιτερότητα των μεθόδων LC-MS/MS βασίζεται στις διαφορές στις μοριακές μάζες των αναλυόμενων ουσιών και στα χαρακτηριστικά θραύσματά τους. Επιπλέον, πριν από την MS ανάλυση, όλες οι ενώσεις διαχωρίζονται με υγρή χρωματογραφία και διακρίνονται από το χρόνο κατακράτησης. Προκειμένου να παρασχεθεί καλύτερη ακρίβεια ποσοτικοποίησης, σταθερές ραδιοεπισημασμένες ενώσεις χρησιμοποιούνται ως εσωτερικά πρότυπα. Για τη συνήθη ποσοτική ανάλυση των κλινικών δειγμάτων, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη οργανική ρύθμιση είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC ή UPLC) σε συνδυασμό με ένα τριπλό τετραπολικό φασματομέτρο μάζας [90]. Η σωστή επιλογή της μεθόδου ιονισμού έχει μεγάλη σημασία για την καλύτερη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα των ποσοτικών προσδιορισμών. Φασματομέτρα μάζας αναλύουν ιόντα σε υψηλό κενό που απαιτεί την εξάτμιση και τον ιονισμό των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν.

Υπάρχουν τρεις κύριες μέθοδοι ιονισμού που χρησιμοποιούνται συνήθως σε LC-MS/MS. Πρώτο και πιο δημοφιλές είναι το ESI (ιονισμός ηλεκτροψεκασμού). Τα πλεονεκτήματά του είναι: απλότητα λειτουργίας, πολύ δυναμικό εύρος (μέχρι τέσσερις τάξεις μεγέθους), και η γενική διαθεσιμότητά του. Αυτός ο τρόπος λειτουργίας επιτρέπει την ανάλυση των ενώσεων με υψηλά μοριακά βάρη (ακόμη και άνω των 30 kilo daltons) όπως πολυπεπτίδια και πρωτεΐνες. Για τον προσδιορισμό μη πολικών ενώσεων, όπως μεταβολίτες της βιταμίνης D και ορισμένες στεροειδείς ορμόνες, καλύτερα αποτελέσματα μπορούν να επιτευχθούν με δύο άλλους τρόπους ιονισμού: APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) and APPI (Atmospheric Pressure Photo Ionisation). Με αυτούς τους τρόπους, ο ιονισμός λαμβάνει χώρα στην αέρια φάση, η οποία περιορίζει την ανάλυση σε σχετικά χαμηλότερες μοριακές μάζες (συνήθως κάτω από 1 kilo dalton).



Εικ. 15. Απεικόνιση κατά LC-MS/MS των κύριων μεταβολιτών της βιταμίνης D. (Τροποποιημένη από [93]).

Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος λειτουργίας σε ποσοτική MS ονομάζεται MRM (Multi Reaction Monitoring). Στη λειτουργία MRM, ένα φασματόμετρο χρησιμοποιώντας πρώτα τετραπολικό φίλτρο μάζας επιλέγει ιόντα με την ίδια αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) ως ένωση ενδιαφέροντος (parent ion). Στο δεύτερο τετράπολο, αυτά τα ιόντα υφίστανται αποσύνθεση που προκαλείται με έναν ελεγχόμενο τρόπο, μέσω σύγκρουσης με ουδέτερα μόρια του αερίου. Ένα τρίτο τετράπολο επιτρέπει να περάσουν μόνο ιόντα των χαρακτηριστικών θραυσμάτων του αναλύτη ενδιαφέροντος (daughter ions). Η παρακολούθηση των δύο ειδικών για μια δεδομένη ένωση ζευγών ιόντων (parent ion-daughter ion), η οποία ονομάζεται «μετάδοση ιόντων» θεωρείται επαρκής για μια ξεκάθαρη επαλήθευση της ταυτότητας του αναλύτη και επιτρέπει ποσοτική ανάλυση που βασίζεται αποκλειστικά στα δεδομένα φασματομετρίας μάζας. Από όλους τους τρόπους λειτουργίας που χρησιμοποιούνται στην φασματομετρία μάζας, η MRM παρέχει την καλύτερη ευαισθησία και επαναληψιμότητα των ποσοτικών προσδιορισμών (Εικόνα 15).

Η μέτρηση της 25(OH)D στο αίμα με LC-MS/MS φαίνεται να είναι ιδιαίτερα πολύτιμη, διότι επιτρέπει όχι μόνο ξεκάθαρη ποσοτικοποίησή της αλλά επίσης, και εντοπισμό των ασυνήθιστων ή βιολογικά λιγότερο ενεργών μεταβολιτών, όπως 3-epi-25(OH)D₃ και ακριβείς συσχετίσεις μεταξύ των διαφόρων ισομορφών και των μεταβολιτών τους κατά τη διάρκεια μίας μόνο ανάλυσης στο ίδιο δείγμα. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει την αποφυγή των σφαλμάτων που σχετίζονται με διασταυρούμενη αντίδραση των αντισωμάτων με άλλους μεταβολίτες της βιταμίνης D που συμβαίνουν σε ανοσοχημικές μεθόδους και

η ποικιλία των αποτελεσμάτων οφείλεται σε μεμονωμένη ανάκτηση των μεταβολιτών της βιταμίνης D και των εσωτερικών προτύπων που χρησιμοποιούνται σε μεθόδους HPLC [94].

Καθώς η LC-MSMS όλο και πιο πολύ χρησιμοποιείται σε κλινικά εργαστήρια, πολλές διαφορετικές μεθοδολογίες χρησιμοποιούνται αν και έχει παρατηρηθεί ότι οι μετρήσεις δεν είναι απλή υπόθεση. Οι διαφορές στα αποτελέσματα θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μεταβολές στην προετοιμασία των δειγμάτων, στη χρωματογραφία, στον ιονισμό και στην κλασματοποίηση [95].

Ο διαχωρισμός των επιμερών και ισοβαρών από τον αναλύτη-στόχο είναι κρίσιμος, διότι μπορούν να επικαλύπτονται οι 25(OH)D κορυφές και να σχηματίζονται οι ίδιες μάζες μετά τον ιονισμό, έτσι διακυβεύεται η πραγματική κατάσταση της 25(OH)D στην κυκλοφορία. Το επιμερές της 25(OH)D₃ είναι γνωστό ότι έχει τα ίδια αποτελέσματα στην καταστολή της έκκρισης της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTH) αλλά έχει αμελητέες επιπτώσεις στην απορρόφηση ασβεστίου. Πρόσφατα, προέκυψε το συμπέρασμα ότι η απουσία της εξωτερικής τυποποίησης για τη δοκιμασία θα μπορούσε να οδηγήσει σε μεγαλύτερες διακυμάνσεις και ψευδή αποτελέσματα. Για να ελαχιστοποιηθούν οι διεργαστηριακές και οι μεταξύ μεθόδων διακυμάνσεις στην ανάλυση LC-MS/MS, χρησιμοποιούνται υλικά αναφοράς για την προετοιμασία των βαθμονομητών και ελέγχων ποιότητας, μαζί με την εισαγωγή ενός νέου εσωτερικού προτύπου.

Επιμερή και ισοβαρή είναι ενώσεις που έχουν το ίδιο μοριακό βάρος με μεταβολίτες της βιταμίνης D. Επιπλέον, ο διαχωρισμός των παρεμβαλλόμενων επιμερών και ισοβαρών είναι επίσης σημαντικός,

επειδή μπορεί να αλληλεπικαλύπτονται χρωματογραφικά με τους μεταβολίτες της βιταμίνης D και να δώσουν λάθος εκτιμήσεις για τα πραγματικά επίπεδα της βιταμίνης D. Η 25(OH) D_3 είναι ο πιο άφθονος μεταβολίτης στην κυκλοφορία και το 3-επι-25(OH) D_3 είναι το πιο διαδεδομένο επιμερές της 25(OH) D_3 . Υπάρχουν δύο ενώσεις που είναι γνωστές ότι προκαλούν ισοβαρικές παρεμβολές στην ανάλυση 25(OH)D. Η 1α-υδροξυβιταμίνης- D_3 [1α(OH) D_3], η οποία είναι μία εξωγενής φαρμακευτική ένωση και η 7α-υδροξυ-4-χολεστένιο-3-όνη (7αC4), η οποία είναι μια ουσία πρόδρομος των ενδογενών χολικών οξέων [96,97]. Ο επιμερισμός της 25(OH) D_3 και 1α,25(OH) $_2D_3$ έχουν σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό του 3-επι-25(OH) D_3 και 3-επι-1α,25 επι(OH) $_2D_3$, αντίστοιχα. Τα επιμερή διαφέρουν στη διαμόρφωση του τρίτου ατόμου άνθρακα (C-3), το οποίο είναι συνδεδεμένο με μία ομάδα υδροξυλίου. Υδροξυλίωση από 3-επι-25(OH) D_3 σχηματίζει 3-επι-1α,25(OH) $_2D_3$ [98].

Η LC-MS/MS είναι σήμερα η καλύτερη διαθέσιμη τεχνική για την ορθή ποσοτικοποίηση της 25(OH) D_3 και 25(OH) D_2 και έχει επίσης την ικανότητα να ξεπεράσει τα περισσότερα από τα προβλήματα που συνδέονται με την πρωτεΐνη συνδέσεως. Η LC-MS/MS είναι μια πιο ευνοϊκή τεχνική επειδή δεν απαιτείται παραγωγή του δείγματος, ο χρόνος διαδικασίας είναι πολύ σύντομος. Ωστόσο, και η LC-MS/MS υπόκειται επίσης σε παρεμβολές. Μαζί με τις σχετικές με τη μήτρα και το όργανο και αναλυτικές παρεμβολές υπάρχουν. Έχει επίσης δειχθεί ότι οι προσδιορισμοί 25(OH)D μπορεί να επηρεάζονται από επιμερικές και ισοβαρικές παρεμβολές. Τα επιμερή διαφέρουν μόνο στη διαμόρφωση σε ένα άτομο άνθρακα [50]. Δύο χρωματογραφικές μέθοδοι είναι σήμερα σε ευρεία χρήση: α) υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με UV ανίχνευση (HPLC/UV) και β) υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας, συνήθως διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS). Η HPLC/UV για την 25(OH)D αναπτύχθηκε στη δεκαετία του 1970 και αναφέρεται ως η τεχνική που αποτελεί το «χρυσό πρότυπο» για τη μέτρηση της 25(OH)D. Αρχικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η χρωματογραφία κανονικής φάσης, ή ένας συνδυασμός κανονικοποιημένης και ανάστροφης φάσης, αλλά ο διαχωρισμός ανάστροφης φάσης έγινε πιο κοινός σε μεταγενέστερες μεθόδους.

Οι LC-MS/MS μέθοδοι συνδυάζουν την αναλυτική ικανότητα της HPLC με την ιδιαιτερότητα της φασματομετρίας μάζας. Και οι δύο μέθοδοι είναι κατάλληλες για το διαχωρισμό και την παροχή μεμονωμένων αποτελεσμάτων για 25(OH) D_3 και 25(OH) D_2 , αν και ορισμένοι συνηγορούν υπέρ της αναφοράς μόνο της ολικής 25(OH)D για αποφυγή σύγχυσης. Ένας προτεινόμενος συμβιβασμός είναι να αναφέρεται το επίπεδο της ολικής 25(OH)D και, ενδεχομένως, να δίδεται η 25(OH) D_2 ως ποσοστό [50].

Η μέθοδος LC-MS/MS είναι απαλλαγμένη από όλους τους τύπους των παρεμβολών που προκύπτουν λόγω των επιμερών, ισοβαρών συστατικών τα

οποία μπορούν να παρέμβουν με αναλύτη ιονισμού. Έτσι, παρέχει μια ισχυρή, ειδική, αξιόπιστη και αναπαραγωγίμη τεχνική ως λύση στα προβλήματα που εντοπίζονται σε σχέση με τις παρούσες μεθόδους για την βιταμίνη D. Η απομάκρυνση της αβεβαιότητας στη μέτρηση της βιταμίνης D, είναι απαραίτητη προκειμένου να προχωρήσει η τρέχουσα κατανόηση των ρόλων της βιταμίνης D στην υγεία και την ασθένεια μέσω αυστηρότερων κλινικών δοκιμών [98].

5.5.8.1 Παρεμβολές κατά την ανάλυση με LC-MS/MS και συστηματικά σφάλματα

Υπάρχουν πολλές πιθανότητες για παρεμβολές από ενδογενή βιολογικά συστατικά στο δείγμα κατά την ανάλυση LC-MS/MS της βιταμίνης D. Αυτές οι παρεμβολές έχουν τη δυνατότητα να διαταράξουν την ανάλυση, πιθανότατα με επιζήμιο τρόπο. Οι παρεμβολές μπορεί να οδηγήσουν σε: (Α) τροποποιημένο ιονισμό των αναλυτών από την καταστολή ιόντων σε σύγκριση με καθαρά πρότυπα, (Β) μειωμένη επιλεκτικότητα από επικαλύψεις φασμάτων μαζών και (Γ) υπερεκτίμηση των επιπέδων της βιταμίνης D από παρεμβολές των C-3 επιμερών των μεταβολιτών της βιταμίνης D. Αυτά είναι εντελώς διαφορετικά θέματα και είναι σημαντικό να ξεχωριστούν για να μπορέσουν να αντιμετωπιστούν επαρκώς και να αντισταθμιστούν.

5.5.8.2 Καταστολή ιόντος από επιδράσεις μήτρας

Συστατικά που συνυπάρχουν στον ανθρώπινο ορό συχνά προκαλούν καταστολή ιονισμού (σπάνια ενίσχυση) των μορίων στόχων κατά τη διάρκεια ESI ή APCI, η οποία επίσης αναφέρεται ως επιδράσεις μήτρας. Για την αποφυγή ή τον περιορισμό των επιπτώσεων της καταστολής, η κατάλληλη προεπεξεργασία του δείγματος είναι ζωτικής σημασίας. Φυσικά, ζητήματα πιστότητας και ακρίβειας που προκύπτουν από επιδράσεις καταστολής ιόντων μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση σταθερών ισοτόπων ως εσωτερικά πρότυπα για βαθμονόμηση.

Είναι σημαντικό η 25(OH)D και άλλοι μεταβολίτες να απελευθερωθούν πλήρως από τις πρωτεΐνες μεταφοράς κατά τη διάρκεια του σταδίου παρασκευής του δείγματος του αναλυτικού προσδιορισμού δεδομένου ότι αυτό διαφορετικά θα οδηγούσε σε συστηματικά σφάλματα και ανακριβή αποτελέσματα. Προσεκτική επώαση με το πρότυπο ισότοπο διαβεβαιώνει ότι ισότοπο που είναι επισημασμένο δεσμεύεται σε D-δεσμευτική πρωτεΐνη βιταμίνη με τον ίδιο τρόπο όπως και η ενδογενής αναλυόμενη ουσία. Παρά τη σημαντική δαπάνη, σταθερά ισότοπα ως εσωτερικά πρότυπα είναι απαραίτητα για την αντιστάθμιση επιδράσεων καταστολής ιόντων [99].

5.5.8.3 Θέματα επιλεκτικότητας από παρεμβολές φάσματος μαζών

Πολλές τρέχουσες δοκιμασίες LC-MS/MS για τη βιταμίνη D κάνουν χρήση μονής ή διπλής ουδέτερης απώλειας του νερού από το πρωτονιωμένο μόριο ως

μια ειδική m/z μετάπτωση για MRM για LC-MS/MS ποσοτικοποίηση. Αυτές οι όχι συγκεκριμένες απώλειες («σχεδόν κάθε πρωτονιωμένο βιολογικό μόριο θα χάσει νερό κατά την σύγκρουση που προκαλείται από συνθήκες διαχωρισμού») παρουσιάζουν ένα σοβαρό πρόβλημα σε σχέση με την ειδικότητα, επειδή η HPLC είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει σε συνεκλουόμενες ισοβαρικές ενώσεις. Ως αποτέλεσμα, ισοβαρικές παρεμβολές αναμένεται επίσης να είναι παρόντες στο MS/MS φάσμα, οι οποίες θα περιορίζουν την ακρίβεια και το LOD, αλλά πολύ πιο σημαντικά, θα οδηγήσουν σε συστηματικά σφάλματα στην ανάλυση εάν χαμηλής ανάλυσης φασματομέτρα (όπως τριπλού τετράπολου πλατφόρμες) χρησιμοποιούνται στη λειτουργία MRM, η οποία είναι συνήθως η περίπτωση της βιταμίνης D στα αναλυτικά εργαστήρια.

Επίσης, οι ενώσεις της βιταμίνης D χάνουν εύκολα H_2O κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ιονισμού αν το όργανο ιονισμού και η περιοχή μεταφοράς του οργάνου δεν είναι σωστά ρυθμισμένα. Μια προφανής λύση σε αυτό το δίλημμα είναι η επιλογή περισσότερο δομικά-διαγνωστικών προϊόντων ιόντων για ανάλυση διαδοχικής φασματομετρίας μάζας. Δυστυχώς, τα συστατικά της βιταμίνης D έχουν την τάση να κατακερματίζονται και έτσι η ειδικότητα περιορίζεται [99].

5.5.8.4 Η συνεισφορά του C-3 επιμέρους

Ένα επιπλέον σοβαρό πρόβλημα είναι η εμφάνιση του C-3 επιμερών όλων των ενώσεων βιταμίνης D. Ο NHANES πρότεινε ότι όλες οι μελλοντικές ποσοτικές αναλύσεις LC-MS/MS για μεταβολίτες της βιταμίνης D θα πρέπει να έχουν την ικανότητα να διαχωρίζουν και να ποσοτικοποιούν τα C-3 επιμερή της 25(OH)D που προκύπτουν από αντιστροφή της στερεοχημικής διαμόρφωσης της C-3 δεσμευμένης ομάδας υδροξυλίου. Οι αντιδράσεις επιμερισμού ανακαλύφθηκαν ως ξεχωριστό μονοπάτι πέραν των οξειδωτικών μετασχηματισμών της βιταμίνης D, αλλά οι βιολογικές λειτουργίες τους δεν έχουν διασαφηνιστεί πλήρως ακόμη. Ανεξάρτητα από την βιολογική σημασία τους, όμως, τα C-3 επιμερή παραμένουν δυνητικοί παρεμποδιστές στον αναλυτικό προσδιορισμό που οδηγούν σε συστηματικό αναλυτικό σφάλμα [50].

Ειδικότερα, μία μελέτη έδειξε σημαντικές συγκεντρώσεις C-3 επιμερούς της 25(OH)D σε πολύ μικρά παιδιά, αλλά όχι σε ενήλικες. Μια άλλη μελέτη, ωστόσο, ανέφεραν σημαντικά επίπεδα ακόμη και σε ενήλικες [98] και πιο πρόσφατα, οι Lensmeyer και συν. ανίχνευσαν C-3 επιμερή στο 99% των δειγμάτων, που μεταφράζεται σε 212 από 214 ανθρώπων δειγμάτων όπου η ηλικία των συμμετεχόντων κυμαινόταν από νεογνά μέχρι πάνω από 80 χρόνια [94]. Βρήκαν επίσης μια μη γραμμική αύξηση στις συγκεντρώσεις επιμερών όπου οι σχετικές ποσοότητες του επιμερούς σε 25(OH)D κυμαίνεται από 0 έως 26%. Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι οι αναλυτικοί προσδιορισμοί θα υπερεκτιμούν τα επίπεδα της βιταμίνης D (μέχρι και 25% με βάση τα παραπάνω ευ-

ρήματα) αν δεν ληφθεί η κατάλληλη φροντίδα για να διαχωριστούν τα C-3 επιμερή (και άλλες ισοβαρείς παρεμβολές) σε ένα σημείο όπου η μέτρηση των επιπέδων της βιταμίνης D θα μπορεί να χαρακτηριστεί ως φυσιολογική [98]. Αυτό είναι σημαντικό να το έχουμε κατά νου κατά την αξιολόγηση της βιταμίνης D. Όπως ποτέ δεν ξέρει κανείς εκ των προτέρων αν οι δυνητικές επιμερικές παρεμβάσεις υπάρχουν, μόνο η σωστή ανάλυση χρωματογραφίας για το διαχωρισμό των επιμερών μπορεί να δώσει προς το παρόν σε ανεξάρτητα δείγματα αξιόπιστη μέτρηση της κατάστασης της βιταμίνης D με LC-MS/MS. Αρκετές αναλύσεις που αφορούν ειδικά τα επιμερή έχουν χρησιμοποιήσει ανεστραμμένη στήλη C-18, ένα συνδυασμό της C-18 και ασύμμετρες στήλες πενταφθοροφαινυλεστέρα (PFP) και CN στήλες [99].

5.5.9 Μέτρηση με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης

Υψηλής ανάλυσης (high-resolution), ακριβείς μετρήσεις της μάζας έχουν πρόσφατα γίνει πολύ δημοφιλείς σε βιοϊατρικές αναλύσεις, λόγω της εμπορικής διάθεσης μιας νέας γενιάς μέσων υψηλής ανάλυσης, που ονομάζονται Orbitrap-MS και έχουν αυξήσει την απόδοση και την ευκολία στη χρήση σε βαθμό που ειδικά βιοαναλυτικά εργαστήρια μπορούν να τα εφαρμόσουν εύκολα με κατάλληλα εκπαιδευμένο τεχνικό προσωπικό. Τα όργανα αυτά άμεσα συνδυάζονται με υγρή χρωματογραφία και αναμφίβολα θα έχουν μελλοντικές εφαρμογές στον τομέα ανάλυσης της βιταμίνης D. Επί του παρόντος, τα παραδείγματα για την εφαρμογή της φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS) για ανάλυση της βιταμίνης D είναι ακόμη πολύ περιορισμένα. Η HRMS θα προσφέρει σαφώς πλεονεκτήματα σε περιπτώσεις παρουσίας στο δείγμα ισοβαρών παρεμβολών από ενδογενείς ενώσεις, που μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην ειδικότητα της ανάλυσης και να οδηγούν σε συστηματικά σφάλματα [99].

5.5.10 Η αναλυτική ευαισθησία των προσδιορισμών

Η αναλυτική ευαισθησία (sensitivity) αντιπροσωπεύει τη δυνατότητα μιας μεθόδου να ανιχνεύει μικρές ποσότητες της προς ανάλυση ουσίας. Το όριο ανίχνευσης (Detection limit) είναι η ελάχιστη ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να μετρηθεί με αποδεκτή βεβαιότητα. Μία μέθοδος είναι καλύτερη όσο η ευαισθησία είναι μεγαλύτερη και το όριο ανίχνευσης μικρότερο. Οι όροι «ευαισθησία» και «ειδικότητα» θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με τους απαιτούμενους επιθετικούς προσδιορισμούς επειδή η «διαγνωστική» και «αναλυτική» σημασία αυτών των όρων είναι πολύ διαφορετικές.

Ο κύριος στόχος της εκτίμησης της κατάστασης της βιταμίνης D είναι ο εντοπισμός των ατόμων με ανεπάρκεια βιταμίνης D. Κυκλοφορούσα 25(OH)D μικρότερη από 25 nmol/L υποδεικνύει σοβαρή ανεπάρκεια βιταμίνης D [101]. Η λειτουργική ευαισθησία (ανοσοβιολογική) όριο ποσοτικοποίησης (HPLC

και LC-MS/MS), θα πρέπει επομένως να είναι κάτω από 25 nmol/L. Παραδόξως λίγες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τη λειτουργική ευαισθησία των χειροκίνητων ανοσολογικών δοκιμασιών, αν και ανίχνευση ορίων της τάξεως των 5 nmol/L ή λιγότερο συνεπάγεται λειτουργική ευαισθησία κάτω από 10 nmol/L. Η λειτουργική ευαισθησία για τις αυτοματοποιημένες ανοσολογικές δοκιμασίες αναφέρεται από τους κατασκευαστές ότι είναι 17,5 nmol/L ή λιγότερο. Όλες οι ανοσοδοκιμές έχουν σχεδιαστεί για να χρησιμοποιούν ένα μικρό όγκο δείγματος (50 μL ή λιγότερο), αλλά σε αυτοματοποιημένες διαδικασίες ο «dead volume» που απαιτείται εντός του οργάνου μπορεί να είναι σημαντικά υψηλότερος. Είναι σαφές ότι η LC-MS/MS είναι πολύ πιο ευαίσθητη από ό,τι η HPLC. Αναφέρθηκαν όρια ποσοτικοποίησης 5 nmol/L (25(OH)D₃) και 8 nmol/L (25(OH)D₂) για LCMS/MS σε σύγκριση με 17.5 nmol/L (25(OH)D₃) για τις μεθόδους HPLC. Αυτό συμβαίνει παρά το γεγονός ότι οι περισσότερες HPLC μέθοδοι χρησιμοποιούν όγκο δείγματος τουλάχιστον 500 μL σε σύγκριση με 200 μL ή λιγότερο των LC-MS/MS. Οι LC-MS/MS διαδικασίες φαίνεται να είναι οι πιο ευαίσθητες αλλά τελικά όλοι οι προσδιορισμοί φαίνεται πως έχουν την απαιτούμενη ευαισθησία για την εντόπιση σοβαρής ανεπάρκειας βιταμίνης D [99].

5.5.11 Η ειδικότητα των προσδιορισμών

Η αναλυτική ειδικότητα (specificity) αντιπροσωπεύει το βαθμό κατά τον οποίο μία μέθοδος προσδιορίζει εκλεκτικά και αποκλειστικά την αναλυόμενη ουσία χωρίς να αντιδρά με άλλα παρόμοια ή μη συστατικά του δείγματος.

Περαιτέρω αιτίες για την κακή μεταξύ των μεθόδων συγκρισιμότητα μπορεί να σχετίζονται με την αναλογία της 25(OH)D₂ που μετριέται. Σε πολλά άτομα που δεν λαμβάνουν βιταμίνη D₂ η κυκλοφορούσα 25(OH)D₂ θα προσεγγίζει την ευαισθησία των περισσότερων διαδικασιών ανάλυσης και η μέτρηση της 25(OH)D₃ θα αρκεί. Συμπληρώματα ή φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να περιέχουν είτε βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη) είτε βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη). Εάν ένα άτομο λαμβάνει βιταμίνη D₂ και όχι βιταμίνη D₃ και οι δύο μεταβολίτες πρέπει να μετρηθούν και να αναφερθούν ως συνολική 25(OH)D. Η βιταμίνη D₃ στο Ηνωμένο Βασίλειο είναι η προτιμώμενη φαρμακευτική προετοιμασία αλλά και η βιταμίνη D₂ συχνά χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου απαιτείται υψηλή δόση υποκατάστασης. Στις ΗΠΑ, η μόνη φαρμακευτική προετοιμασία της βιταμίνης D που έχει εγκριθεί από το FDA είναι η βιταμίνη D₂.

Δίνοντας ξεχωριστά αποτελέσματα για 25(OH)D₂ και 25(OH)D₃, ωστόσο, μπορεί να προκληθεί σύγχυση στους κλινικούς γιατρούς και είναι σαφέστερο να αναφέρονται τα αποτελέσματα ως το άθροισμα των 25(OH)D₂ συν 25(OH)D₃. Αν η 25(OH)D₂ είναι παρούσα σε σημαντικές ποσότητες >25 nmol/L ένα επιπλέον σχόλιο μπορεί να επισυνάπτεται στην έκθεση. Ένα ξεχωριστό θέμα σχετικά με την ειδικότητα των

διαφόρων μεθόδων είναι η πιθανότητα διασταυρούμενης αντιδραστικότητας με άλλους μεταβολίτες της 25(OH)D, οδηγώντας σε φαινομενικά υψηλότερες συγκεντρώσεις της ολικής 25(OH)D. Για παράδειγμα, οι περισσότερες ανοσοδοκιμασίες δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με 24,25(OH)₂D₃, 25,26(OH)₂D₃, και 25(OH)D₃-26,23-λακτόνη. Αν και έχει προταθεί, από μερικούς, ότι αυτές οι παρεμβολές είναι κλινικά άνευ σημασίας θα πρέπει, ωστόσο, να ληφθεί υπόψη ότι ο μεταβολίτης 24,25(OH)₂D₃ κυκλοφορεί σε περίπου 10-15% της συγκέντρωσης 25(OH)D και η παρουσία του θα μπορούσε να αυξήσει ελαφρώς την 25(OH)D, όπως μετράται από ανοσοδοκιμές και δεν μπορεί να αγνοηθεί εντελώς. Η παρατήρηση ότι τα βρέφη κάτω του 1 έτους έχουν σχετικά υψηλά επίπεδα του C-3 επιμερούς 25(OH)D και ότι αυτά θα μπορούσαν είτε να δίνουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στις ανοσοανιχνεύσεις είτε να παρουσιάζουν παρόμοια χρωματογραφική συμπεριφορά και να προκαλούν τα ίδια ζεύγη ιόντων MS/MS σε LC-MS/MS δημιουργεί μεγαλύτερη ανησυχία. Έχει επίσηςδειχθεί ότι η DiaSorin RIA δοκιμασία δεν δίνει διασταυρούμενες αντιδράσεις είτε με το 3επι-25(OH)D₂ ή 3-επι-25(OH)D₃. Είναι, συνεπώς, σημαντικό το γεγονός ότι κατά τη μέτρηση 25(OH)D ορού σε παιδιά ηλικίας κάτω του 1 έτους η δοκιμασία που χρησιμοποιείται είτε να μην αντιδρά με 3-επι-25(OH)D ή να επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο διαχωρισμό του 3-επι-25(OH)D από 25(OH)D. Η πρόσφατη διαθεσιμότητα ενός πρότυπου υλικού που περιέχει 3-επι-25(OH)D₃ (SRM 972 LEVEL 3) επιτρέπει πλέον στα εργαστήρια να ελέγχουν αν η μέθοδος τους επηρεάζεται ή όχι από παρεμβολές από αυτό το μεταβολίτη [100].

5.6 Η μέτρηση της 1,25(OH)₂D

Μολονότι η 1,25(OH)₂D είναι η βιολογικώς δραστητική μορφή της βιταμίνης D, αυτός ο αναλύτης δεν είναι ένας καλός δείκτης της συνολικής κατάστασης της βιταμίνης D για πολλαπλούς λόγους:

- 1) Η ημίσεια ζωή της κυκλοφορούσας 1,25(OH)₂D είναι μόνο 4 έως 6 ώρες, συμβάλλοντας έτσι στην μεταβλητότητα των επιπέδων της σε ορό και σε πλάσμα σε διαφορετικούς χρόνους.
- 2) Οι συγκεντρώσεις της 1,25(OH)₂D στον ορό και στο πλάσμα είναι περίπου 1000 φορές μικρότερη από 25(OH)D και, ως εκ τούτου, μπορεί να είναι δύσκολο να μετρηθούν.
- 3) Κι ίσως το πιο σημαντικό, η ανεπάρκεια βιταμίνης D οδηγεί σε μειωμένη εντερική απορρόφηση του ασβεστίου και σε χαμηλότερα επίπεδα ιονισμένου ασβεστίου τα οποία, με τη σειρά τους, διεγείρουν την έκκριση της PTH. Τελικά, η PTH αυξάνει το επίπεδο ιονισμένου ασβεστίου με πολλαπλούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης νεφρικής παραγωγής 1,25(OH)₂D. Έτσι, η έλλειψη συνολικά βιταμίνης D μπορεί πραγματικά να οδηγήσει σε αύξηση της συγκέντρωσης 1,25(OH)₂D.

Η μέτρηση της είναι χρήσιμη σε μερικές κλινικές περιπτώσεις, συμπεριλαμβανομένης της νεφρικής ανεπάρκειας (αποτυχίας να υδροξυλιώνει 25(OH)D), της κοκκιωματώδους νόσου (π.χ. σαρκοειδωση, ιστοπλάσωση), και της παρακολούθησης των σπάνιων εκ γενετής σφαλμάτων του μεταβολισμού της βιταμίνης D. Σε κοκκιωματώδη ασθένεια, υπάρχει αυξημένη μετατροπή της 25(OH)D σε 1,25(OH)₂D που μπορεί να οδηγήσει σε υπερασβεστιαμία. Μελέτες έχουν δείξει μία συσχέτιση των χαμηλότερων συγκεντρώσεων της 1,25(OH)₂D ορού και πλάσματος με υψηλότερη θνησιμότητα σε ασθενείς με καρδιακή νόσο, HIV και νεφρική ανεπάρκεια, αν και δεν είναι σαφές πώς να μεταφράσει κανείς αυτές τις πληροφορίες σε λήψη κλινικών αποφάσεων [101]. Πολλά κλινικά εργαστήρια στις Ηνωμένες Πολιτείες έχουν δει επίσης να αυξάνονται τα τελευταία χρόνια οι παραγγελίες για μέτρηση 1,25(OH)₂D, αν και δεν είναι συνήθως τόσο αυξημένες όπως για την 25(OH)D [102].

Λαμβάνοντας υπόψη τη σχετικά στενή κλινική αξία της μέτρησης στον ορό και στο πλάσμα, αυτό αυξάνει την πιθανότητα ότι η 1,25(OH)₂D μπορεί να ζητείται κατά λάθος. Δύο πιθανοί λόγοι για αυτή τη δυσλειτουργία περιλαμβάνουν σύγχυση για τις δύο μορφές της βιταμίνης D ή μια λανθασμένη αντίληψη ότι η παρακολούθηση της «ενεργούς» μορφή της βιταμίνης D θα πρέπει να γίνει για την καλύτερη αξιολόγηση της διατροφικής κατάστασης. Επιπλέον, οι κλινικοί γιατροί μπορεί να ζητήσουν ταυτόχρονα τη μέτρηση των δύο 25(OH)D και 1,25(OH)₂D (ίσως σκεπτόμενοι ότι περισσότερες πληροφορίες από αυτό το «πάνελ» είναι χρήσιμες), όταν μετρώντας 25(OH)D και μόνο είναι ό,τι ακριβώς απαιτείται για τη συνήθη εκτίμηση της διατροφικής κατάστασης [103].

5.6.1 Οι αναλυτικές προκλήσεις της 1,25(OH)₂D

Η 1,25(OH)₂D είναι ένας από τους κύριους ρυθμιστές μεταβολισμού του ασβεστίου. Λόγω της λιπόφιλης φύσης της και της χαμηλής συγκέντρωσής της στην κυκλοφορία, η μέτρησή της υπήρξε αντικείμενο έντονης εργασίας. Η 1,25(OH)₂D είναι η βιολογικά δραστική μορφή της βιταμίνης D, η παραγωγή και ο μεταβολισμός της οποίας ρυθμίζονται αυστηρά. Είναι σε μεγάλο βαθμό λιπόφιλη, είναι σχετικά ασταθής, και κυκλοφορεί σε 1.000 φορές χαμηλότερη συγκέντρωση στο αίμα από ότι η 25(OH)D. Αν η 25(OH)D θεωρείται μια «δύσκολη ανάλυση» για μέτρηση, η 1,25(OH)₂D παρουσιάζει μια ακόμα μεγαλύτερη αναλυτική πρόκληση. Είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί η εκχύλιση της 1,25(OH)₂D από ορό ή πλάσμα για την απομάκρυνση ουσιών που παρεμβαίνουν και για την αποδέσμευση της 1,25(OH)₂D από VDBP και αλβουμίνη. Απαιτείται κατάλληλος εξοπλισμός για τον καθαρισμό του δείγματος. Ένα σημαντικό πρόβλημα που υπάρχει με τις μεθόδους εκχύλισης με διαλύτη είναι ότι οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν ήταν οι ίδιες με εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση της 25(OH)D, έτσι αυτή η σημαντική παρεμποδίζουσα ουσία ήταν επίσης παρούσα στο

Πίν. 10. Χαρακτηριστικά επίδοσης της IDS-ISYS 1,25(OH)₂D δοκιμασίας [105].

Λειτουργική ευαισθησία	<12.0 pg/mL
Ακρίβεια μεταξύ των αναλύσεων	16,0% (23.5 pg/ml) 8,6% (59.4 pg/ml) 9,6% (79.3 pg/ml) 6,9% (141 pg/ml)
Γραμμικότητα	92 έως 109%

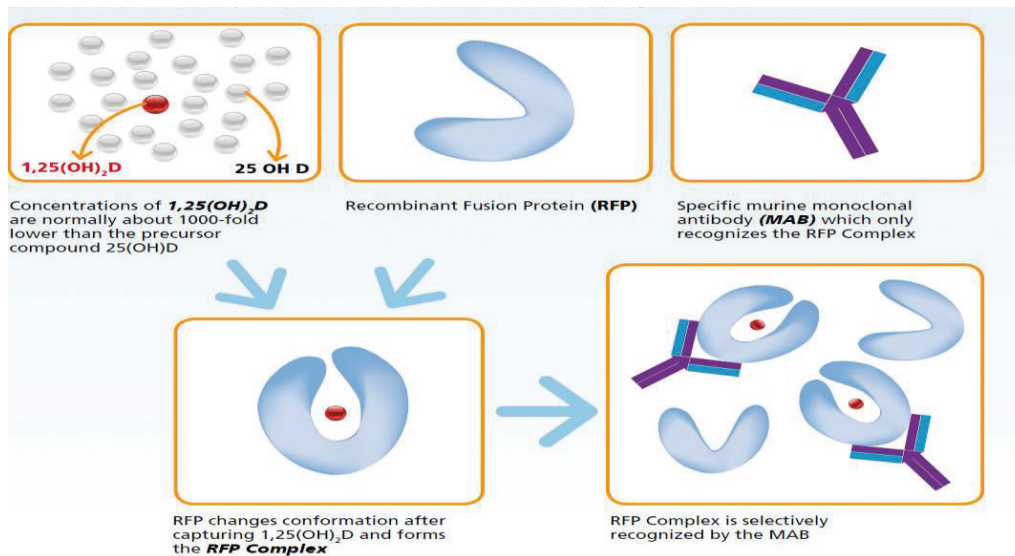
εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις 1000 φορές μεγαλύτερες από εκείνη της 1,25(OH)₂D. Η ειδικότητα για την 1,25(OH)₂D επομένως εξαρτάται κυρίως από τις μεθόδους ανίχνευσης που χρησιμοποιούνται [104].

Έχουν αναφερθεί τα αποτελέσματα της πλήρως αυτοματοποιημένης **IDS-ISYS 1,25(OH)₂D δοκιμασίας Χρ.IDS-ISYS**. Η δοκιμασία αυτή χρησιμοποιεί αντίσωμα αντι-1,25D επικαλυμμένο με μαγνητικά σωματίδια σε κυψελίδα 1. Μετά την επώαση, τα μαγνητικά σωματίδια πλένονται και η 1,25(OH)₂D εκλύεται. Το έκλουσμα μεταφέρεται σε κυψελίδα 2, όπου η ανοσολογική δοκιμή διεξάγεται με χρήση της IDS-ISYS 1,25(OH)₂D. Η κεκαθαρμένη 1,25D ανταγωνίζεται με 1,25D-ακριδινίου (1,25D-ACR) για περιορισμένη ποσότητα βιοτινυλιωμένων θέσεων αντι-1,25D αντισώματος. Τα συνδεδεμένα σύμπλοκα συλλαμβάνονται μέσω επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη μαγνητικών σωματιδίων. Μετά την πλύση, το δεσμευμένο σύμπλεγμα 1,25D-ACR μετράται και το σήμα που παράγεται είναι αντιστρόφως ανάλογο με την συγκέντρωση της 1,25D στο δείγμα. Τα χαρακτηριστικά επίδοσης αυτής της μεθόδου απεικονίζονται στον Πίνακα 10.

Η IDS-ISYS 1,25 VitDXr δίνει ακριβή αποτελέσματα για τη φροντίδα των ασθενών, βελτιώνοντας ταυτόχρονα την αποδοτικότητα της εργαστηριακής δοκιμής 1,25(OH)₂D [105].

5.6.2 Ιστορική ανασκόπηση των μεθόδων για 1,25(OH)₂ DCPB

Η πρώτη δημοσιευμένη μέθοδος χρησιμοποιούσε για την εκχύλιση 20 mL δείγματος μεθανόλη-χλωροφόρμιο και εν συνεχεία χρωματογραφικό καθαρισμό. Η ανίχνευση εφαρμόζοταν χρησιμοποιώντας υποδοχέα εντερικής βιταμίνης D που είχε πρόσφατα απομονωθεί από έντερο κοτόπουλου, έτσι αυτός ήταν ένας κλασικός προσδιορισμός CPB που χρησιμοποιούσε [_{3H}]-1,25(OH)₂D. Ο υποδοχέας της χρωματίνης ήταν πολύ ειδικός για 1,25(OH)₂D, και αυτό επέτρεψε την ανίχνευση με μία ισχυριζόμενη ευαισθησία της ανάλυσης 0,2 pmole καθαρού προτύπου, αν και η χαμηλότερη συγκέντρωση που ανιχνεύθηκε στο πλάσμα ήταν 26 pmol/L (10 pg/mL). Βελτιώσεις στον καθαρισμό και ενσωμάτωση του διαχωρισμού HPLC επέτρεψαν την ταυτόχρονη ανίχνευση 25(OH)D και μια σημαντική μείωση στις απαιτήσεις του δείγματος. Περαιτέρω



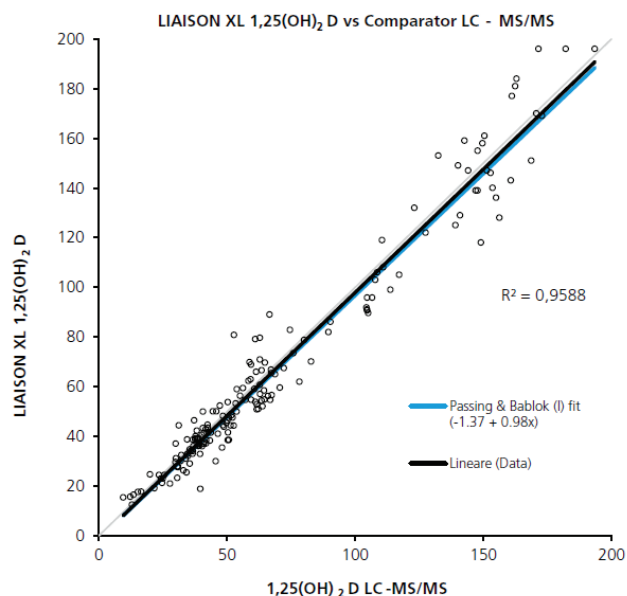
Εικ. 16. Η πορεία εργασίας της μεθόδου LIAISON XL για τη μέτρηση της 1,25(OH)₂D [82].

εξελίξεις στις δοκιμασίες CPB ήρθαν από τη χρήση υποδοχέα που απομονώνεται από αδένες θύμου μόσχου, ο οποίος ήταν πολύ πιο σταθερός από τα παρασκευάσματα εντέρου κοτόπουλου. Εμπορικές μέθοδοι που χρησιμοποιούν την δοκιμασία με υποδοχέα θύμου μόσχου έγιναν διαθέσιμες, και μια σειρά από τροποποιήσεις έχουν γίνει επί πολλά χρόνια αλλά η ειδικότητα του υποδοχέα του θύμου για την 1,25(OH)₂D ήταν τέτοια ώστε η radio receptor assay (RRA) να έχει παραμείνει ένα πρότυπο σύγκρισης/μέθοδος αναφοράς για πάνω από 35 χρόνια [104].

5.6.3 Ανοσοανάλυση

Το 1978, δημοσιεύτηκε η πρώτη αναφορά για μια RIA που μετρούσε την 1,25(OH)₂D. Η δοκιμασία απαιτούσε καθαρισμό του δείγματος εξαιτίας της σχετικά φτωχής ειδικότητας του αντισώματος κουνελιού, και ένας τριτωμένος ιχνηθέτης χρησιμοποιήθηκε αλλά συνολικά ήταν σχετικά ευαίσθητη σε σύγκριση με την RRA, με όριο ανίχνευσης 52 pmol/L (20 pg/mL). Η βελτιωμένη τεχνολογία αντισωμάτων οδήγησε σε RIAs με καλύτερη απόδοση και ανίχνευση ορίων αλλά η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των αντισωμάτων με 25(OH)D και 24,25(OH)₂D σήμαινε ότι ο εκτεταμένος καθαρισμός της 1,25(OH)₂D του ορό εξακολουθούσε να απαιτείται. Με το χειρισμό της εκχύλισης και της χρωματογραφίας και με τη χρήση συγκεκριμένων αντισωμάτων, δοκιμασίες ειδικές για 1,25(OH)₂D₂ και 1,25(OH)₂D₃ παρήχθησαν.

Μία σημαντική πρόοδος ήταν η ανάπτυξη και η εμπορευματοποίηση μιας RIA για 1,25(OH)₂D που απαιτούσε ελάχιστο προκαθαρισμό του δείγματος, δεν χρειαζόταν εσωτερική τυποποίηση, και χρησιμοποιούσε ένα ¹²⁵I-επισημασμένο ιχνηθέτη που επέτρεπε τον ποσοτικό προσδιορισμό. Αυτή η δοκιμασία περιελάμβανε εκχύλιση με ακετονιτρίλιο, που



Εικ. 17. Χαρακτηριστικά επίδοσης της LIAISON XL 1,25(OH)₂D [82].

ακολουθείται από κατεργασία του εκχυλίσματος με υπερωδικό νάτριο, και στη συνέχεια μια δεύτερη εκχύλιση και καθαρισμό της 1,25(OH)₂D με στερεάς φάσεως χρωματογραφία (C18-OH), που ακολουθείται με ποσοτικοποίηση με RIA. Ένα όριο ανίχνευσης 6,2 pmol/L (2.4 pg/ml) αναφέρεται, και η ανάκτηση για την 1,25(OH)₂D₂ ήταν 64-71% και για την 1,25(OH)₂D₃ 90-101% και μέσω της μετατροπής της 24,25(OH)₂D₃ και 25,26(OH)₂D₃ προς αλδεύδη και κετόνη χρησιμοποιώντας υπερωδικό νάτριο, η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με γνωστούς μεταβολίτες ήταν σημαντικά μειωμένη [106].

Περαιτέρω αναλυτική και κλινική επικύρωση της εμπορικής δοκιμασίας DiaSorin δημοσιεύθηκε το 2002. Μια εξαιρετικά πρωτότυπη προσέγγιση για τον καθαρισμό και εκχύλιση εγκρίθηκε από την IDS σε μια εμπορική δοκιμασία που χρησιμοποιεί ανοσοεκχύλιση για διαχωρισμό 1,25(OH)₂D από απολιπιωμένα δείγματα χρησιμοποιώντας ένα αντίσωμα που δεσμεύεται σε μια μίνι-ανοσοκάψουλα. Η έκλυση του δείγματος από την κάψουλα, εξάτμιση μέχρι ξηρού, κατόπιν ανασύσταση πριν από τη RIA οδηγεί σε μια γρήγορη, φιλική προς το χρήστη δοκιμασία. Η IDS RIA έχει τροποποιηθεί σε μία μη ισοτοπική μορφή χρησιμοποιώντας αβιδίνη-συνδεσμένη με υπερ-οξειδάση αγριοραπανιού και υπόστρωμα τετρα-μεθυλο-βενζιδίνης για να παράγει σήμα στα 450 nm. Τόσο η RIA και EIA παρουσιάζουν εξαιρετική συσχέτιση με RRA και ένα όριο ανίχνευσης 9,4 pmol/L (3.6 pg/ml). Ανησυχίες έχουν διατυπωθεί σχετικά με μια πιθανή συνεισφορά στη μέτρηση της 1,25(OH)₂ από άλλους 1α-υδροξυλιωμένους μεταβολίτες και διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για την 1,25(OH)₂D₃ 26,23-λακτόνη, 1,24,25(OH)₃D₃ και 1,25,26(OH)₃D₃ έχει αποδειχθεί σε δοκιμασίες DiaSorin και IDS.

5.6.4 HPLC, LC-MS/MS, και GC-MS

Η μέτρηση της 1,25(OH)₂D με μεθόδους άμεσης ανίχνευσης UV δεν είναι δυνατή λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης στο αίμα (picomoles ανά λίτρο). Η 1,25(OH)₂D έχει λίγες ιονιζόμενες πολικές ομάδες, έτσι τεχνικές που αυξάνουν την αποδοτικότητα ιονισμού (δίνοντας την παραγωγικοποίηση δείγματος) έχουν μια δοκιμασία αραίωσης ισοτόπων μάζας (θραυσματογράφημα) για 1,25(OH)₂D και εκδόθηκαν για πρώτη φορά το 1979.

Εκχύλιση 20 mL ορού διεξήχθη χρησιμοποιώντας χλωροφόρμιο-μεθανόλη μετά την προσθήκη του ^[26-2H3] 1,25(OH)₂D₃ και καθαρισμό με υγρή χρωματογραφία. Το καθαρισμένο υλικό μετετέραπη εντός του τριμεθυλ-σιλυλ αιθέρα και αναλύθηκε με GC-MS. Το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) ήταν 13 pmol/L (5 pg/mL), με CV 5% αλλά ο μεγάλος όγκος δείγμα περιόρισε τη γενική εφαρμογή της δοκιμασίας. Με μια τεχνική LC/MS με τη χρήση θετικών και αρνητικών ιόντων ανίχνευσης μετά την απευθείας σύνδεση post column Diels Alder παραγωγικοποίησης ελήφθη ένα LLOQ της τάξης του 1 pmol/L. Η 1,25(OH)₂D₃ σε αρουραίο και χοίρο μετρήθηκε με LC-MS/MS μετά από εκχύλιση και καθαρισμό χρησιμοποιώντας τόσο αντίστροφης φάσης και κανονικής φάσης επί C18 φυσίγγιο, ακολουθούμενη από την παραγωγή ενός προϊόντος προσθήκης αμμωνίου πριν από τον θετικό ιονισμό ηλεκτρο-ψεκασμού. Η LLOQ ήταν 20 pg/mL χρησιμοποιώντας 1 κ. εκ. δείγματος.

Για την παραγωγικοποίηση χρησιμοποιήθηκε 4-φαινυλ-1,2,4-τριαζολινο-3,5-διόνη (PTAD), ένα δείγμα SPE και της μέτρησης, χρησιμοποιώντας ultra performance υγρή χρωματογραφία (UPLC) ηλεκτροσπρέι. Η MS επιτρέπει την ταυτόχρονη ποσοτικοποίηση ενός προφίλ των μεταβολιτών της βιταμίνης

D [1,25(OH)₂D₂, 1,25(OH)₂D₃, 24,25(OH)₂D₃, 25(OH)₂D₂, και 25(OH)₂D₃] με LOQ 25 pg/ml και CV 5-16% για 1,25(OH)₂D₃. Η διαδικασία SPE επέτρεψε υψηλή φόρτωση του δείγματος στη στήλη UPLC, και εστίαση στη στήλη δείγματος, εμπόδιζε τη διεύρυνση της μπάντας, επιτρέποντας εξαιρετικό διαχωρισμό και εξαλείφοντας ενδογενή παρεμβολή με παράλληλη ελαχιστοποίηση της καταστολής ιόντων αλλά με χρόνο τρεξίματος 27 λεπτών. Οξικό λίθιο έχει χρησιμοποιηθεί για να παραχθούν ιονιζόμενα προϊόντα προσθήκης σε μία μέθοδο που χρησιμοποιεί μια σύνθετη διαδικασία απευθείας επεξεργασίας δείγματος με τη χρήση μιας στήλης διάχυσης που ακολουθείται από μία αλυσίδα δύο μονολιθικών στηλών για τον καθαρισμό και εμπλουτισμό του δείγματος πριν από την ποσοτικοποίηση σε μια εξαιρετικά ευαίσθητη LC-MS/MS.

Αμφότερες οι 1,25(OH)₂D₂ και 1,25(OH)₂D₃ μπορεί να μετρηθούν σε 30 IL δείγματος με LLOQ για 1,25(OH)₂D₃ από 15 ng/L (36 pmol/L), με CV 5-15% σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις, καθώς και συνολικό χρόνο τρεξίματος ανά δείγμα 30 λεπτά. Η IDS στήλη ανοσοσυγγένειας και τα αντιδραστήρια ενσωματώνονται σε μία διαδικασία παρασκευής του δείγματος μετά από καταβύθιση των πρωτεϊνών και SPE. Λίθιο οξικό χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή προϊόντων προσθήκης πριν την LC-MS/MS ανάλυση. Αυτή η μέθοδος αφαιρεθεί ισοβαρικές παρεμβολές και matrix effects, με αποτέλεσμα σημαντικά μειωμένη καταστολή ιόντος με τις προκύπτουσες LLOQs 3,9 ng/L (9.1 pmol/L) για 1,25(OH)₂D₂ και 3.4 ng/L (8.2 pmol/L) για 1,25(OH)₂D₃ με interassay CVs 2,5 έως 7,0%.

Μια παρόμοια προσέγγιση με βάση τις στήλες IDS για ανοσοεκχύλιση αλλά την παρασκευή παραγώγου χρησιμοποιώντας PTAO πριν από UPLC MS/MS οδήγησε σε βελτιωμένη ευαισθησία με LLOQs του 0,65 ng/L (1.5 pmol/L) για 1,25(OH)₂D₂ και 1,25 ng/L (3,0 pmol/L) για 1,25(OH)₂D₃ και μεταξύ των μεθόδων CVs 8,0 έως 13,0%. Όλες οι LC-MS/MS μέθοδοι που περιγράφονται παραπάνω είναι αρκετά υψηλής έντασης εργατικού δυναμικού, με χειροκίνητη ροή εργασίας και περιορισμένη απόδοση (7,5 ώρες για να επεξεργαστεί 21 δείγματα). Οι μελλοντικές εξελίξεις αναμένεται να ενσωματώσουν περισσότερη online επεξεργασία, αυτοματοποιημένη προετοιμασία δείγματος και μαζική σήμανση για την αύξηση της απόδοσης.

Μια σύγκριση των μετρήσεων LC-MS/MS της 1,25(OH)₂D και της ανοσοδοκιμής IDS έχει επισημάνει διαφορές στην αναγνώριση της 1,25(OH)₂D₂, όταν υψηλής δόσης βιταμίνη D₂ (300.000 IU) χορηγείται ενδομυϊκά. Η μέθοδος LC-MS/MS ανίχνευσε σημαντική αύξηση της ολικής 1,25(OH)₂D, κυρίως λόγω της αύξησης της 1,25(OH)₂D₂ αλλά ο ανοσοπροσδιορισμός απέτυχε να ανιχνεύσει αυτή την αύξηση της 1,25(OH)₂D. Αυτό φαίνεται να είναι παρόμοιο με την κατάσταση που παρατηρείται με τους ανοσοπροσδιορισμούς 25(OH)D, όπου τα αντισώματα που ενσωματώνονται στο σύστημα προσδιορισμού δεν

είναι σε θέση να αναγνωρίζουν την 1,25(OH)₂D₂ που συντίθεται in vivo μετά από εξωγενή χορήγηση βιταμίνης D₂ [104].

5.7 Η μέτρηση της βιταμίνης D κατά την κύηση

Η κύηση συνδέεται με σημαντικές αλλαγές στην ομοιοστάση του ασβεστίου με την βιταμίνη D να διαδραματίζει έναν κρίσιμο ρόλο. Τα επίπεδα της 25(OH)D και της καλσιτριόλης διαφέρουν λόγω των αλλαγών στην VDBP. Οι συγκεντρώσεις της βιοδιαθέσιμης και της ελεύθερης βιταμίνης D στον ορό δεν επηρεάζονται από την VDBP. Ως εκ τούτου, μετρήθηκαν η ολική, η βιοδιαθέσιμη και τα ελεύθερα κλάσματα 25(OH)D και καλσιτριόλης σε δείγματα ορού από έγκυες και από μη έγκυες γυναίκες. Η συσχέτιση μεταξύ της ολικής 25(OH)D και των κλασμάτων της (βιοδιαθέσιμης και ελεύθερης) και της καλσιτριόλης και τα κλασμάτων της με PTH και CTX διερευνήθηκε για να προσδιοριστεί η ένωση ή οι ενώσεις που ήταν άριστοι δείκτες της κατάστασης της βιταμίνης D στην εγκυμοσύνη. Η ολική 25(OH)D ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε έγκυες γυναίκες παρά τη σημαντική αύξηση της VDBP (276±15 Vs 410±30 ug/ml). Η βιοδιαθέσιμη και η ελεύθερη 25(OH)D ήταν χαμηλότερες από το κανονικό (n=55), και ήταν στο εύρος της έλλειψης ή της ανεπάρκειας αν και τα επίπεδα της PTH και CTX ήταν στο εύρος των φυσιολογικών τιμών. Η συσχέτιση μεταξύ της παραθορμόνης και της ολικής 25(OH)D ήταν φτωχή (R²=0,3). Επίσης φτωχή ήταν η συσχέτιση μεταξύ PTH και βιοδιαθέσιμης ή ελεύθερης 25(OH)D (R²<0.5). Η τρέχουσα εκτίμηση της κατάστασης της βιταμίνης D σε έγκυες γυναίκες με μέτρηση της 25(OH)D δεν αντικατοπτρίζει επαρκώς την ομοιοστασία του ασβεστίου στην εγκυμοσύνη. Η 25(OH)D ή τα κλάσματά της δεν συσχετίζονται με PTH ή CTX. Από την άλλη πλευρά, η καλσιτριόλη συσχετίζεται αρκετά καλά με PTH και CTX στην εγκυμοσύνη όταν προσδιορίζεται είτε ως ολική, βιοδιαθέσιμη ή ελεύθερη καλσιτριόλη. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η βιοδιαθέσιμη ή ελεύθερη καλσιτριόλη είναι οι καλύτεροι δείκτες για τον καθορισμό της βιταμίνης D σε έγκυες γυναίκες [107].

6. Βέλτιστες τιμές βιταμίνης D

Τα επίπεδα της 25(OH)D που χρησιμοποιούνται για τον ορισμό της ανεπάρκειας της βιταμίνης D έχουν τροποποιηθεί κατά τη διάρκεια των προηγούμενων δύο δεκαετιών. Δεν υπάρχει συναίνεση για τη βέλτιστη συγκέντρωση 25(OH)D. Για τον προσδιορισμό των τιμών αποκοπής (cutoff levels), οι ερευνητές έχουν εξετάσει το επίπεδο των 25(OH)D που συνδέεται με μέγιστη καταστολή της παραθορμόνης, μέγιστη απορρόφηση του ασβεστίου και μειωμένο κίνδυνο καταγμάτων [108].

Στην πραγματικότητα, οι αληθινές απαιτήσεις για την υγεία των οστών πιθανώς αντικατοπτρίζουν την κατανομή των τιμών αντί για μια συγκεκριμένη τιμή. Αυτό είναι προβληματικό για τους σκοπούς της διά-

γνωσης της ανεπάρκειας, επειδή οι κλινικοί γιατροί απαιτούν ένα συγκεκριμένο σημείο για να γίνει η διάγνωση. Ενώ οι ειδικοί γενικά συμφωνούν ότι επίπεδα χαμηλότερα από 20 ng/mL (50 nmol/L) μπορεί να θέσουν ένα άτομο σε κίνδυνο σε σχέση με την υγεία των οστών, υπάρχει διαφωνία σχετικά με το αν ο στόχος 25(OH)D πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 30 ng/mL για τη σκελετική υγεία [109].

Το 2011, το Institute of Medicine (IOM) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η τιμή 20 ng/ml ήταν το επίπεδο που είναι απαραίτητο για την καλή υγεία των οστών για σχεδόν όλα τα άτομα [110]. Άλλες ομάδες προτείνουν ότι η 25(OH)D θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 30 ng/mL (75 nmol/L), ιδιαίτερα σε ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας. Οι ομάδες αυτές περιλαμβάνουν την Ενδοκρινολογική Εταιρεία, και το Διεθνές Ίδρυμα Οστεοπόρωσης [111]. Η Ενδοκρινολογική Εταιρεία υποδεικνύει ότι, λόγω της μεταβλητότητας στις εργαστηριακές μετρήσεις της 25(OH)D, στοχεύοντας σε ένα υψηλότερο επίπεδο 25(OH)D από το επίπεδο στόχο (όπως 40 ng/mL [100 nmol/L]) διασφαλίζεται καλύτερα ότι όλα τα πρόσωπα θα πληρούν τις τιμές στόχους [112]. Ο IOM κατέληξε, ωστόσο, ότι μπορεί να υπάρχει μία δυναμική συσχέτιση σχήματος U μεταξύ 25(OH)D και κάποιων δυνητικών κινδύνων (π.χ. θνησιμότητα, καρδιαγγειακή ασθένεια, επιλεγμένων καρκίνων, πτώσεις) σε επίπεδα υψηλότερα από 50 ng/mL (125 nmol/L). Οι ειδικοί συμφωνούν ότι βέλτιστες συγκεντρώσεις 25(OH)D για την εξωσκελετική υγεία δεν έχουν τεκμηριωθεί [110].

Περίσσεια βιταμίνης D: Μεγαλύτερη από 80 ng/ml (200 nmol/l) με συνοδευτική υπερασβεστιαμία. Ο Vieth (1999) δήλωσε ότι για υπερασβεστιαμία από υπερβιταμίνωση D η 25(OH)D πρέπει να είναι πάντα μεγαλύτερη από 88 ng/ml (220 nmol/l). Ο Holick (2000) ανέφερε ότι δηλητηρίαση από βιταμίνη D δεν συμβαίνει αν η τιμή της δε είναι υψηλότερη από 125 ng/ml (312 nmol/l). Ως εκ τούτου, το κριτήριο που εκφράζει την περίσσεια βιταμίνης D θα πρέπει να είναι πάνω από 80 ng/ml (200 nmol/l), και το επίπεδο τοξικότητας ενδείκνυται όταν επίσης συνυπάρχουν ενδείξεις υπερασβεστιαμίας. Οι τιμές αναφοράς βάσει του πληθυσμού είναι προβληματικές λόγω της μεταβλητότητας των επιπέδων 25(OH)D μεταξύ διαφορετικών εθνικοτήτων, γεωγραφικής θέσεως και εποχών [113]. Υπάρχουν ουσιαστικές ενδείξεις ότι η έλλειψη βιταμίνης D είναι κοινή στις Ηνωμένες Πολιτείες και πολλές άλλες χώρες, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον καθορισμό ενός «κανονικού» πληθυσμού. Τέλος, αυτό που καθορίζει το κανονικό ή το βέλτιστο όσον αφορά στα επίπεδα της βιταμίνης D είναι ένα θέμα συζήτησης, δεδομένου ότι πολλοί άνθρωποι, ακόμα και χωρίς σημεία ή συμπτώματα παθολογίας, είναι ελλειπείς ή οριακά ανεπαρκείς σε αποθέματα βιτ. D. Μια φυσιολογική προσέγγιση για τον καθορισμό 25-υδροξυβιταμίνης D είναι να εξετάσουμε τη σχέση της με την PTH. Αυτά δείχνουν μια αντίστροφη σχέση, με τις συγκεντρώσεις της παραθορμόνης να αυξάνονται όταν η συγκέντρωση

Assay or reference laboratory	Methodology	Interpretation	25-Hydroxyvitamin D concentration
ARUP Laboratories (Salt Lake City, UT)	Chemiluminescent immunoassay ³⁹ or LC/MS/MS ⁴⁰	0-17 years	< 20 ng/mL
		Deficiency	≥ 20 ng/mL
Mayo Medical Laboratories (Rochester, MN)	LC/MS/MS ⁴¹	Adults	< 20 ng/mL
		Deficiency	20-29 ng/mL
		Insufficiency	30-80 ng/mL
		Optimum	> 150 ng/mL
LabCorp (San Diego, CA)	Immunochemiluminetric assay ⁴³	Possible toxicity	> 80 ng/mL
		Normal	32-100 ng/mL
Diaisorin Liaison®	Immunochemiluminetric assay ⁴⁴	Deficiency	< 10 ng/mL
		Insufficiency	10-30 ng/mL
		Sufficiency	30-100 ng/mL
		Toxicity	> 100 ng/mL
IDS Enzyme immunoassay	Enzyme immunoassay ⁴⁵	Deficiency	< 30 ng/mL
IDS Radioimmunoassay	Radioimmunoassay ⁴⁹	Normal adults	9.2-45.2 ng/mL
Quest Diagnostics (San Juan Capistrano, CA)	LC/MS/MS ⁵⁰	Deficiency	< 20 ng/mL
		Insufficiency	20-30 ng/mL
		Optimal	> 30 ng/mL

Πίν. 11. Τιμές αναφοράς για την 25(OH)D. (Krasowski, 2011 [103]).

25(OH)D Cutoff	Expert and Professional Body Opinions About Cutoff Levels	Association Between 25(OH)D Level and Health Outcomes	Subgroup Differences for the Association
<20 ng/mL	Widely used by researchers and available guidelines as indicative of deficiency	Levels >20 ng/mL have been associated with decreased risk for fractures, cardiovascular disease, colorectal cancer, diabetes, depressed mood, cognitive decline, and mortality	<ul style="list-style-type: none"> Association with fracture and cardiovascular disease not seen in blacks Mortality association seen in blacks Association with falls has been seen in studies of institutionalized elderly populations Limited data that association with cognition may be stronger in women
20–30 ng/mL	Debate about whether 25(OH)D levels in this range represent deficiency	<ul style="list-style-type: none"> Levels >24 ng/mL associated with decreased cardiovascular disease risk Levels >30 ng/mL associated with decreased mortality and colorectal cancer risk Levels >30 ng/mL have mixed association with decreased fracture risk 	<ul style="list-style-type: none"> Association with cardiovascular disease not seen in blacks Mortality association seen in blacks
>30–40 ng/mL	General agreement that 25(OH)D levels in this range do not represent deficiency; however, some recommend targeting 25(OH)D to this range because of potential variability in laboratory testing	Levels up to 35–40 ng/mL may be associated with decreased risk for mortality and colorectal cancer	No data available
>50 ng/mL	Debate about whether 25(OH)D levels above this range are associated with adverse health outcomes	Possible U-shaped association between vitamin D level and risk for mortality and pancreatic cancer	No data available
>200 ng/mL	25(OH)D levels above this range are considered to be toxic	No data available	No data available

Note: For consistency throughout the report, we converted 25(OH)D levels reported as nmol/L to ng/mL (1 nmol/L = 0.4 ng/mL).

Πίν. 12. Η συσχέτιση των τιμών cutoffs της 25(OH)D με την κατάσταση της υγείας. (Τροποποιημένο από LeBlanc, 2014 [115]).

25(OH)D μειώνεται. Αυτή είναι μια σημαντική φυσιολογική λειτουργία για τη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου. Η παραθορμόνη αρχίζει να αυξάνει ουσιαστικά όταν οι συγκεντρώσεις 25(OH)D πέφτουν κάτω από 30 έως 40 ng/mL, υποδηλώνον-

τας ότι επίπεδα κάτω από αυτό το εύρος δεν είναι άριστα, παρόλο που εμφανής νόσος (π.χ. ραχίτιδα, οστεομαλακία, πόνος στα οστά) δεν μπορεί να είναι έκδηλη. Επίπεδα βιταμίνης D μεγαλύτερα ή ίσα από 32 ng/mL (80 nmol/L) σχετίζονται με τη μέγιστη κατα-

στολή της PTH [103]. Μια εναλλακτική προσέγγιση για το εύρος τιμών αναφοράς βιταμίνης D είναι να καθοριστούν συγκεντρώσεις 25(OH)D στον ορό και στο πλάσμα, εκτός των οποίων οι αρνητικές επιπτώσεις για την υγεία αυξάνονται σημαντικά. Αυτή είναι η προσέγγιση που διέπει τον ορισμό της ανεπάρκειας της βιταμίνης D σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας ως συγκέντρωση 25(OH)D στον ορό ή στο πλάσμα μικρότερη από 20 ng/mL (50 nmol/L), που εμφανίζεται σε περίπου 1 δισεκατομμύριο άνθρωποι παγκοσμίως [113]. Μερικές τιμές οριοθετηθούν περαιτέρω ένα φάσμα «σοβαρής ανεπάρκειας» (μικρότερο ή ίσο με 10 ng/mL) που συνοδεύονται από σημαντικές διαταραχές της ομοιοστασίας του ασβεστίου (π.χ. δυσαπορρόφηση ασβεστίου, ραχίτιδα/οστεομαλακία) [114].

Συμπερασματικά, φαίνεται να υπάρχει συναίνεση σχετικά με τον ορισμό της ανεπάρκειας βιταμίνης D σε επίπεδα <25 nmol/L, η οποία βασίζεται σε ασθένειες όπως ραχίτιδα και οστεομαλακία. Υψηλότερες τιμές στόχοι έχουν προταθεί για υποκλινικές παραμέτρους, όπως το επίπεδο της παραθορμόνης, αλλά σημαντική ασάφεια παραμένει ως προς το ποια θα πρέπει να είναι η κατάλληλη τιμή στόχος της βιταμίνης D στον ορό. Επιπλέον, οι περισσότερες από τις μελέτες διεξήχθησαν σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες και ηλικιωμένους άνδρες, και δεν μπορεί πιθανόν να γενικευθούν σε άλλες ηλικιακές ομάδες. Το «κατώφλι» για τα επίπεδα της βιταμίνης D για την πρόληψη των συνθηκών που σχετίζονται με την γενικότερη υγεία κι όχι μόνο τη σκελετική δεν μπορεί να προσδιοριστεί έως ότου αποδειχθεί η αιτιώδης επίδραση μεταξύ των επιπέδων της βιταμίνης D και αυτών των συνθηκών υγείας. Αυτό είναι ένα συνεχές θέμα για έρευνα γύρω από τον οποίο υπάρχει επί του παρόντος εξαιρετικά μεγάλη αβεβαιότητα έως ότου σχηματιστούν συμπεράσματα που θα υποστηρίξουν τον έλεγχο ρουτίνας βιταμίνης D. Ως εκ τούτου, μέχρι στιγμής, δύο τιμές στόχοι εγκρίθηκαν, 25 nmol/L (με βάση τον κίνδυνο της ραχίτιδας και της οστεομαλακίας), και η τιμή κατώφλι των 50 nmol/L (με βάση τις αλληλεπιδράσεις με PTH) [114].

7. Βιολογική μεταβλητότητα

Το αποτέλεσμα μιας εξέτασης δεν είναι μια «τέλεια» τιμή αλλά εμπεριέχει: α) το συστηματικό σφάλμα (bias) και β) το τυχαίο αναλυτικό σφάλμα (imprecision). Η τιμή που δίνει το εργαστήριο κατά τη μέτρηση μιας παραμέτρου αποτελεί μια, όσο το δυνατόν, καλύτερη προσέγγιση της αληθούς τιμής αυτής της παραμέτρου. Οι συνθήκες μέτρησης στο εργαστήριο, αλλά και οι μεθοδολογίες μέτρησης, τα διαφορετικά αντιδραστήρια αποτελούν πηγές της αναλυτικής μεταβλητότητας.

Το συστηματικό αναλυτικό σφάλμα μπορούμε να το υπολογίσουμε μέσω της συμμετοχής του εργαστηρίου σε πρόγραμμα εξωτερικού ελέγχου της ποιότητας και το τυχαίο από τον εσωτερικό έλεγχο

ποιότητας με τις καθημερινές μετρήσεις δειγμάτων ελέγχου με γνωστές συγκεντρώσεις (controls). Και τα δύο δίδονται ως συντελεστής μεταβλητότητας για κάθε μία μετρούμενη παράμετρο χωριστά ($B\%$ για το συστηματικό και CV_A για το τυχαίο). Ο συντελεστής μεταβλητότητας δίδεται ως αριθμός επί τοις εκατό και όσο μικρότερος είναι, τόσο μικρότερο το τυχαίο αναλυτικό σφάλμα. Αυτό αποτελεί ένα μέτρο της αβεβαιότητας των μετρήσεων, μπορούμε να το περιόρισουμε, αλλά δεν μπορούμε να το εξαφανίσουμε.

Τελευταία έχει επικρατήσει στον υπολογισμό του συνολικού σφάλματος να συνυπολογίζεται και η βιολογική μεταβλητότητα της παραμέτρου. Υπάρχει μια βάση δεδομένων για τη βιολογική μεταβλητότητα σχεδόν όλων των αναλύσεων που αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο στο εργαστήριο κλινικής χημείας [116].

Η βιολογική μεταβλητότητα συνίσταται σε ενδοατομική (CV_I) και διατομική (CV_G). Η αναλογία CV_I προς CV_G , γνωστή ως δείκτης ατομικότητας, είναι σημαντική για τον καθορισμό της καταλληλότητας της χρήσης των «φυσιολογικών» τιμών αναφοράς βάσει πληθυσμού στην ανίχνευση μεταβολών της κατάστασης της νόσου σε άτομα. Ο δείκτης ατομικότητας (II) είναι η αναλογία βιολογικής μεταβλητότητας (CV_I : η τυχαία διακύμανση τιμών γύρω από ένα ομοιοστατικό σημείο) προς τη διατομική μεταβλητότητα (CV_G : η διακύμανση των διαφορετικών ομοιοστατικών σημείων σε άτομα του ίδιου πληθυσμού) μιας δοκιμασίας και δίνεται από τον τύπο: $II = CV_I / CV_G$. Αν ο II για την εν λόγω αναλυόμενη ουσία είναι μεγαλύτερος από 1,4 (δηλαδή, αν η CV_I είναι πολύ μεγαλύτερη από την CV_G) το αποτέλεσμα μπορεί να συγκριθεί με το εύρος αναφοράς στον υγιή πληθυσμό. Ωστόσο, εάν ο II είναι μικρότερος από 0,6 (δηλαδή αν η CV_I είναι πολύ μικρότερη από την CV_G) αυτό υποδηλώνει ότι κάθε σύγκριση με το εύρος τιμών αναφοράς μπορεί να είναι παραπλανητική [117].

Η αξιολόγηση της διαφοράς μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων ενός ασθενούς είναι σημαντική δηλαδή δείχνει διαφορά στην κατάσταση της υγείας του όταν είναι μεγαλύτερη από το άθροισμα της αναλυτικής και βιολογικής διακύμανσης. Αυτή η διαφορά ονομάζεται κρίσιμη ή κλινικά σημαντική μεταβολή μιας βιολογικής παραμέτρου (RCV) ή και LSC (least significant change). Υπολογίζει την ελάχιστη διαφορά που πρέπει να έχουν δύο διαδοχικές τιμές της παραμέτρου, ώστε να θεωρήσουμε ότι η κατάσταση ενός ασθενούς μεταβλήθηκε σημαντικά και δεν είναι τυχαία. Δίνεται από τον τύπο: $RCV = 2\frac{1}{2} + Z + (CV_A^2 + CV_I^2)^{\frac{1}{2}}$ [118].

Οι Viljoen και συν προσδιόρισαν τη βιολογική μεταβλητότητα της 25(OH)D. Στην έρευνά τους η ενδοατομική μεταβλητότητα υπολογίστηκε ότι είναι ίση με 12,1% και η διατομική 40,3%. Η κρίσιμη διαφορά για διαδοχικές τιμές (RCV) για $P < 0,05$ υπολογίστηκε στο 38,4%. Ο δείκτης ατομικότητας ήταν πολύ χαμηλός περίπου 0,3 [119].

Αυτή η μελέτη έδειξε ξεκάθαρα τους περιορι-

σμούς της χρήσης των διαστημάτων αναφοράς για την 25(OH)D, τόσο σε διαγνώσεις όσο και για την παρακολούθηση. Δεν πρέπει να αναφερόμαστε σε φυσιολογικά αλλά σε επιθυμητά επίπεδα, ανάλογα με το άτομο που εξετάζεται. Το κάθε εργαστήριο θα πρέπει να είναι σε θέση να διερευνήσει την καταλληλότητα των επιπέδων αυτών για το δικό του πληθυσμό ασθενών και αν χρειάζεται να καθορίσει δικό του εύρος τιμών.

Μελέτες έχουν προσκομίσει αποδεικτικά στοιχεία για την μεταξύ των μεθόδων και μεταξύ των εργαστηρίων μεταβλητότητα της τάξης του 10% έως 20%, που θα μπορούσαν να περιορίσουν τη δυνατότητα για προσδιορισμό με ακρίβεια της κατάστασης ενός ατόμου σε βιταμίνη D με τη χρήση των τιμών της 25(OH)D. Σε μελέτες που συνέκριναν το πώς διαφορετικές δοκιμασίες μπορούν να χαρακτηρίσουν μία κατάσταση ως ανεπάρκεια, 4 έως 32 τοις εκατό των δειγμάτων θα είχαν θεωρηθεί είτε ανεπαρκή είτε όχι ανεπαρκή, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη δοκιμασία. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος για τη διαφορετική ταξινόμηση συμβαίνει όταν μετρώνται τα επίπεδα ενός ατόμου που κοντά σε καθορισμένες τιμές cutoffs ή αλλιώς κοντά στα όρια λήψης ιατρικής απόφασης (εκείνοι με πολύ υψηλά ή χαμηλά επίπεδα είναι μάλλον απίθανο να ταξινομούνται διαφορετικά) [120].

8. Η ανάγκη για την τυποποίηση και τη βελτίωση της ανακρίβειας

8.1 Το VDSP

Το VDSP (Vitamin D Standardization Program) είναι μια συνεργασία που οργανώθηκε το Νοέμβριο του 2010 από το Office of Dietary Supplements (ODS) και το National Institutes of Health (NIH). Η συνεργασία αυτή περιλαμβάνει τις συντονισμένες προσπάθειες των ODS, National Institute for Standards and Technology (NIST), Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS), την ένωση Αμερικανών Παθολόγων College of American Pathologists (CAP), την Αμερικανική Ένωση Κλινικής Χημείας (AACC), τη Διεθνή Ομοσπονδία Κλινικής Χημείας και Εργαστηριακής Ιατρικής (IFCC), μαζί με τις εθνικές έρευνες και μεμονωμένους συνεργάτες σε όλο τον κόσμο [121].

Ο στόχος του VDSP είναι η προώθηση τυποποιημένων εργαστηριακών μετρήσεων του συνόλου των 25(OH)D μεθόδων, προκειμένου να βελτιωθεί η διαδικασία λήψης αποφάσεων από τη μεριά των κλινικών ιατρών για την προώθηση και βελτίωση της δημόσιας υγείας σε όλο τον κόσμο. Με τον όρο ολική 25(OH)D εννοούμε το άθροισμα της 25(OH)D₃ και της 25(OH)D₂, [25(OH)D₃+25(OH)D₂]. Θα πρέπει να γίνει κατανοητό ότι αυτός ο ορισμός προϋποθέτει ότι η βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη) και η βιταμίνη D₂ (εργο-καλσιφερόλη) είναι ίσης βιολογικής αξίας μια υπόθεση που απαιτεί περαιτέρω μελέτη [122].

Είναι σημαντικό να καθοριστεί τι σημαίνει ο όρος τυποποίηση. Ένα τυποποιημένο εργαστήριο μέτρη-

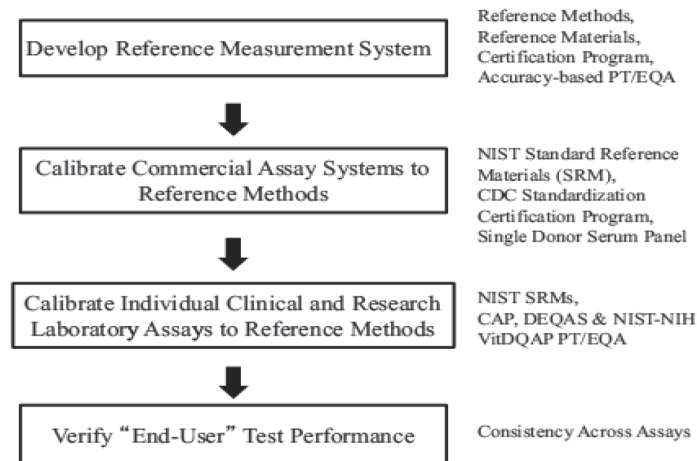
σης γενικά είναι ένα εργαστήριο που είναι ακριβές και συγκρίσιμο με όλα τα άλλα, ανεξαρτήτως χρόνου, τοποθεσίας και εργαστηριακής διαδικασίας. Όσον αφορά τη βιταμίνη D, ειδικότερα, μια τυποποιημένη εργαστηριακή μέτρηση της συνολικής 25(OH)D είναι μία μέτρηση που είναι ακριβής και συγκρίσιμη με την πάροδο του χρόνου, ανεξαρτήτου τοποθεσίας και εργαστηριακής διαδικασίας για τις τιμές που λαμβάνονται με τη χρήση πρότυπων διαδικασιών μέτρησης (RMPs), που αναπτύχθηκαν στο Εθνικό Ινστιτούτο Προτύπων και Τεχνολογίας (NIST) και στο Πανεπιστήμιο Ghent. Οι πρότυπες διαδικασίες μετρήσεων (μέθοδοι αναφοράς) είναι εργαστηριακές μέθοδοι που έχουν κριθεί σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές που αναπτύχθηκαν από το Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης (ISO) και παρατίθενται στη βάση δεδομένων του Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine. Είναι το «χρυσό πρότυπο» “gold-standard” για τις εργαστηριακές διαδικασίες, δηλαδή οι τιμές συγκέντρωσης που αποκτώνται χρησιμοποιώντας το NIST ή Ghent RMPs θεωρούνται ότι είναι οι «πραγματικές» συγκεντρώσεις. Ως εκ τούτου, η τυποποίηση θα οδηγήσει μελλοντικά όλα τα εργαστήρια αναφοράς σε μετρήσεις της «πραγματικής» συγκέντρωσης της ολικής 25(OH)D, όπως αυτή μετράται από το NIST και το Ghent University RMPs [122].

8.1.1 Στόχοι VDSP

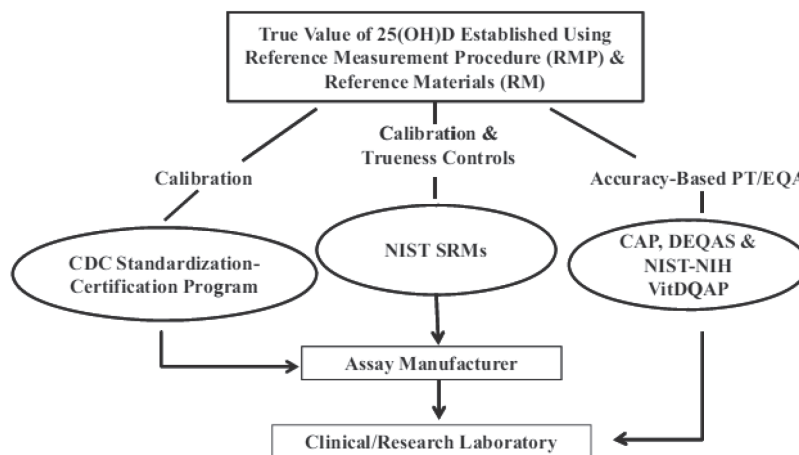
Ο πρωταρχικός στόχος του VDSP είναι η προώθηση της τυποποίησης όλων των 25(OH)D εργαστηριακών διαδικασιών σε όλο τον κόσμο προκειμένου να βελτιωθεί η κλινική και η δημόσια υγεία. Η τυποποίηση δεν απαιτεί μια ενιαία αναλυτική προσέγγιση και, ως εκ τούτου, το VDSP δεν επιβάλλει ούτε προτείνει κάτι τέτοιο. Η VDSP προσβλέπει στη συνεργασία με όλους τους κατασκευαστές μεθόδων και στο ότι τα κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια θα πρέπει να εργαστούν προς την κατεύθυνση αυτού του στόχου. Λαμβάνοντας υπόψη τον σκοπό του VDSP, τέσσερις κύριοι στόχοι έχουν αναπτυχθεί για τη βελτίωση της μέτρησης 25(OH)D σε όλο τον κόσμο:

- Προώθηση τυποποιημένων μετρήσεων της ολικής 25(OH)D από κατασκευαστές εμπορικών δοκιμασιών σε κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια.
- Τυποποίηση της μέτρησης ολικής 25(OH)D σε εθνικές έρευνες για την υγεία και τη διατροφή.
- Πραγματοποίηση ενός διεθνούς ερευνητικού προγράμματος αφιερωμένο στη βελτίωση της εργαστηριακής μέτρησης της ολικής 25(OH)D.
- Καταγραφή και μελέτη των διαφορών στις τυποποιημένες συγκεντρώσεις 25(OH)D μεταξύ των εθνικών ερευνών [122].

Είναι προφανές από τους στόχους αυτούς ότι σημαντική έμφαση δίνεται σε εθνικές έρευνες υγείας και διατροφής σε όλο τον κόσμο. Αυτές οι από τις κυβερνήσεις διεξαγόμενες έρευνες, συλλέγουν στοιχεία χρήσιμα για την αξιολόγηση της



Εικ. 18. Απαράφτητα βήματα για τη διαδικασία τυποποίησης. (Τροποποιημένη από Sempos, 2014 [122]).



Εικ. 19. Η πρόοδος του VDSP στην ανάπτυξη συστήματος μέτρησης αναφοράς. (Τροποποιημένη από Sempos, 2014 [122]).

τρέχουσας κατάστασης, καθώς και την παρακολούθηση της εξέλιξης της υγείας του πληθυσμού διαχρονικά. Τα δεδομένα χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη και τη ρύθμιση της πολιτικής για την υγεία, τη διεξαγωγή επιδημιολογικών ερευνών που διευκολύνουν τον καθορισμό της βέλτιστης κατάστασης της βιταμίνης D και την ανάπτυξη εργαστηριακών κλινικών διαστημάτων αναφοράς. Ως αποτέλεσμα, όλα τα ενδιαφερόμενα μέρη, συμπεριλαμβανομένων των κατασκευαστών εμπορικών δοκιμασιών και τα κλινικά-ερευνητικά εργαστήρια, προσπαθούν να παράγουν αποτελέσματα τα οποία θα είναι συνεπή με τις εργαστηριακές μεθόδους που χρησιμοποιούνται στις εθνικές έρευνες. Με αυτόν τον τρόπο, οι εθνικές έρευνες μπορούν να παίξουν καταλυτικό ρόλο στην προσπάθεια τυποποίησης και να προωθήσουν το πεδίο έρευνας για τη βιταμίνη D προς τα εμπρός [122].

8.1.1.1 Πως μπορεί να επιτευχθεί η τυποποίηση

Υπάρχουν τέσσερα βασικά βήματα που απαιτούνται για την επίτευξη της τυποποίησης.

Πρώτον, είναι απαραίτητο να αναπτυχθεί ένα σύστημα μέτρησης αναφοράς. Το σύστημα μέτρησης αναφοράς VDSP είναι ένα σύνολο από παραμέτρους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να καθοριστεί μια αλυσίδα βαθμονόμησης, δηλαδή, αλυσίδα ιχνηλασιμότητας με βάση την πραγματική τιμή, όπως αυτή καθορίζεται από μια διαδικασία μέτρησης αναφοράς στο συνήθες κλινικό ή ερευνητικό εργαστήριο. Αυτό το πολλών συστατικών σύστημα περιλαμβάνει τα ακόλουθα:

- Έναν ορισμό του τι πρόκειται να μετρηθεί, σε αυτή την περίπτωση τα επίπεδα της ολικής 25(OH)D σε nmol/L ή ng/mL.
- Ανάπτυξη της διαδικασίας μέτρησης αναφοράς (RMP).

- Υλικά αναφοράς, π.χ. the NIST NIST Standard Reference Materials (SRM).
- Κατευθυντήριες γραμμές ή τα όρια για την αξιολόγηση της δοκιμασίας απόδοσης.
- Ένα πρόγραμμα τυποποίησης-πιστοποίησης.
- Ακρίβεια με βάση την απόδοση των δοκιμών (PT) ή εξωτερική αξιολόγηση.
- Συστήματα (EQAs) και, στην περίπτωση του VDSP, διαδικασίες για τυποποίηση των αποτελεσμάτων ερευνών που μετρήθηκαν στο παρελθόν.

Δεύτερον, το σύστημα μέτρησης αναφοράς, αφού αναπτυχθεί, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συνδέσει τις εμπορικές δοκιμασίες με την μέθοδο αναφοράς. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας υλικά αναφοράς καθώς και δείγματα ορού από μονούς δότες με συγκεντρώσεις που τους έχουν ανατεθεί με τη χρήση του RMP, ως μέρος ενός προγράμματος τυποποίησης-πιστοποίησης.

Τρίτον, με τη χρήση SRMs, μαζί με τη συμμετοχή σε σχήματα διεργαστηριακών συγκρίσεων EQAS βασιζόμενα στην ακρίβεια που προβλέπεται από τον CAP και το DEQAS οι προσδιορισμοί συγκρίνονται με τις μεθόδους αναφοράς. Το τι επιτυγχάνει το σύστημα αυτό αφορά την ίδρυση μιας αδιάσπαστης αλυσίδας ιχνηλασιμότητας μεταξύ του RMP και των δοκιμασιών που χρησιμοποιήθηκαν στα ερευνητικά και κλινικά εργαστήρια για τον προσδιορισμό των συνολικών της 25(OH)D συγκεντρώσεων. Η ιχνηλασιμότητα διασφαλίζει ότι τα αποτελέσματα των κλινικών και ερευνητικών εργαστηρίων είναι ισοδύναμα με το αποτέλεσμα που θα πρέπει να λαμβάνεται με τη χρήση του RMP. Οι προσδιορισμοί ρουτίνας είναι έτσι βαθμονομημένοι ή τυποποιημένοι στο RMP και μετρούν και αναφέρουν την πραγματική συγκέντρωση του συνόλου των 25(OH)D.

Τέταρτον, είναι το ουσιαστικό βήμα για την επαλήθευση των επιδόσεων του «τελικού χρήστη», για να εξασφαλιστεί η συνέπεια μεταξύ διαφορετικών τύπων προσδιορισμού. Η απόδοση του τελικού χρήστη μπορεί να αποδειχθεί με την απόκτηση πιστοποίησης μέσω του προγράμματος τυποποίησης-πιστοποίησης του CDC. Ωστόσο, το πρόγραμμα CDC κατά κύριο λόγο συνιστάται για εμπορικούς κατασκευαστές και τα μεγάλα εμπορικά-κλινικά εργαστήρια. Τα άλλα κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια μπορούν να αποδείξουν την απόδοση κατά την τελική χρήση συμμετέχοντας στο πρόγραμμα ακρίβειας που παρέχεται από CAP και DEQAS [122].

Η αξιολόγηση «του τελικού χρήστη» απαιτεί τον καθορισμό ποσοτικών κριτηρίων επιδόσεων. Για τα εργαστήρια ρουτίνας αυτά τα τρέχοντα όρια απόδοσης είναι: CV: 10% και bias: 5%. Για τα εργαστήρια αναφοράς οι στόχοι είναι πιο αυστηροί: CV: 5% και bias: 1,7% [125].

8.1.1.1.1 Ρόλος των κατασκευαστών μεθόδων στην τυποποίηση

Τα περισσότερα εργαστήρια κλινικά και ερευνητικά μετρούν ολική 25(OH)D χρησιμοποιώντας δο-

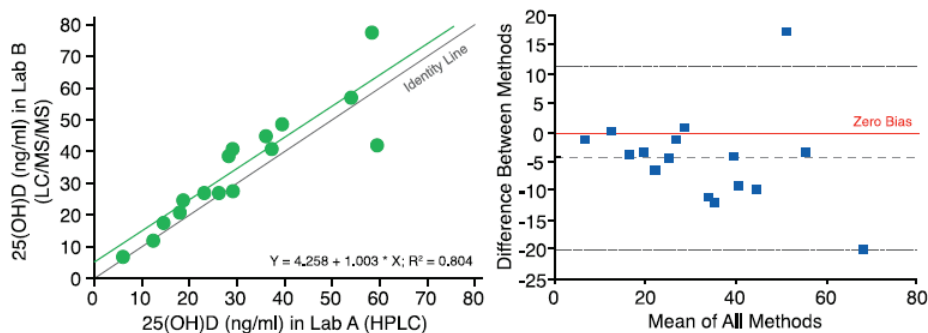
κιμασίες που έχουν αναπτυχθεί εμπορικά. Τα εργαστήρια που χρησιμοποιούν τις εμπορικές δοκιμασίες πρέπει να τις εκτελέσουν με αυστηρότητα, όπως συνιστάται από τον κατασκευαστή, αλλά κατά τα άλλα έχουν πολύ περιορισμένο έλεγχο σχετικά με το πώς αυτές οι αναλύσεις λειτουργούν σε σύγκριση με SRM. Ως εκ τούτου, οι εμπορικές ανεπτυγμένες δοκιμασίες διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο σε ολόκληρη την προσπάθεια τυποποίησης. Όλοι οι κατασκευαστές ενθαρρύνονται να συνεργαστούν με την VDSP για την τυποποίηση των δοκιμασιών τους, πολλοί είναι αυτοί που λειτουργούν αυτή τη στιγμή έτσι. Ειδικότερα, ένας αριθμός εμπορικών κατασκευαστών χρησιμοποιούν τα NIST SRMs και συμμετέχουν στο πρόγραμμα τυποποίησης πιστοποίησης του CDC, προκειμένου να δημιουργήσουν ή να πιστοποιήσουν ότι οι προσδιορισμοί τους, τόσο αυτοί που υπάρχουν σήμερα όσο και εκείνοι που είναι υπό ανάπτυξη, είναι τυποποιημένοι. Ωστόσο, και εκείνοι που δεν συμμετέχουν πρέπει να το πράξουν. Επιπλέον, πολλά μεγάλα εμπορικά κλινικά εργαστήρια χρησιμοποιούν επίσης NIST SRMs και συμμετέχουν στο CDC πρόγραμμα. Επειδή η πιστοποίηση διαρκεί μόνο για 1 έτος, η διατήρηση της πιστοποίησης απαιτεί συνεχή συμμετοχή.

8.1.1.1.2 Ρόλος των κλινικών και ερευνητικών εργαστηρίων στην τυποποίηση

Το πρόγραμμα CDC, όπως προαναφέρθηκε, είναι δαπανηρό και δεν είναι μια πρακτική λύση για τα κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια ρουτίνας. Για τα εν λόγω εργαστήρια, προγράμματα με βάση PT ή EQA σχήματα είναι διαθέσιμα. Για παράδειγμα, τα προγράμματα PT που προσφέρονται από το Κολλέγιο Αμερικανών Παθολόγων (CAP) και το (DEQAS) υπάρχουν, και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για την τυποποίηση μικρών κλινικών και ερευνητικών εργαστηρίων. Επιπροσθέτως, περιοδική χρήση των NIST SRMs μπορεί να βοηθήσει στην επαλήθευση της απόδοσης της δοκιμασίας. Στο μέλλον, η VDSP θα δημοσιεύσει μια αναλυτική δήλωση για πώς θα πρέπει να χρησιμοποιούνται τα κριτήρια απόδοσης. Ένα επιπλέον πρόγραμμα για τα ερευνητικά και κλινικά εργαστήρια είναι το πρόγραμμα διασφάλισης ποιότητας NIST-NIH (VitDQAP). Το πρόγραμμα διεξάγεται δύο φορές το χρόνο και είναι δωρεάν σε όλους όσους επιθυμούν να το χρησιμοποιήσουν. Σχεδιάστηκε έτσι ώστε οι χημικοί του NIST να μπορούν να παρέχουν τεχνική υποστήριξη για να βοηθήσουν τα εργαστήρια να ανακαλύψουν και να επιλύσουν προβλήματα με τη δοκιμασία τους. Δεν είναι ένα πρόγραμμα ελέγχου επιδόσεων και έτσι δεν υπάρχει αξιολόγηση επιτυχίας/αποτυχίας [124].

8.1.1.1.3 Ποιο είναι το μέλλον της τυποποίησης βιταμίνης D

Στο μέλλον, μπορεί να υπάρξουν αλλαγές σχετικά με το ποιο μεταβολίτες της βιταμίνης D θα θεωρούνται βιολογικά σημαντικοί και ποιοι από αυτούς



Εικ. 20. Διακυμάνσεις μεταξύ εργαστηρίων [125].

θα συνιστώνται για την αξιολόγηση της κατάστασης της βιταμίνης D. Πιθανοί υποψήφιοι μεταβολίτες θα μπορούσε να είναι το 3-επιμερές της 25(OH)D₃, η 24,25(OH)₂D₃, χοληκαλιφερόλη και εργοκαλιφερόλη, η ελεύθερη-βιοδιαθέσιμη 25(OH)D (η εκτίμηση της οποίας απαιτεί μέτρηση της VDBP), ή κάτι που προς το παρόν δεν εξετάζεται. Κατ' ανάγκη, το VDSP θα πρέπει να εξελιχθεί καλά. Για παράδειγμα, με δεδομένη την ανησυχία σχετικά με τη μέτρηση VDBP, ένα RMP είναι απαραίτητο για την ακριβή εκτίμηση των ελεύθερων-βιοδιαθέσιμων 25(OH)D. Ομοίως, είναι εύλογο/πιθανό ότι μπορεί να προκύψει η ανάγκη για την ανάπτυξη μεθόδων αναφοράς για ελεύθερη-βιοδιαθέσιμη 25(OH)D. Επί του παρόντος, η VDSP, με επικεφαλής τον ODS και NIST, ασχολείται με ένα εκτεταμένο ερευνητικό πρόγραμμα για τη βελτίωση της εργαστηριακής μέτρησης όχι μόνο της ολικής 25(OH)D αλλά και άλλων βασικών μεταβολιτών βιταμίνης D. Ο NIST ηγείται της προσπάθειας για τη διεξαγωγή μιας διευρυμένης μελέτης μετατρέψιμότητας, η οποία έχει προγραμματιστεί να ξεκινήσει το 2015. Επιπλέον, σε απάντηση στα αιτήματα, ο NIST σε συνεργασία με τον ODS αναπτύσσει ένα υψηλότερης συγκέντρωσης 25(OH)D SRM και ένα νέο, ταχύτερο RMP για να αντιμετωπίσει την ολοένα αυξανόμενη ζήτηση για την προετοιμασία υλικών με τις πραγματικές τιμές που τους έχει ανατεθεί. Αυτή η νέα μέθοδος αναφοράς θα περιλαμβάνει συγκεντρώσεις όχι μόνο για 25(OH)D₃, και 25(OH)D₂, αλλά επίσης για πρώτη φορά, οι συγκεντρώσεις για τους βασικούς μεταβολίτες της D, συμπεριλαμβανομένων των 24,25(OH)₂D και 3-επιμερή των 25(OH)D₃ και 25(OH)D₂. Στο NIST, υπάρχει επί του παρόντος μια προσπάθεια για την ανάπτυξη ενός RMP για VDBP. NIST και οι ODS εξετάζουν επίσης την αξιολόγηση της σκοπιμότητας της ανάπτυξης RMP υλικών για κηλίδες αίματος και ανάπτυξη μεθόδων αναφοράς και SRMs για τη μέτρηση 25(OH)D στα τρόφιμα. Επιπλέον, η VDSP χρηματοδοτεί την έρευνα για αξιολογηθεί η βιολογική σημασία των δύο 3-επιμερών 25(OH)D. Τέλος, η VDSP επιδίδεται σε μια λεπτομερή αξιολόγηση σύμφωνα με τις τρέχουσες κατευθυ-

ντήριες γραμμές για τις επιδόσεις δηλαδή, CV<10% και Bias<5%. Ο στόχος είναι να αξιολογηθεί η επίδραση της στη λήψη κλινικών αποφάσεων [122].

8.1.1.1.4 Μέτρα που πρέπει να γίνουν τώρα για την τυποποίηση

Η τυποποίηση και η πιστοποίηση των υφιστάμενων εμπορικών και των in-house προσδιορισμών δεν θα συμβεί εν μία νυκτί, ούτε θα είναι κάθε εργαστήριο σε θέση να τηρήσει τα όρια απόδοσης του VDSP αύριο. Αυτή η προσπάθεια θα πάρει χρόνο. Ωστόσο, μέτρα μπορούν να ληφθούν τώρα προς επίτευξη αυτού του στόχου. Κάθε κατασκευαστής εμπορικής δοκιμασίας και κάθε μεγάλο κλινικό εργαστήριο θα πρέπει να συμμετάσχει στο CDC Standardization πρόγραμμα πιστοποίησης. Όλοι οι κατασκευαστές εμπορικών δοκιμασιών και τα μεγάλα εμπορικά εργαστήρια πρέπει να εγγράψουν τις υπάρχουσες πλατφόρμες δοκιμασίας, και τις δικές τους in-house μεθόδους αναφοράς σε αυτό το εξαιρετικό πρόγραμμα.

Για τα κλινικά εργαστήρια ρουτίνας, η επόμενη ερώτηση αφορά το ποια είναι τα CV και bias του εργαστηρίου; Αρκούν τα 10% και το 5% των στόχων, αντίστοιχα; Αν όχι, πρέπει να ληφθούν μέτρα για την βελτίωση των επιδόσεων του εργαστηρίου. Συμμετέχει το εργαστήριο στο CAP και τα προγράμματα DEQAS PT/EQA; Αν όχι, να πρέπει να συμμετάσχει σε ένα ή και τα δύο. Χρησιμοποιεί NIST SRM 972a ως «ελέγχους πιστότητας» και στην περίπτωση των in-house μεθόδων, SRM 2972 για τη βαθμονόμηση της δοκιμασίας; Σημαντική πρόοδος έχει σημειωθεί για την τυποποίηση της μέτρησης ολικής 25(OH)D. Πολλοί κατασκευαστές και μεγάλα εμπορικά εργαστήρια που συμμετέχουν στο πρόγραμμα CDC. Πολλά κλινικά και ερευνητικά εργαστήρια συμμετέχουν στα προγράμματα PT/EQA και DEQAS. Τα στοιχεία από τα προγράμματα των CAP και DEQAS μπορεί να προσφέρουν βασικές πληροφορίες σχετικά με τις επιδόσεις των συμμετεχόντων δοκιμασιών και διάγραμμα προόδου με την πάροδο του χρόνου στην τυποποίηση 25(OH)D. Αντιλαμβανόμαστε όλοι ότι η μεγάλη διακύμανση της δοκιμασίας παραμένει ένα

κρίσιμο εμπόδιο για την τυποποίηση [122]. Υπάρχει ένας αριθμός από σημαντικούς περιορισμούς των ημεμερινών μεθόδων για τη μέτρηση 25(OH)D [56].

Μια δημοσίευση των Binkley et al. επέστησε για πρώτη φορά την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας για την μεγάλη μεταβλητότητα στα αποτελέσματα 25(OH)D, τόσο μεταξύ μεθόδων όσο και μεταξύ εργαστηρίων [125]. Συνέκριναν τις τιμές που αναφέρθηκαν για δείγματα από υγιή άτομα που αποστέλλονται σε έξι εργαστήρια χρησιμοποιώντας διαφορετικές μεθοδολογίες και βρήκαν διπλάσια διαφορά στις μέσες τιμές που αναφέρθηκαν 42,8 με 89 nmol/L (17,1 έως 35,6 ng/mL). Για τα μισά δείγματα, το κατά πόσο το άτομο θα θεωρηθεί ότι έχει ανεπαρκή ή φυσιολογική βιταμίνη D εξαρτάται αποκλειστικά από το εργαστήριο που χρησιμοποιείται. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι, για να είναι η ιατρική κοινότητα σε θέση να σημειώσει πρόοδο στη διόρθωση της διαδεδομένης υποβιταμίνωσης D, η μέτρηση της 25(OH)D πρέπει να τυποποιηθεί (βλέπε Εικόνα 20).

Επί του παρόντος, υπάρχουν μια σειρά από διαδικασίες που χρησιμοποιούνται για την προετοιμασία και την αξιολόγηση της ακρίβειας των προτύπων 25(OH)D. Πρότυπα διαλύματα έχουν βαθμονομηθεί είτε με σταθμική ανάλυση ή με φασματομετρία UV. Οι μεταβολίτες της βιταμίνης D έχουν ένα σαφώς καθορισμένο φάσμα απορρόφησης με μέγιστη απορρόφηση στα 265 nm και ελάχιστο στα 228 nm. Υπάρχει, ωστόσο, κάποια αβεβαιότητα πάνω από το συντελεστή μοριακής απορρόφησης που χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης 25(OH)D η οποία θα μπορούσε να οδηγήσει σε μικρές διαφορές στην υπολογιζόμενη συγκέντρωση. Ένας αριθμός από HPLC και LC-MS/MS διαδικασίες χρησιμοποιούν ένα εμπορικό πρότυπο σε ανθρώπινο ορό (Chromsystems, Μόνχεν, Γερμανία), αλλά δεν υπάρχουν διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με πώς οι τιμές έχουν αποδοθεί σε αυτά τα πρότυπα.

8.1.1.2 Τα πρότυπα υλικά αναφοράς

Δύο μελέτες έχουν σαφώς δείξει ότι η ακρίβεια μεταξύ των εργαστηρίων για LC-MS/MS δοκιμασίες μπορεί να βελτιωθεί με τη χρήση ενός κοινού βαθμονομητή [126]. Σε μια πρόσφατη έκδοση εξήχθη το συμπέρασμα ότι ήταν πρωταρχικής σημασίας ένα διεθνώς συμφωνημένο πρότυπο υλικό τόσο για 25(OH)D₂ και 25(OH)D₃ το οποίο απαιτείται για να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε όλο τον κόσμο για να βελτιωθεί όχι μόνο η LC-MS/MS συνοχή αλλά και η συγκρισιμότητα της ανοσολογικής δοκιμής [127]. Για το σκοπό αυτό, το National Institute of Standards and Technology, σε συνεργασία με το National Institute of Health Office of Dietary Supplements (NIH/ODS), και τα Centers for Disease Control and Prevention έχουν αναπτύξει ένα υλικό αναφοράς που βασίζεται στον ορό (SRM) για 25(OH)D₂ και 25(OH)D₃. Αυτό το υλικό (SRM 972) έχει πρόσφατα διατεθεί και αποτελείται από τέσσερα πρότυπα (βλέπε Εικόνα 21).

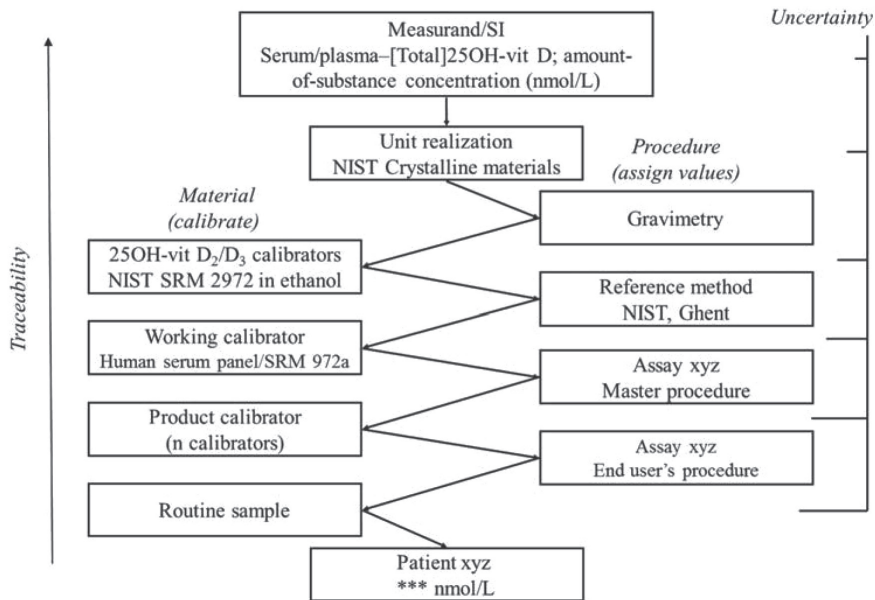


Εικ. 21. Τα υλικά αναφοράς SRMs [124].

Το επίπεδο 1 του SRM 972 παρασκευάστηκε από «κανονικό» ανθρώπινο ορό και δεν έχει μεταβληθεί. Το επίπεδο 2 παρασκευάστηκε αραιώνοντας επίπεδο 1 με ορό αλόγου για να επιτευχθεί μια χαμηλότερη συγκέντρωση 25(OH)D. Το επίπεδο 3 περιέχει «κανονικό» ανθρώπινο ορό που έχει εμπλουτιστεί με 25(OH)D₂, και το επίπεδο 4 περιέχει «κανονικό» ανθρώπινο ορό που έχει εμπλουτιστεί με 3-επι-25(OH)D₃ [124]. Παρόλο που η ελπίδα ήταν ότι τα πρότυπα αυτά θα μπορούσαν να βελτιώσουν τη συγκρισιμότητα μεταξύ δοκιμασιών οι αρχικές ενδείξεις είναι απογοητευτικές για τα SRM 972 pools 2 and 3. Η συγκρισιμότητα ήταν καλύτερη μόνο στο επίπεδο 1. Είναι ασαφές γιατί ενδογενείς και εξωγενείς δεξαμενές (pools) διαφέρουν από την άποψη αυτή, αν και το matrix του δείγματος μπορεί να είναι ένας παράγοντας. Η συνέπεια αυτών των ευρημάτων είναι ότι μόνο το SRM 972 επίπεδο 1 θα πρέπει να χρησιμοποιείται για την τυποποίηση σε ανοσο-δοκιμασίες [128].

8.1.1.3 Η διαδικασία για την τυποποίηση των μετρήσεων 25(OH)D

Στην πράξη, η διαδικασία τυποποίησης μπορεί να διαρθρώνεται σε τρία βασικά βήματα. Στο πρώτο βήμα καθιερώνεται η λεγόμενη βάση αναφοράς ή σύστημα μέτρησης αναφοράς. Επίσης, καθορίζονται η μέτρηση και οι μονάδες για την έκφραση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων και δημιουργούνται τα διάφορα ιεραρχικά επίπεδα υλικών και διαδικασιών μέτρησης που χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση. Στο δεύτερο βήμα, οι δοκιμασίες βαθμονομούνται χρησιμοποιώντας την καθιερωμένη ιεραρχία βαθμονόμησης. Σε αυτή την (από πάνω προς τα κάτω) διαδικασία ένα υλικό χρησιμοποιείται για τη βαθμονόμηση της διαδικασίας μέτρησης στο ίδιο επίπεδο, η τελευταία χρησιμοποιείται στη συνέχεια για να ορίσει μια τιμή για το υλικό στο πιο κάτω επίπεδο. Αυτή η διαδικασία βαθμονόμησης περιγράφεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια σε μια ολοκληρωμένη επανεξέταση. Ως αποτέλεσμα οι μετρήσεις της ιεραρχικά κατώτερης τάξης γίνονται ανιχνεύσιμες στη μονάδα



Εικ. 22. Περιγραφή του συστήματος μέτρησης αναφοράς για 25(OH)D σε ορό ή πλάσμα. (Τροποποιημένη από Sempos, 2014 [122]).

στην κορυφή και την υλοποίησή της στον πρωτογενή βαθμονομητή εντός των προβλεπόμενων περιορισμών αβεβαιότητας (βλέπε Εικόνα 22).

8.1.1.4 Η εναρμόνιση των μονάδων μέτρησης

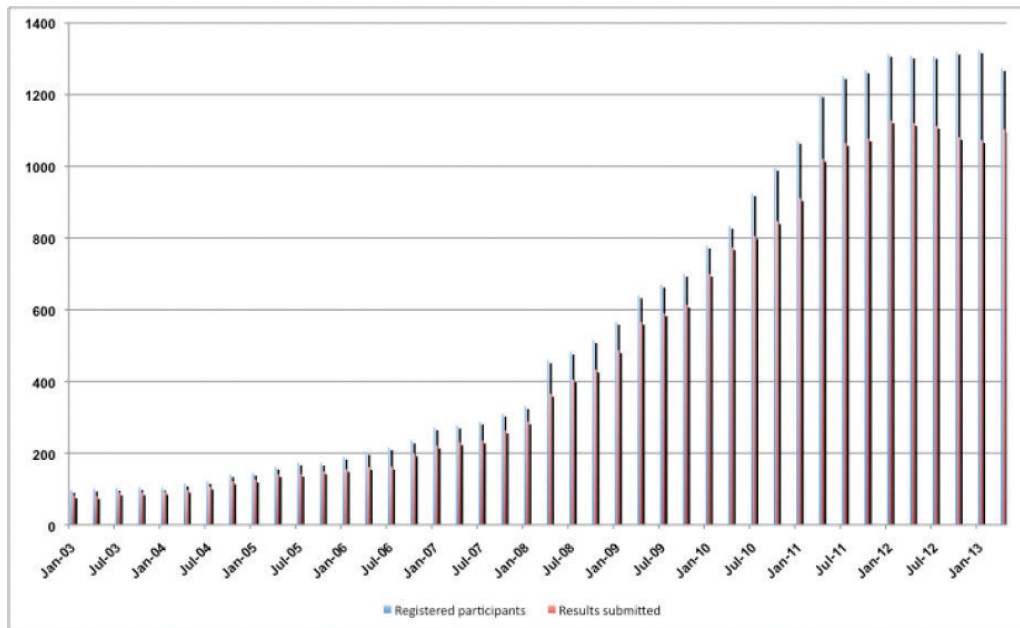
Η συγκέντρωση ολικής 25(OH)D συνήθως αναφέρεται στις Ηνωμένες Πολιτείες σε μονάδες νανογραμμάρια ανά χιλιοστόλιτρο (ng/mL) και αλλού σε μονάδες νανογραμμομόρια ανά λίτρο (nmol/L). Τα ng/ml μπορεί να μετατραπούν σε nmol/L χρησιμοποιώντας τον τύπο: $\text{ng/mL} = 2.5 \text{ nmol/L}$ (και αντίστροφα ισχύει: $\text{nmol/L} \times 0,40 = \text{ng/mL}$). Τα μοριακά βάρη της 25(OH)D₃ και της 25(OH)D₂ είναι 400,6 και 412,6 Da, αντίστοιχα. Η αναφορά της ακριβούς συγέντρωσης της ολικής 25(OH)D κατά τη μέτρηση του καθενός ξεχωριστά μπορεί να επιτευχθεί μόνο με την προσθήκη των τιμών σε μοριακές μονάδες, δηλαδή σε nmol/L (μονάδες συστήματος SI). Η αναφορά σε μονάδες μάζας (ng/mL) προσθέτει ένα σφάλμα της τάξεως του 3% [129].

8.2 Σχήματα εξωτερικής αξιολόγησης της ποιότητας (δοκιμασία επάρκειας)

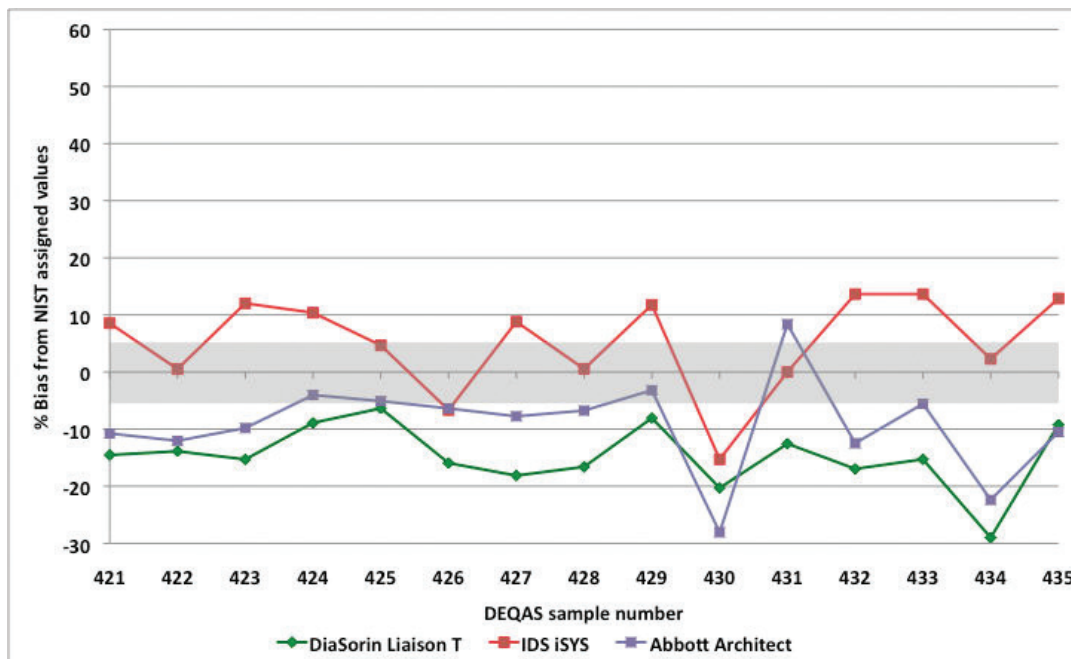
Είναι γενικά παραδεκτό ότι η συμμετοχή των κλινικών εργαστηρίων σε προγράμματα εξωτερικής αξιολόγησης της ποιότητας (EQAs) έχει διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση της απόδοσής τους. Ο DEQAS είναι η μόνη διεθνής εταιρεία που ειδικεύεται EQAs. Επίσης, διοργανώνει ένα πρόγραμμα για την 1,25(OH)₂D. Διοικείται από το Ηνωμένο Βασίλειο, και ξεκίνησε το 1989 μετά από μια διεθνή και εθνική έρευνα αποκάλυψε σοβαρές ελλείψεις σε αναλύσεις 25(OH)D [131]. Εν συντομία, 5 δείγματα ανθρώπινου ορού διανέμονται ανά τρίμη-

νο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και οι συμμετέχοντες έχουν περίπου 5 εβδομάδες για να επιστρέψουν τα αποτελέσματά τους. Αυτά τα αποτελέσματα συγκρίνονται με την “θεωρητικά πραγματική τιμή” All-Laboratory Trimmed Mean (ALTM) και γίνεται μια «ισχυρή εκτίμηση» της τυπικής απόκλισης (SD). Σε ένα μικρό αριθμό των δειγμάτων που αναλύθηκαν το 1994, η ALTM φάνηκε να είναι ένα καλό υποκατάστατο για το «αληθές» αποτέλεσμα δοσμένο με μια μέθοδο αναφοράς GC-MS. Ωστόσο, πολλά άλλα εργαστήρια έχουν ήδη ενταχθεί και το σύστημα κυριαρχείται πλέον από την DiaSorin Liaison Total (πάνω από το ένα τρίτο των αποτελεσμάτων που υποβλήθηκαν τον Ιανουάριο του 2010 ήταν από τη μέθοδο αυτή), η οποία είναι πιθανόν να στρεβλώσει τις στατιστικές. Το DEQAS προτίθεται να επαναφέρει μια μέθοδο GC-MS, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για να ελέγξει το κατά πόσον η ALTM παραμένει έγκυρος στόχος. Η ακρίβεια του κάθε αποτελέσματος αξιολογείται από τον υπολογισμό ποσοστού του bias από την ALTM και η σχετική ακρίβεια της κάθε μεθόδου υπολογίζεται από το ποσοστό bias του μέσου όρου (MM) από το ALTM. Έτσι, το DEQAS παρέχει τη συνεχή αξιολόγηση των μεθόδων για τη μέτρηση της 25(OH)D [50].

Η μέση απόκλιση% (Bias) από την τιμή-στόχο για τις ανοσολογικές γενικά έχει βελτιωθεί σημαντικά με την πάροδο των ετών, από περίπου 35% έως 20%, αλλά ακόμα τα αποτελέσματα της 25(OH)D θα πρέπει να ερμηνεύονται πάντα σε συνδυασμό με άλλα εργαστηριακά αποτελέσματα (κυρίως συγκέντρωση του ιονισμένου ασβεστίου, απέκκριση του ασβεστίου, συγκέντρωση των φωσφορικών αλάτων και PTH) και την κλινική εικόνα του ασθενούς [38].



Εικ. 23. Οι συμμετέχοντες στο DEQAs (2003-2013) [130].

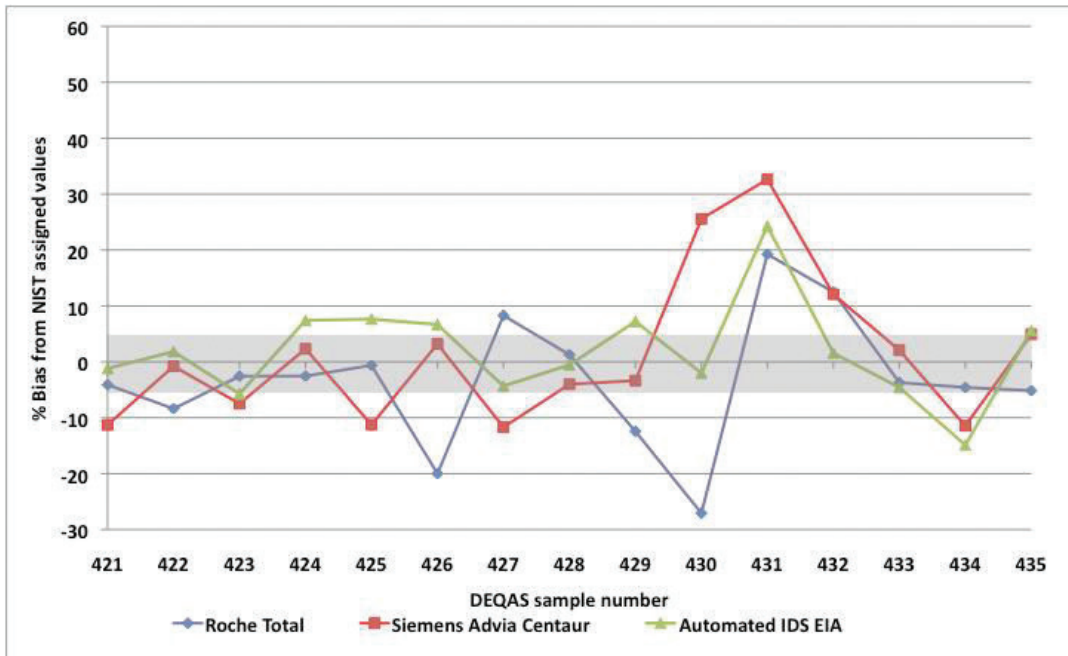


Εικ. 24. Ακρίβεια των μεθόδων 25(OH)D (1) [130].

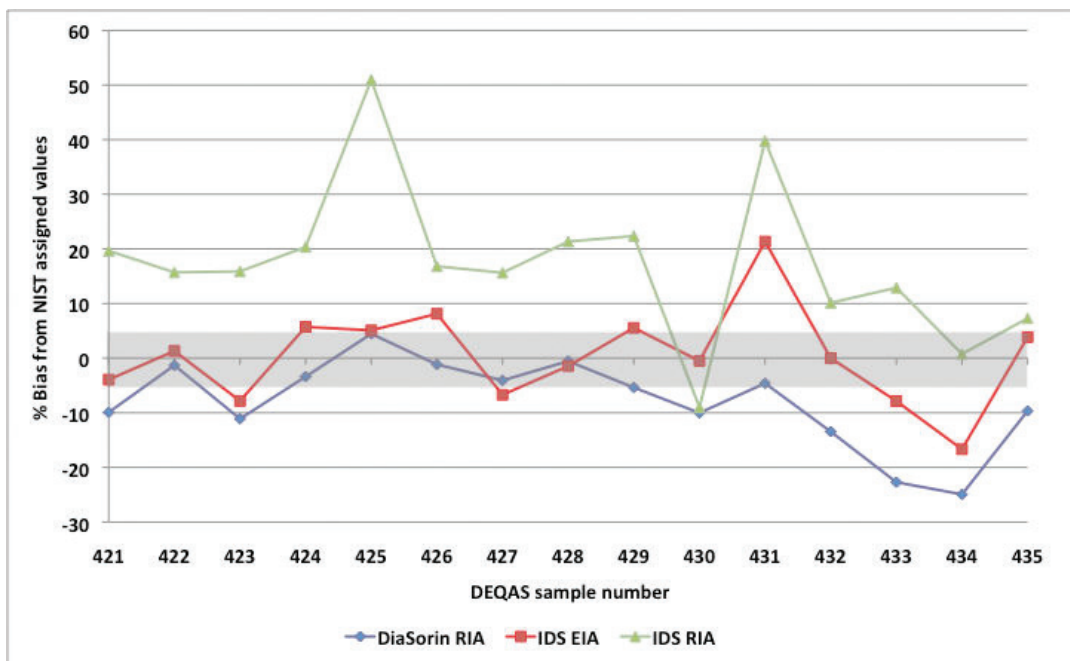
8.2.1 Περισσότερο από ένα απλό πρόγραμμα δοκιμής καταλληλότητας

Η έννοια της ακρίβειας στο εργαστήριο κλινικής χημείας είναι δύσκολη. Στην πραγματικότητα, είναι αδύνατο να γνωρίζουμε αν κάθε επιμέρους αποτέλεσμα 25(OH)D έχει την πραγματική τιμή. Οι ισχυρισμοί ότι ο ένας ή ο άλλος τρόπος είναι ακριβής ή δι-

νει ακριβή αποτελέσματα έχει να κάνει περισσότερο με τις προσωπικές πεποιθήσεις ή διαφημιστική εκστρατεία μάρκετινγκ παρά με την επιστημονική αντικειμενικότητα. Συστήματα ελέγχου της επάρκειας, όπως το DEQAS μπορεί να προσφέρουν μια χρήσιμη εικόνα για τη συγκρισιμότητα των μεθόδων, αλλά η τελική δοκιμή της ακρίβειας μιας μεθόδου είναι



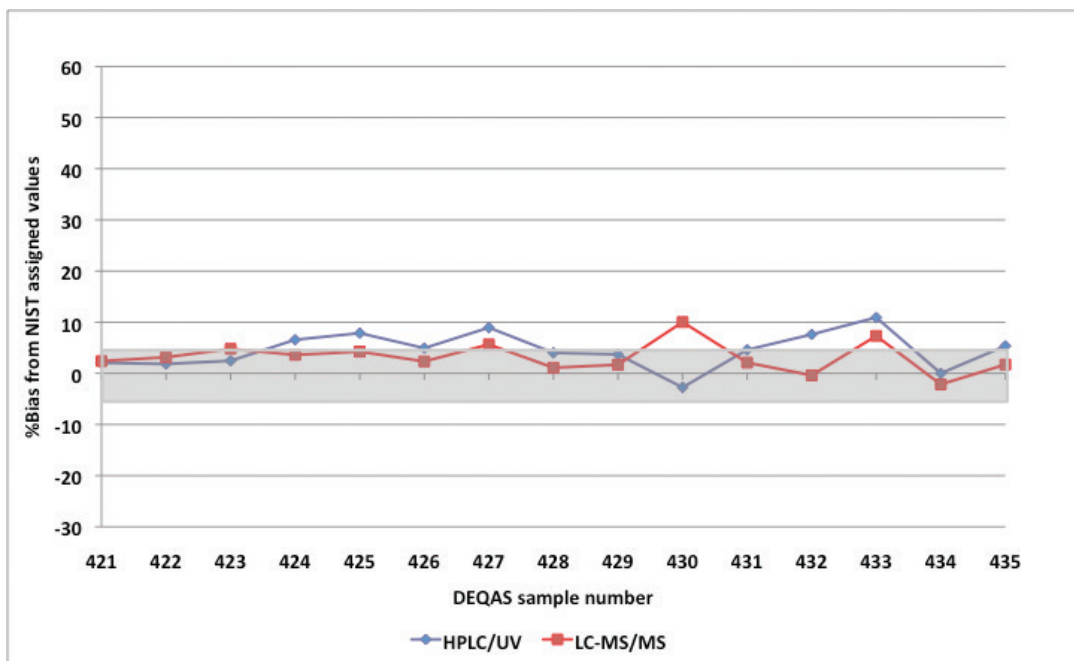
Εικ. 25. Ακρίβεια των μεθόδων 25(OH)D (2) [130].



Εικ. 26. Ακρίβεια των μεθόδων 25(OH)D (3) [130].

το πόσο καλά αποτελέσματα δίνει σε σύγκριση με εκείνα που προκύπτουν από τη λεγόμενη Reference Measurement Procedure (RMP) μια μέθοδο που έχει αναπτυχθεί με τα υψηλότερα πρότυπα ανάλυσης που η τρέχουσα γνώση επιτρέπει. Παρά τα δημοσιευμένα προβλήματα η LC-MS/MS είναι ίσως η πιο σημαντική πρόοδος στη μεθοδολογία 25(OH)D [50].

Ένας σημαντικός ρόλος του DEQAS είναι η διερεύνηση συγκεκριμένων πτυχών των μεθόδων 25(OH)D και 1,25(OH)₂D. Αυτές συμπεριλαμβάνουν την γραμμικότητα, την ειδικότητα και την επίδραση των αντιπηκτικών. Μια πρόσφατη έρευνα εξέτασε την ειδικότητα των μεθόδων σε σχέση με 3-επι-25(OH)D₃. Επειδή το DEQAS έχει πάνω από 1.200 συμμετέ-



Εικ. 27. Ακρίβεια των μεθόδων 25(OH)D (4) [130].

χοντες με τις περισσότερες, αν όχι όλες, τις κύριες μεθόδους να αντιπροσωπεύονται, οι στατιστικές είναι πολύ ισχυρές και πολύ πιο αντιπροσωπευτικές από μελέτες που έχουν γίνει σε ένα μόνο εργαστήριο ή μεταξύ των μικρών ομάδων συνεργατών. Μια άλλη σημαντική υπηρεσία είναι η παροχή των πρόσθετων δειγμάτων προς τους συμμετέχοντες και τους κατασκευαστές που επιθυμούν να εισαγάγουν ή να αναπτύξουν νέες μεθόδους και να επιλύσουν προβλήματα με τις υπάρχουσες μεθόδους [130].

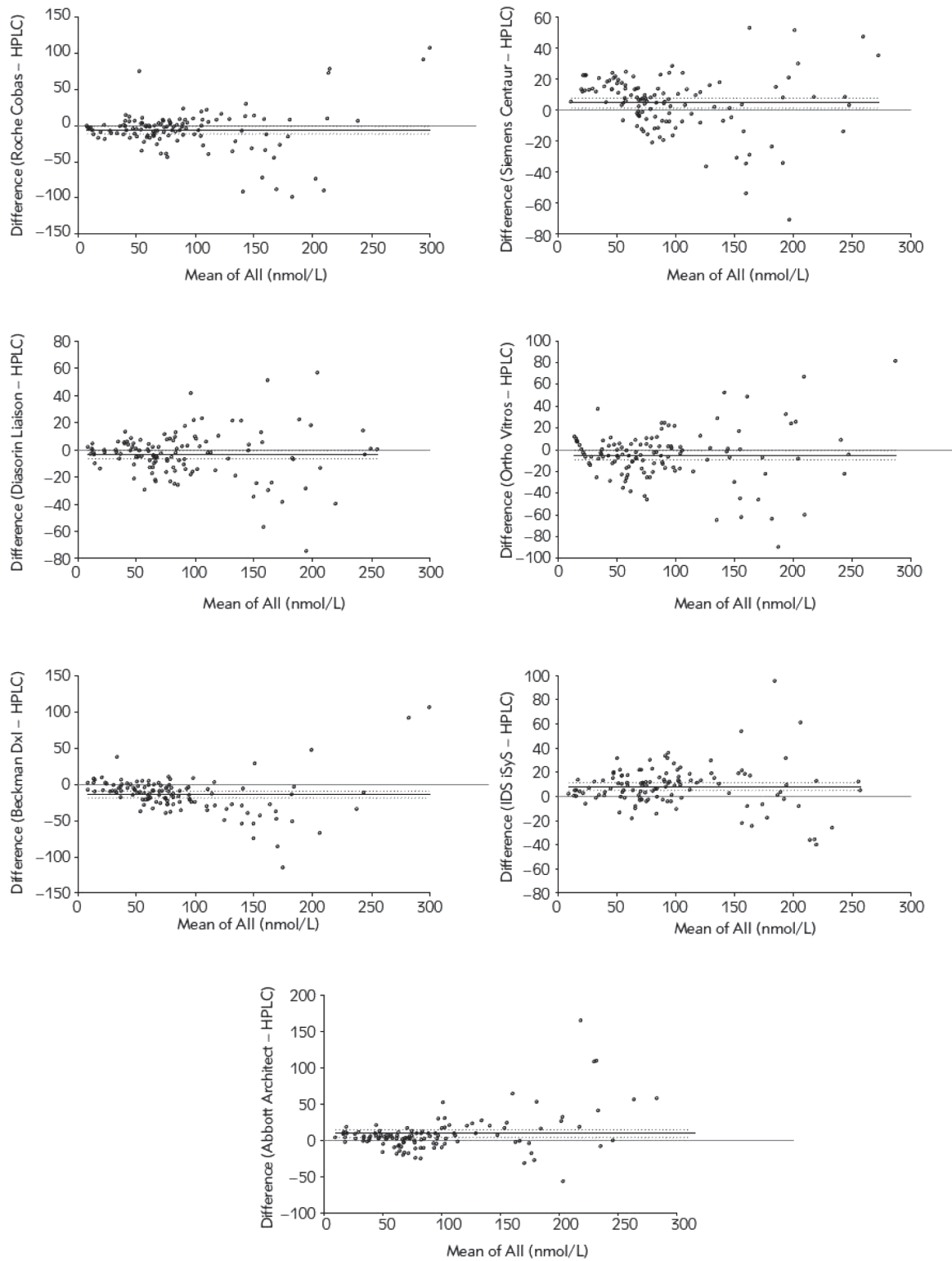
9. Συγκρισιμότητα μεθόδων

Δεδομένου του εύρους των διαθέσιμων μεθοδολογιών για τη μέτρηση της 25(OH)D η επιλογή της καλύτερης μεθόδου για ένα μεμονωμένο εργαστήριο, είναι πρόκληση ειδικά δεδομένης της δραματικής αύξησης, κατά τα τελευταία χρόνια, στην καθημερινή κλινική και ερευνητική χρήση του αριθμού των μετρήσεων. Είναι σαφές ότι υπάρχουν πλεονεκτήματα και περιορισμοί για κάθε μέθοδο.

Ορισμένοι σχολιαστές επισημαίνουν τα πλεονεκτήματα ανοσοποσοτικών προσδιορισμών που λειτουργούν με αυτοματοποιημένες πλατφόρμες από την άποψη της ευκολίας και της υψηλής απόδοσης, ειδικά για τα εργαστήρια που αναλύουν μεγάλο αριθμό δειγμάτων τακτικά. Ο Wootton κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η μέτρηση της 25(OH)D με ανοσοδοκιμασία θα παραμείνει η μέθοδος επιλογής για λόγους ευκολίας, ταχύτητας, ανάκαμψης και κόστους [131]. Οι Hollis και Horst πρότειναν ότι για τα εργαστήρια που χρειάζονται υψηλότερη απόδοση, μία από τις εμπορικά διαθέσιμες μεθόδους RIA,

ELISA ή αυτοματοποιημένη θα ήταν πιο κατάλληλη, παρόλο που επεσήμαναν επίσης ότι τα εμπορικά κιτ δίνουν περισσότερο μεταβλητά αποτελέσματα όταν χρησιμοποιούνται από άπειρους χρήστες [128]. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα αποτελέσματα που δίδονται με διάφορες μεθόδους δεν είναι συγκρίσιμα [125] αν και μια πρόσφατη έρευνα DEQAS δείχνει ότι οι περισσότερες κύριες μέθοδοι δίνουν αποτελέσματα εντός περίπου 10% της τιμής στόχου. Η προσοχή έχει επικεντρωθεί στο συνδυασμό της διαφοράς μεταξύ των αποτελεσμάτων από τις αναλύσεις της θετικά μεροληπτικής, LC-MS/MS και της αρνητικά μεροληπτικής DiaSorin ραδιοανοσολογικής στην οποία οι τιμές αναφοράς βασίζονται εν γένει. Δύο πιθανές λύσεις έχουν προταθεί [100], εκ των οποίων καμία δεν είναι απόλυτα ικανοποιητική: (1) μία αριθμητική διόρθωση θα πρέπει να γίνει στα αποτελέσματα LC-MS/MS, Δυστυχώς, το μέγεθος των θετικών αλλαγών bias αλλάζει σε σχέση με την συγκέντρωση, έτσι η χρήση ενός ενιαίου συντελεστή διόρθωσης για όλα τα αποτελέσματα θα ήταν ακατάλληλη και (2) τα δεδομένα αναφοράς που προέρχονται από την DiaSorin θα πρέπει να προσαρμοστούν προς τα πάνω. Αυτή η διόρθωση είναι δυνητικά πιο ικανοποιητική δεδομένου του ότι οι μέθοδοι φασματομετρίας μάζας ισοτόπων αραίωσης θεωρείται πως είναι εγγενώς πιο ακριβείς, αλλά, στην πράξη, δεν είναι εύκολο να εφαρμοστούν.

Τα εργαστήρια θα πρέπει να γνωρίζουν το bias της LC-MS/MS που εφαρμόζουν έναντι της δοκιμασίας DiaSorin πριν από την πραγματοποίηση της διόρθωσης. Δεδομένης της μεταβλητότητας των αποτελεσμάτων, ακόμα και μεταξύ των εργαστηρίων,

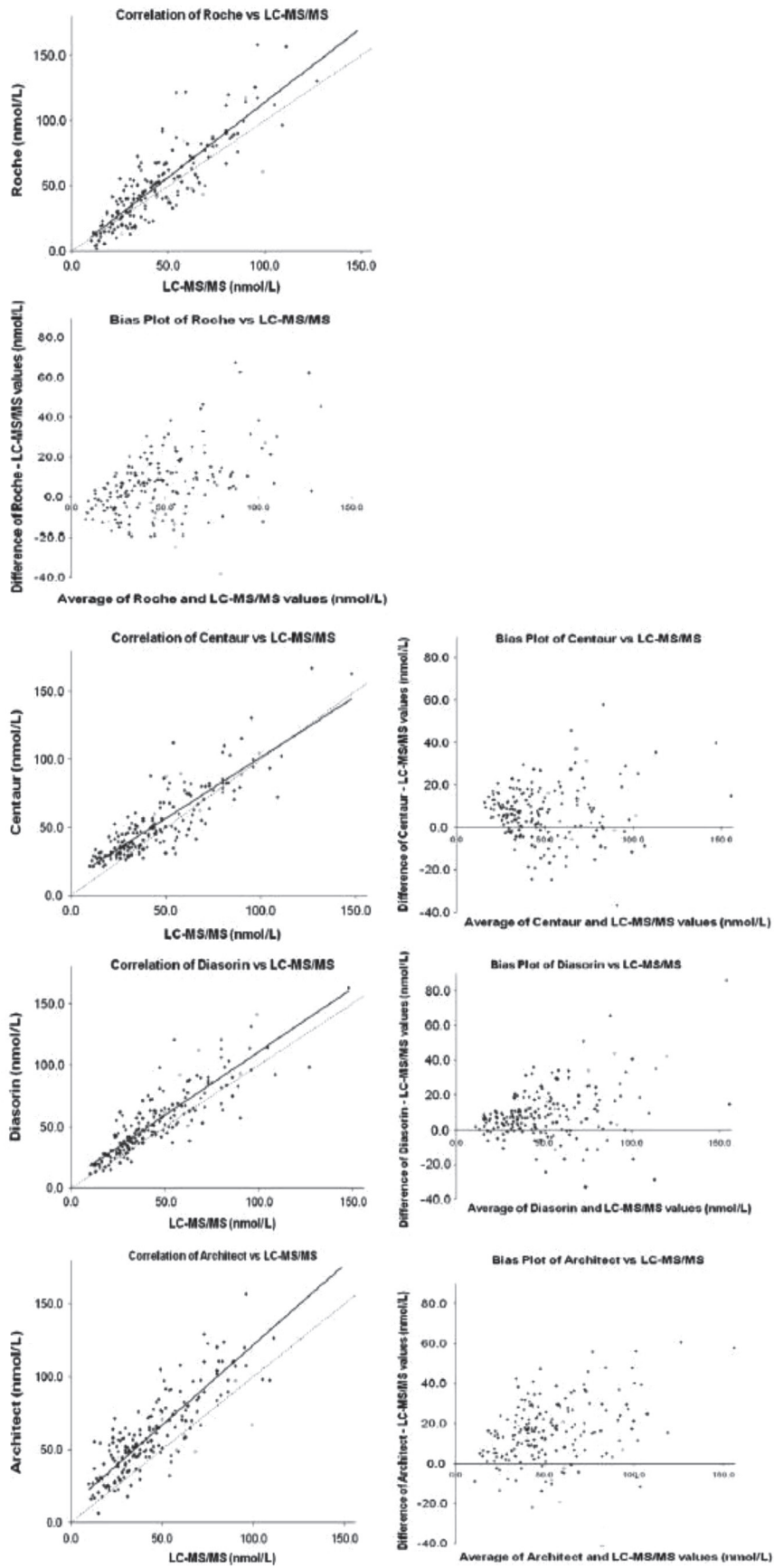


Εικ. 28. Σύγκριση 7 αυτοματοποιημένων μεθόδων. (Τροποποιημένη από Giuseppe, 2014 [132]).

με την ίδια μέθοδο, το ζήτημα του εύρους αναφοράς μπορεί να έχει υπερεκτιμηθεί. Μια προσαρμογή με βάση δημοσιευμένες συγκρίσεις μεθόδων (π.χ. DEQAS) θα μπορούσε πιθανότατα να είναι αρκετή, καθώς οι περισσότεροι κλινικοί γιατροί του νοσοκο-

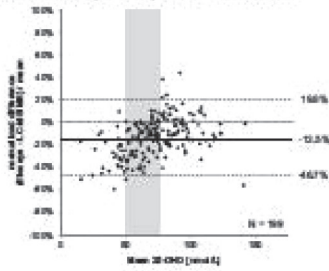
μείου απλά θα ήθελαν να μάθουν αν ο ασθενής τους χρειάζεται ένα συμπλήρωμα βιταμίνης D [50].

Στις Εικόνες 28, 29, 30 και 31, παρουσιάζονται σχετικά πρόσφατα αποτελέσματα πειραμάτων σύγκρισης διαφόρων κοινών εμπορικών δοκιμασιών.

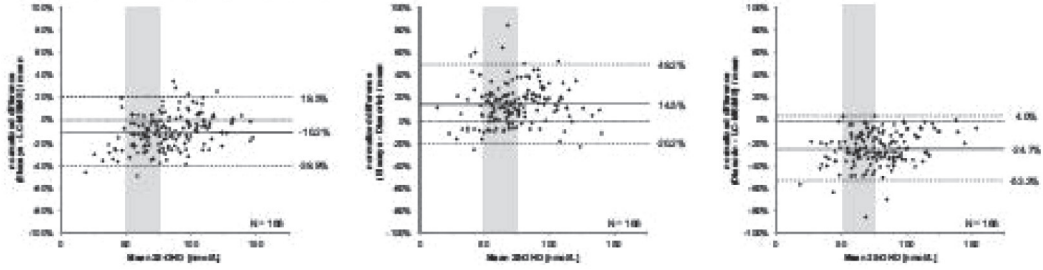


Εικ. 29. Σύγκριση μεθόδων με LC-MS/MS. (Τροποποιημένη από Sharon Saw, 2012 [133]).

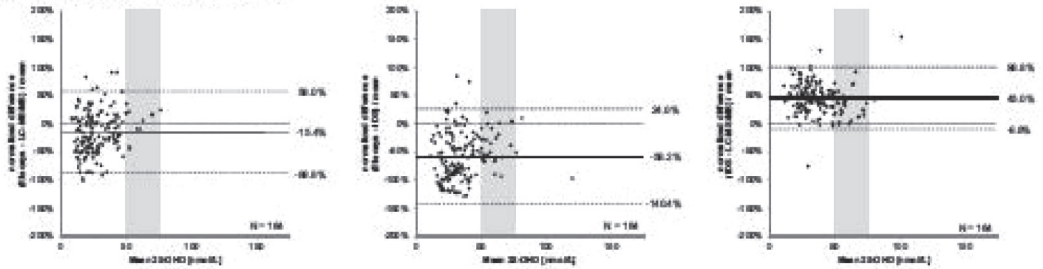
Laboratory: Clayton, Australia



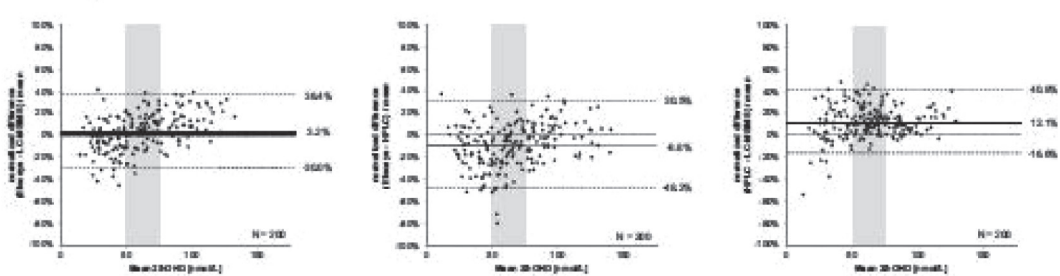
Laboratory: Wollongong, Australia



Laboratory: Munich, Germany

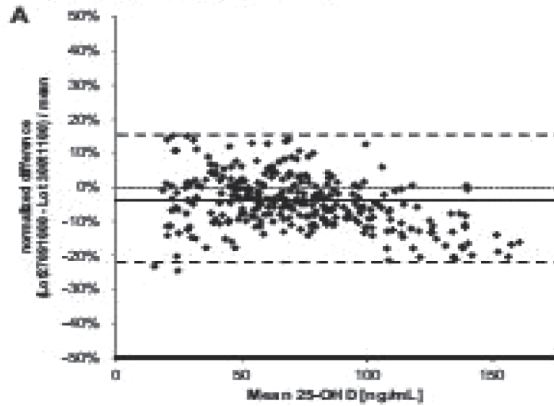


Laboratory: Amersfoort, The Netherlands

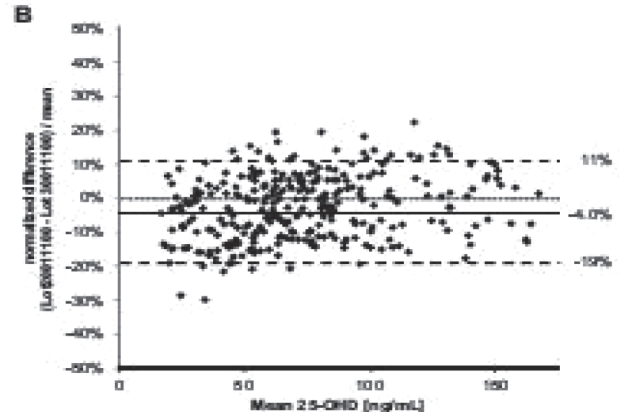


Εικ. 30. Σύγκριση μεταξύ εργαστηρίων [134].

Lot Z7091000 vs Lot 30011100



Lot 20011100 vs Lot 30011100



Εικ. 31. Η μεταξύ των παρτίδων επαναληψιμότητα [134].

10. Μετααναλυτικό στάδιο

10.1 Έκθεση των αποτελεσμάτων

Η έκθεση του εργαστηρίου θα πρέπει να είναι σαφής:

Η ονομασία της δοκιμής θα πρέπει να εκφράζει αυτό ακριβώς που μετράται. Στην περίπτωση της ECLIA: 25(OH)D₃ και στη RIA 25(OH)D. Στην περίπτωση των μεθόδων HPLC ή LC-MS/MS που μετρούν τα κλάσματα 25(OH)D₃ και 25(OH)D₂ ξεχωριστά θα πρέπει να αναφέρεται και η ολική 25(OH)D για να αποφευχθεί ενδεχόμενη παρερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται πρέπει να περιλαμβάνεται στην έκθεση, καθώς και το αναλυτικό σφάλμα του εργαστηρίου.

Η έννοια «επιθυμητά ή υγιή επίπεδα» και όχι «φυσιολογικά επίπεδα» θα πρέπει να είναι ενσωματωμένη στο απαντητικό, με προτεινόμενη την ακόλουθη κατάταξη, με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές:

- Λιγότερο από 10 ng/ml: Έλλειψη.
- Μεταξύ 10 και 29 ng/ml: Ανεπάρκεια.
- Μεγαλύτερη από 30 ng/ml: Επάρκεια / Βέλτιστη / Επιθυμητά επίπεδα.

Η ταξινόμηση αυτή σίγουρα θα πρέπει να τροποποιηθεί, όταν επιτευχθεί η τυποποίηση της μέτρησης βιταμίνης D.

Λόγω της ποικιλίας των μεθόδων που χρησιμοποιούνται σήμερα, αν και προφανές, προτείνεται η χρήση της ίδιας μεθοδολογίας για την παρακολούθηση του ασθενούς καθόλη τη θεραπεία [64].

10.2 Μετααναλυτική ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Τα περισσότερα εργαστήρια κλινικής χημείας δίνουν ευρος αναφοράς (φυσιολογικές τιμές) για να βοηθήσουν τους κλινικούς συναδέλφους τους να ερμηνεύσουν τα αποτελέσματα. Παραδοσιακά, τα πεδία τιμών αναφοράς προκύπτουν από τα αποτελέσματα που λαμβάνονται σε ένα δείγμα του ντόπιου πληθυσμού και είναι ειδικά για την αναλυτική μέθοδο και την γεωγραφική περιοχή. Όταν τα δεδομένα είναι κανονικά κατανομημένα, το εύρος αναφοράς συνήθως καθορίζεται από τη μέση τιμή ± 2 τυπικές αποκλίσεις και περιλαμβάνει περίπου 95% των αποτελεσμάτων. Για την 25(OH)D, η προσέγγιση αυτή δεν είναι ικανοποιητική, κυρίως επειδή η ανεπάρκεια βιταμίνης D είναι τόσο διαδεδομένη παγκοσμίως που μπορεί να περιγραφεί ως μια πανδημία. Έτσι, το εύρος αναφοράς που προκύπτει με τον παραδοσιακό τρόπο είναι σχεδόν βέβαιο ότι θα είναι πολύ χαμηλό και να οδηγήσει σε υποδιάγνωση της έλλειψης βιταμίνης D. Οι τρέχουσες κατευθυντήριες γραμμές για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων 25(OH)D βασίζονται σε μεγάλο βαθμό σε κλινικές και επιδημιολογικές μελέτες [50].

11. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Η ραδιοανοσοδοκιμασία αντιπροσώπευσε την πρώτη αξιόπιστη τεχνολογία για τη μέτρηση της ολικής 25(OH)D, μολονότι η ανοσοδοκιμασία ενζύμου και οι τεχνικές LC/MS σήμερα έχουν γίνει πιο συχνές. Η LC-MS/MS μπορεί εύκολα να διακρίνει 25(OH)D₂ αλλά και D₃ και τα κλινικά εργαστήρια που χρησιμοποιούν αυτή τη μέθοδο μπορούν μεμονωμένα να ποσοτικοποιήσουν και να αναφέρουν και τους δύο αναλύτες, εκτός από την παροχή της ολικής συγκέντρωσης 25(OH)D. Τα κλινικά πλεονεκτήματα της άμεσης απόκτησης «κλασματοποιημένων» μετρήσεων 25(OH)D₂ και D₃ περιλαμβάνουν την ικανότητα να εκτιμηθεί η ενδογενής παραγωγή της βιταμίνης D₃ αλλά και να εξακριβωθεί η συμμόρφωση στη θεραπεία με D₂. Για παράδειγμα, μια σοβαρή ανεπάρκεια βιταμίνης D₃ υποδεικνύει έλλειψη ενδογενούς παραγωγής ή/και διαιτητικής πρόσληψης. Εντούτοις, για τις περισσότερες κλινικές καταστάσεις, η συγκέντρωση ολικής 25(OH)D είναι επαρκής.

Η έκρηξη του ενδιαφέροντος για την παρακολούθηση των επιπέδων της βιταμίνης D έχει αποκαλύψει μια σειρά από προκλήσεις και διαμάχες που σχετίζονται με τις διάφορες μεθόδους για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων 25(OH)D ορού ή πλάσματος. Μία από τις κύριες προκλήσεις είναι η ανάγκη για μέτρηση D₂, η οποία είναι ιδιαίτερα κρίσιμη σε χώρες όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες που χρησιμοποιούν σε μεγάλο βαθμό τη βιταμίνη D₂ στα διαιτητικά συμπληρώματα. Οι περισσότεροι ανοσολογικές μεθόδους μετρούν την ολική 25(OH)D. Για αυτές τις μεθόδους, το αντίσωμα ή αντισώματα που χρησιμοποιούνται στην δοκιμασία ιδανικό θα ήταν να αντιδρούν εξίσου με 25(OH)D₂ και D₃ (και όχι με άλλες ενώσεις βιταμίνης D στον ορό ή το πλάσμα), και ως εκ τούτου να δίνουν μια ακριβή μέτρηση του συνόλου της 25(OH)D. Στην πράξη, αυτό είναι δύσκολο να επιτευχθεί, όπως αποκαλύπτεται από συγκρίσεις ανοσοδοκιμασιών και μετρήσεων που έχουν κατά καιρούς δημοσιευθεί. Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην μεταξύ μεθόδων μεταβλητότητα περιλαμβάνουν κυρίως την έλλειψη τυποποίησης των μεθόδων, αλλά και το ζήτημα του C-3 επιμερούς και τις διεργαστηριακές διαφορές των λειτουργικών διαδικασιών.

Η τυποποίηση των μετρήσεων 25(OH)D ενισχύθηκε από την ανάπτυξη του προτύπου υλικού αναφοράς από το National Institute of Standards and Technology (United States) και τις εν εξελίξει προσπάθειες για την τυποποίηση των ανοσολογικών δοκιμών και των LC/MS/MS μεθόδων. Ένα δύσκολο θέμα είναι η ανακάλυψη ότι ορισμένοι ασθενείς, κυρίως βρέφη (ηλικίας κάτω των 12 μηνών), έχουν υψηλές συγκεντρώσεις ενός ισομερούς 25(OH)D₃ με επιμερική μεταβολή στον άνθρακα-3 (C-3). Το επιμερές C-3 μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στις μετρήσεις σε βρέφη και επί του παρόντος μόνο ένας περιορισμένος αριθμός των εργαστηρίων αναφοράς έχουν επικυρωθεί με LC/MS/MS μεθόδους

για την αντιμετώπιση δειγμάτων βρεφών [115].

Το αυξανόμενο κλινικό ενδιαφέρον για τη βιταμίνη D έχει οδηγήσει σε δραματικές αυξήσεις των αναλύσεων. Κατά συνέπεια, οι εργαστηριακοί επιστήμονες βρίσκονται αντιμέτωποι με τη διπλή πρόκληση της αύξησης του όγκου των δοκιμών από τη μία και της «πλοήγησης» των κλινικών γιατρών στην πολυπλοκότητα των αναλύσεων της βιταμίνης D από την άλλη. Τέλος, η επίγνωση των περιορισμών των διαφόρων δοκιμασιών 25(OH)D είναι ιδιαίτερα σημαντική στη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων δοκιμασιών, ειδικά με την αναμενόμενη κυκλοφορία ομογενών ανοσοδοκιμών για 25(OH)D υψηλότερης απόδοσης για αυτοματοποιημένα όργανα στο εγγύς μέλλον.

Η επιλογή μιας κατάλληλης μεθόδου θα πρέπει να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της απόδοσης του δείγματος, την εμπειρία του προσωπικού και την προέλευση του δείγματος. Ένα εργαστήριο σε νοσοκομείο των ΗΠΑ, το οποίο λαμβάνει δείγματα από ασθενείς που λαμβάνουν συμπληρώματα, θα απαιτήσει μια δοκιμασία που ανιχνεύει την 25(OH)D₂. Η απαίτηση αυτή μπορεί να είναι λιγότερο σημαντική στην ηπειρωτική Ευρώπη, όπου τα συμπληρώματα είναι γενικά με τη βιταμίνη D₃. Παρ' όλα αυτά σύγχυση που μπορεί να προκύψει όταν ένας ασθενής που λαμβάνει D₂ παρακολουθείται με μέθοδο σχεδιασμένη για να μετρά μόνο 25(OH)D₃.

Τα περισσότερα εργαστήρια δεν λαμβάνουν πολλά νεογνικά δείγματα και η ανίχνευση του 3-επι-25-OHD δεν αποτελεί σοβαρό ζήτημα. Περιστασιακά νεογνικά δείγματα μπορεί να σταλούν σε ένα εξειδικευμένο κέντρο για ανάλυση. Εάν προσωπικό με τη σχετική εμπειρογνομosύνη είναι διαθέσιμο, εργαστήρια νοσοκομείων που χειρίζονται σχετικά μικρό αριθμό αιτήσεων 25(OH)D θα μπορούσε να έχουν HPLC ή LC-MS/MS, αλλά θα ήταν καλό να έχουν και μέσα ειδικά για τις 25(OH)D μετρήσεις. Η επιλογή του μέσου ή της μεθόδου θα πρέπει να βασίζεται αποκλειστικά και μόνο σε επιστημονικούς λόγους. Ένα από τα γνωστά προβλήματα στην αγορά είναι η πίεση για μείωση του κόστους με τη διενέργεια όσο το δυνατόν περισσότερων αναλύσεων σε έναν αυτόματο αναλυτή, συχνά εις βάρος της ποιότητας. Η εναλλαγή μεταξύ των μεθόδων είναι χρονοβόρα και μπορεί να θέσει σε κίνδυνο την ποιότητα των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα που δίδονται από ανοσολογικές δοκιμασίες μπορεί να επηρεαστούν από την περιστασιακή αλλαγή του αντισώματος ή την ανασύσταση των αντιδραστηρίων. Για μακροπρόθεσμες επιδημιολογικές μελέτες, η συνέχεια συγκεκριμένου πρωτοκόλλου και η συνέπεια της απόδοσης της δοκιμασίας είναι κρίσιμος παράγοντας [50].

Οι δοκιμασίες Φασματομετρίας μάζας-υγρής χρωματογραφίας-tandem (LC-MS/MS) για μέτρηση 25(OH)D έδειξαν σαφώς το δυναμικό τους και τα ισχυρά πλεονεκτήματά τους σε σχέση με προηγούμενες δοκιμασίες μη-φασματομετρικές. Αν και δεν

είναι τόσο απλή στη χρήση και πιο επιρρεπής σε τεχνικά προβλήματα, πολλοί από εγγενείς περιορισμούς της LC-MS/MS, που έχουν ως αποτέλεσμα μη ικανοποιητική ακρίβεια και ορθότητα, μπορεί να ξεπεραστούν εύκολα με τη χρήση σταθερών ισοτόπων ως εσωτερικά πρότυπα για βαθμονόμηση. Η μεταξύ εργαστηρίων συμφωνία έχει επίσης πρόσφατα βελτιωθεί σημαντικά. Με τη χρήση κοινών προτύπων αναφοράς και νέων πιστοποιημένων υλικών αναφοράς θα λυθούν αναμφίβολα κάποια από τα ζητήματα που παραμένουν. Ευτυχώς, η LC-MS/MS είναι πολύ πιο ευέλικτη από τους καθιερωμένους κλινικούς προσδιορισμούς για τη βιταμίνη D και τα προβλήματα με την έλλειψη ειδικότητας και τα συστηματικά σφάλματα μπορούν συχνά να επιλυθούν απλά κάνοντας αλλαγές σε μεμονωμένες αναλύσεις, για παράδειγμα, χρησιμοποιώντας μια διαφορετική στήλη HPLC, κινητή φάση, τροποποιώντας την τεχνική προετοιμασία του δείγματος, με αλλαγή της τεχνικής ιονισμού ή ακόμα και του ίδιου του οργάνου ανάλυσης μάζας. Αυτό απλά ήταν αδύνατο σε προηγούμενες RIA ή προσδιορισμούς χημειοφωταύγειας. Λόγω του ευρέος φάσματος των διαθέσιμων τεχνικών LC-MS/MS, είναι σημαντικό πάντα να δίνονται πλήρεις τεχνικές λεπτομέρειες της δοκιμασίας. Φυσικά, ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της LCMS/MS είναι η ικανότητα μέτρησης πολλαπλών μεταβολίτες της βιταμίνης D ταυτόχρονα. Εντούτοις οι LC-MS/MS δεν είναι σε θέση να παρέχουν παρόμοια απόδοση για τους πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων μεταβολίτες βιταμίνης D, όπως 1,25(OH)₂D ή 24,25(OH)₂D.

Αυτό ασφαλώς θα αλλάξει στο μέλλον, όταν πιο ευαίσθητες δοκιμασίες θα είναι διαθέσιμες, είτε μέσω της εφαρμογής νεότερης γενιάς φασματομέτρων μάζας είτε με τη χρήση τεχνικών χημικής τροποποίησης που θα μπορούν να «βγάλουν» αυτούς τους μεταβολίτες από το ενδογενές υπόστρωμα. Η ανάπτυξη αυτών των δοκιμασιών για πολλαπλά είδη της βιταμίνης D θα παρέχει τότε τους μελλοντικούς «χημειότυπους του μεταβολίτη της βιταμίνης D» (μεταβολικοί φαινότυποι) που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συνδυασμός βιοδεικτών σε διαγνωστικές ή προγνωστικές εφαρμογές εκτός της ακριβούς εκτίμησης της κατάστασης της βιταμίνης D. Όπως αποδείχθηκε πρόσφατα από τους Lirkie και συν. τα ποσοτικά δεδομένα LC-MS/MS για την κατανομή της βιταμίνης D και των μεταβολιτών της στους μαλακούς ιστούς μπορεί να δημιουργήσουν νέες ευκαιρίες για την κατανόηση του μεταβολισμού της βιταμίνης D και τις ακριβείς φυσιολογικές λειτουργίες της [135].

12. Βιβλιογραφία

1. Jones G (2012). Metabolism and biomarkers of vitamin D. *Scand J Clin Lab Invest* 243:7-13
2. Holick MF, Chen T, Lu Z, Sauter E (2007). Vitamin D and Skin Physiology. A D-Lightful Story. *Journal of Bone and Mineral Research* 22: 28-33
3. Fleet JC, Peacock M, Morris HA, Anderson PH, Nordin C (2014). Physiology of Vitamin D, Calcium, and Phosphate. pp14-31 In Taylor and Francis, The Physiological Basis of Metabolic Bone Disease. CRC Press.

4. Christakos S, Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ (2010). Vitamin D: Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 39:243-253.
5. Holick MF, MacLaughlin JA, Clark MB, Holick SA, Potts JT, Anderson RR, Blank IH, Parrish JA, Elias P (1980). Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science* 210:203-5.
6. Henry HL (2011). Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25:531-541.
7. Rowling MJ, Kemmis CA, Taffany DA, Welsh J (2006). Megalin-Mediated Endocytosis of Vitamin D Binding Protein Correlates with 25-Hydroxycholecalciferol Actions in Human Mammary Cells. *J Nutr* 136(11):2754-2759.
8. Kopic S, Geibel JP (2013). Gastric acid, calcium absorption, and their impact on bone health. *Physiological Reviews* 93(1):189-268.
9. Morris HA (2005). Vitamin D: A Hormone for All Seasons - How much is enough? Understanding the New Pressures. *Clin Biochem Rev* 26(1):21-32.
10. DeLuca HF (2014). History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. *Bonekey Rep* 3:479.
11. Genuth SM (2006). Regulation of Calcium and Phosphorus Metabolism pp239-256 In Levy M, Robert M, Berne RM, Koepfen BM, Stanton BA. *Principles of Physiology*, Mosby-Year Book, Inc.
12. Bhan I (2014). Vitamin D Binding Protein and Bone Health. *International Journal of Endocrinology* 2014:561214.
13. Morris HA, Anderson PH, Nordin C (2014). Vitamin D: Activities for Bone Health pp167-186. In Taylor and Francis, *The Physiological Basis of Metabolic Bone Disease*. CRC Press.
14. www.nature.com
15. Brannon PM (2012). Key questions in vitamin D research. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 72:154-162
16. Bikle D, Adams J, Christakos S (2008). Vitamin D: Production, Metabolism, Mechanism of Action, and Clinical Requirements pp141-149. *American Society for Bone and Mineral Research*. In Rosen CJ, *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. ASBR.
17. Morris HA, Anderson PH (2010). Autocrine and paracrine actions of vitamin D. *Clin Biochem Rev* 31(4):129-38.
18. Cândido FG, Bressan J (2014). Vitamin D: Link between Osteoporosis, Obesity, and Diabetes. *Int J Mol Sci* 15:6569-6591.
19. Lips P (2012). Interaction between vitamin D and calcium. *Scand J Clin Lab Invest* 243:60-64.
20. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellovich K, Chen J, Hamm L, Gadegbeku C, Horwitz E, Townsend R, Anderson C, Lash JP, Hsu C, Mary B MB, Wolf M (2011). Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney International* 79:1370-1378.
21. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Amaud S, Galan P, Hercberg S (1997). Prevalence of Vitamin D Insufficiency in an Adult Normal Population. *Springer/Osteoporosis International* 7(5):439-443.
22. Liu ZM, Woo J, Wu S, Hothe S (2013). The Role of vitamin d in blood pressure, endothelial and renal function in postmenopausal women. *Nutrients* 5(7):2590-610.
23. Kitson MT, Roberts SK (2012). D-livering the message: The importance of vitamin D status in chronic liver disease. *Journal of Hepatology* 57:897-909.
24. Hewison M (2012). Vitamin D and immune function: Autocrine, paracrine or endocrine? *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 243:92-102.
25. Zittermann A, Gummert J (2010). Nonclassical Vitamin D Actions. *Nutrients* 2:408-425.
26. Aranow C (2011). Vitamin D and the Immune System. *J Investig Med* 59(6):881-886.
27. ML (2007). Vitamin D Receptor Gene (VDR) Associations with Cancer. *Nutr Rev* 65:102-4.
28. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF (2008). Vitamin D Deficiency: An Important, Common, and Easily Treatable Cardiovascular Risk Factor? *J Am Coll Cardiol* 52(24):1949-56.
29. Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P (2014). Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2:76-89.
30. Herr C, Greulich T, Koczulla R, Meyer S, Zakharkina T, Branscheidt M, Eschmann R, Bals R (2011). The role of vitamin D in pulmonary disease: COPD, asthma, infection, and cancer *Respir Res* 12(1):31.
31. Sharma R, Saigal R, Goyal L, Mital P, Yadav RN, Meena PD, Agrawal A (2014). Estimation of vitamin D levels in rheumatoid arthritis patients and its correlation with the disease activity. *J Assoc Physicians India* 62(8):678-81.
32. Basran J, Duckham RI, Hogan DB (2011). Vitamin D and Fall Risk pp67-82. In Watson RR, *Handbook of vitamin D in human health*. Wagenigen Academic Publishers.
33. Aurand C, Cramer H (2015). Method Optimization for LC-MS Analysis of Vitamin D Metabolite Critical Pairs in Serum Sigma-Aldrich Co. *Rep* 32:1.
34. Granado Lorenzo F, Blanco-Navarro I, Pérez-Sacristán B (2013). Critical evaluation of assays for vitamin D status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16(6):734-40.
35. Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N (2012). The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab* 97(1):163-8.
36. Higashi T, Ogasawara A, Shimada K (2000). Investigation of C-3 epimerization mechanism of 24,25-dihydroxyvitamin D3 in rat using liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal Sci* 16:477-482.
37. Karnao M, Tatematsu S, Hatakeyama S (2004). C-3 epimerization of vitamin D3 metabolites and further metabolism of C-3 epimers. *J Biol Chem* 279:15897-15907.
38. Bartoszewicz Z, Kondracka A, Jaźwiec R, Popow M, Dadlez M, Bednarczuk T (2013). Can we accurately measure the concentration of clinically relevant vitamin D metabolites in the circulation? The problems and their consequences. *Endokrynol Pol* 64(3):238-45.
39. Heaney R (2008). Vitamin D in Health and Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 3: 1535-1541.
40. Leu M, Giovannucci E (2011). Vitamin D: epidemiology of cardiovascular risks and events. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 25:633-646.
41. Schlingmann KP, Kaufmann M, Weber S, Irwin A, Goos C, John U (2011). Mutations in CYP24A1 and idiopathic infantile hypercalcemia. *N Engl J Med* 365:410-421.
42. Holick M, Binkley N, Bischoff-Ferrari H, Gordon C, Hanley D (2011). Evaluation, treatment and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96:1911-1930.
43. Souberbielle JC, Courbebaisse M, Cormier C, Pierrot-Deselligny C, Viard JP, Jean G, Cavalier E (2012). When should we measure Vitamin D concentration in clinical practice? *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation* 243:129-135.
44. KDIGO (2009). Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease mineral and bone disorder (CKD-MBD). *Kidney Int* 79:S1-S130.
45. Yu CL, Falk R, Kimlin MG, Rajaraman P, Sigurdson A, Horst R, Cosentino L, Linet M, Freedman DM (2010). The impact of delayed blood centrifuging, choice of collection tube, and type of assay on 25-hydroxyvitamin D concentrations. *Cancer Causes Control* 21(4):643-648.
46. Colak A, Toprak B, Dogan N, Ustuner F (2013). Effect of sample type, centrifugation and storage conditions on vitamin D concentration. *Biochem Med* 23(3):321-5.
47. Wielders JPM, Wijnberg FA (2009). Preanalytical stability of 25(OH)vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem* 55:1584-1585.
48. Hollis BW (2008). Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *Am J Clin Nutr* 88:507-510S.
49. Ding S, Schoenmakers I, Jones K, Koulman A, Prentice A, Volmer D (2010). Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 398:779-789.
50. Carter GD (2011). Accuracy of 25-Hydroxyvitamin D Assays: Confronting the Issues. *Curr Drug Targets* 12(1):19-28.
51. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF (1998). Current Understanding of the Molecular Actions of Vitamin D. *Physiological Reviews* 78:1193-1231.
52. Powe CE, Evans MK, Wenger J, et al (2013). Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N Engl J Med* 369(21):1991-2000.
53. Carter GD, Phinney K (2014). Assessing Vitamin D Status: Time for a Rethink? *Clinical Chemistry* 60:809-811.
54. Schwartz JB, Lai J, Lizaola B, Kane L, Markova S, Weyland P, Terrault NA, Stotland N, Bikle D (2014). A comparison of measured and calculated free 25(OH) vitamin D levels in clinical populations. *J Clin Endocrinol Metab* 99(5):1631-7.
55. Costelloe SJ, Woolman E, Rainbow S, Stratilots L, O'Garra G, Whiting S, Thomas M (2009). Is high-throughput measurement of 25-hydroxyvitamin D3 without 25-hydroxyvitamin D2 appropriate for routine clinical use? *Anal Clin Biochem* 46:86-7.
56. Hollis BW (2004). The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Endocrinol Metab* 89:3149-51.
57. Elder PA, Lewis JG, King RI, Florkowski CM (2009). An anomalous result from gel tubes for vitamin D. *Clin Chim Acta* 410(1-2):95.
58. Annesley TM (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 49(7):1041-4.
59. Haddad JG, Chyu KJ (1971). Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab* 33(6):992-5.
60. Eisman JA, Shepard RM, DeLuca HF (1977). Determination of 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma using high-pressure liquid chromatography. *Anal Biochem* 80(1):298-305.
61. Hollis BW, Napoli JL (1985). Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem* 31:1815-1819.
62. Hollis BW, Kamerud JQ, Selvaag SR, Lorenz JD, Napoli JL. Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an 125I-labeled tracer. *Clin Chem* 1993; 39:529-533.
63. Carter GD, Carter R, Jones J, Berry J (2004). How Accurate Are Assays for 25-Hy-

- droxyvitamin D? Data from the International Vitamin D External Quality Assessment Scheme. *Clinical Chemistry* 50:2195-2197.
64. Bordallo CF, Saavedra MS (2011). Controversies in measuring 25 (OH) Vitamin D: comparison of two methodologies. *Rev Argent Endocrinol Metab* 48 69-77.
 65. Jongen M, Van Ginkel F, Vijgh W, Kulper S, Netelenbos J, Lips P (1984). An International Comparison of Vitamin D Metabolite Measurements. *Clinical Chemistry*, 30:399-403.
 66. Stöckl D, Hondt H, Thienpont L (2009). Method validation across the disciplines: critical investigation of major validation criteria and associated experimental protocols. *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 877:2180-2190.
 67. Souberbielle JC, Fayol V, Sault C, Lawson-Body E, Kahan A, Cormier C (2005). Assay-specific decision limits for two new automated parathyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Chem* 51(2):395-400.
 68. Jakobsen J, Bysted A, Andersen R, Bennett T, Brot C, Bügel S, Cashman KD, Denk E, Harrington M, Teucher B, Walczyk T, Ovesen L (2009). Vitamin D status assessed by a validated HPLC method: within and between variation in subjects supplemented with vitamin D3. *Scand J Clin Lab Invest* 69(2):190-7.
 69. Hollis BW (2000). Comparison of commercially available (125)I-based RIA methods for the determination of circulating 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem* 46:1657-61.
 70. Carter GD, Jones JC, Berry JL (2007). The anomalous behaviour of exogenous 25-hydroxyvitamin D in competitive binding assays. *J Steroid Biochem Mol Biol* 103:480-2.
 71. Chen H, McCoy LF, Schleicher RL, Pfeiffer CM (2008). Measurement of 25-hydroxyvitamin D3 25OHD3 and 25-hydroxyvitamin D2 25OHD2 in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison to a radioimmunoassay method. *Clin Chim Acta* 391:6-12.
 72. Turpeinen U, Hohenenthal U, Stenman U, Hekan (2003). Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay. *Clin Chem* 49:1521-4.
 73. Souberbielle JC, Fayol V, Sault C, Lawson-Body E, Kahan A, Cormier C (2005). Assay specific decision limits for two new automated parathyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Chem* 51:395-400.
 74. Ibrahim F, Parmentier C, Boudou P (2007). Divergence in classification of 25-hydroxyvitamin D status with respect to immunoassays. *Clin Chem* 53:363-4.
 75. Roth H, Jürgen, Schmidt G, Heinrich, Weber H, Niederau C (2008). Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference. *Anal Clin Biochem* 45:153-9.
 76. www.idspic.com
 77. Barake M, Daher RT, Salti I, Cortas NK, Al-Shaar L, Habib RH, Fuleihan Gel-H (2012). 25-hydroxyvitamin D assay variations and impact on clinical decision making. *J Clin Endocrinol Metab* 97(3):835-43.
 78. Hyppönen E, Turner S, Cumberland P, Power C, Gibb I (2007). Serum 25-hydroxyvitamin D measurement in a large population survey with statistical harmonization of assay variation to an international standard. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4615-22.
 79. Kimball SM, Vieth R (2007). A comparison of automated methods for the quantification of serum 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D. *Clin Biochem* 40:1305-10.
 80. Knox S, Harris J, Calton L, Wallace AM (2009). A simple automated solid-phase-extraction procedure for measurement of 25-hydroxyvitamin D3 and D2 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Clin Biochem* 46:226-30.
 81. www.diasorce.com
 82. www.diasorin.com
 83. www.roche.com
 84. Architect® 25-OH (2011). Vitamin D Assay [directional insert 3L52, G2-3231/R03]. Abbott Park, IL: Abbott Laboratories.
 85. Siemens Advia Centaur® (2012). XP: recalibration of the vitamin D total assay beginning with reagent lot 134020. Siemens Healthcare Diagnostics.
 86. Farrell C, Herrmann M (2013). Determination of vitamin D and its metabolites *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 27:675-688.
 87. Kobold U (2012). Approaches to measurement of Vitamin D concentrations—Mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 243:54-9.
 88. McMurry J (2000). *Mass Spectrometry* pp523-557. In *Organic Chemistry*, Brooks/Cole Publishing Company.
 89. Skoog D, Holler FJ, Nieman TA (2002). *Mass Spectrometry* pp 578-615. In *Saunders C, Principles of Instrumental Analysis*. Saunders College Publishing.
 90. Ding S, Schoenmakers I, Jones K, Koulman A, Prentice A, Volmer DA (2010). Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPL-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 398(2):779-89.
 91. Hymoller L, Jensen SK (2011). Vitamin D analysis in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) with C(30) reversed phase column and UV detection-easy and acetonitrile-free. *J Chromatog* 1218:1835-1841.
 92. Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M (2012). State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography - tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem* 58: 531-542.
 93. van den Ouweland JM, Vogeser M, Bächer S (2013). Vitamin D and metabolites measurement by tandem mass spectrometry. *Rev Endocr Metab Disord* 14(2):159-84.
 94. Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, et al (2012). The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D3 is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab* 97:163-168.
 95. Couchman L, Benton CM, Moniz CF (2012). Variability in the analysis of 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography - tandem mass spectrometry: The devil is in the detail. *Clin Chim Acta* 413:1239-43.
 96. Cavalier E, Wallace AM, Knox S, Mistretta V, Cormier C, Souberbielle J-C (2008). Serum vitamin D measurement may not reflect what you give to your patients. *JBM R* 23:1864-5.
 97. .Schleicher R, Pfeiffer CM (2009). Vitamin D testing: how will we get it right? *Clinical Laboratory News* 35:1-7.
 98. Shah I, James R, Barker J, Petroczi A, Naughton D (2011). Misleading measures in Vitamin D analysis: A novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars *Nutr J* 14:10:46.
 99. Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS (2015). Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the “gold standard” method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev* 34(1):2-23.
 100. Hollis BW, Horst RL (2007). The assessment of circulating 25OHD and 1,25OHD2: where we are and where we are going. *J Steroid Biochem Molec Biol* 103:473-6.
 101. Zittermann A, Schleithoff SS, Frisch S, et al (2009). Circulating calcitriol concentrations and total mortality. *Clin Chem* 55:1163-1170.
 102. Rollins G (2009). Vitamin D testing: what's the right answer? *Clin Lab News* 35:1,6,8.
 103. Krasowski M (2011). Pathology Consultation on Vitamin D Testing. *Am J Clin Pathol* 136:507-514.
 104. Fraser W, Milan A (2013). Vitamin D Assays: Past and Present Debates, Difficulties, and Developments. *Calcif Tissue* 92:118-127.
 105. Tran J, Bautista D, Seres Z, Cormaut L, Gundlach T, Rousseau A, Griesser H (2014). A Fully-Automated 1,25-Dihydroxy Vitamin DXp Assay on the IDS-ISYS Automated System. *Clinical Chemistry*, Vol. 60:49.
 106. Hollis BW, Kamerud JQ, Kurkowski A, Beaulieu J, Napoli JL (1996). Quantification of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D by radioimmunoassay with 125I-labeled tracer. *Clin Chem* 42(4):586-92.
 107. Pandian R, Pandian J, Seres Z, Elias A (2014). Calcitriol and its free and bioavailable fractions are better markers than 25hydroxy vitamin D for monitoring vitamin D status during Pregnancy. *Clinical Chemistry*, Vol. 60:48.
 108. Bischoff-Ferrari H (2009). Vitamin D: what is an adequate vitamin D level and how much supplementation is necessary? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 23(6):789-95.
 109. Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, Murad MH, Kovacs CS (2012). The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 33(3):456-92.
 110. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, Durazo-Arvizu RA, Gallagher JC, Gallo RL, Jones G, Kovacs CS, Mayne ST, Rosen CJ, Shapses SA (2011). The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 96(1):53-8.
 111. International Osteoporosis Foundation (2014). International Osteoporosis Foundation Statement of New IOM Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.
 112. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad MH, Weaver CM; Endocrine Society (2011). Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 96(7):1911-30.
 113. Holick MF (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357:266-281.
 114. .Hollis BW. Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for vitamin D. *J Nutr* 2005; 135:317-322.
 115. LeBlanc E, Chou R, Zakher B, Daeges M, Pappas M (2014). Screening for Vitamin D Deficiency: Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force Recommendation. *Pacific Northwest EPC* 4:54.
 116. Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al (2012). Biological variation database and quality specifications for imprecision, bias and total error. The 2012 update <http://www.westgard.com/>
 117. Brescia V, Tampola M, Cardinali R (2013). Biological Variability of Serum 25-Hydroxyvitamin D and Other Biomarkers in Healthy Subjects. *Lab Medicine* 44(1):20-24.
 118. Fraser GG (2004). Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 42:758-764.
 119. Viljoen A, Singh DK, Farrington K, Twomey PJ (2011). Analytical quality goals for 25-vitamin D based on biological variation. *J Clin Lab Anal* 25(2):130-133.
 120. Bedner M, Lippa KA, Tai SS (2013). An assessment of 25-hydroxyvitamin D measurements in comparability studies conducted by the Vitamin D Metabolites

- Quality Assurance Program. *Clin Chim Acta* 426:6-11.
121. Granado Lorenzo F, Blanco-Navarro I, Perez-Sacrsitan B (2013). Critical evaluation of assays for vitamin D status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16(6):734-40.
 122. Binkley N, Sempos CT. Vitamin D Standardization Program (VDSP) (2014) Standardizing Vitamin D Assays: The Way Forward. *J Bone Miner Res* 29(8):1709-14.
 123. Stöckl D, Sluss PM, Thienpont LM (2009). Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis. *Clin Chim Acta* 408:8-13.
 124. <http://www.nist.gov/mml/csd/vitdqap.cfm>.
 125. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, DeLuca HF, Drezner MK (2004). Assay Variation Confounds the Diagnosis of Hypovitaminosis D: A Call for Standardization. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3152-7.
 126. Carter GD, Jones JC (2009). Use of a common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for serum 25-hydroxyvitamin-D. *Anal Clin Biochem* 46:79-81.
 127. Fraser WD (2009). Standardization of vitamin D assays: art or science? *Anal Clin Biochem* 2009; 46:3-4.
 128. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M (2010). Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: Current procedures, performance characteristics and limitations *Steroids* 75(7):477-88.
 129. Morris H (2014). Current Status and Perspectives on 25(OH)D Measurement in the Clinical Laboratory. Implications for Result Interpretation and Clinical Decision Making. e-seminar.
 130. www.deqas.org
 131. Wootton AM (2005). Improving the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem Rev* 26:33-6.
 132. Lippi G, Salvagno G.L, Fortunato A, Dipalo M, Aloe R, Rin GD, Giavarina D (2014). Multicenter Comparison Of Seven 25OH Vitamin D Automated Immunoassays. *J Med Biochem* 33:1-7.
 133. Ong L, Saw S, Sahabdeen N, Tey KT, Shun C, Sethi SK (2012). Current 25-hydroxyvitamin D assays: Do they pass the test? *Clinica Chimica Acta* 413:1127-1134.
 134. Wielders J, Carter G, Eberl H, Morris, Roth G, Christian Vogl C (2014). Automated Competitive Protein-Binding Assay for Total 25-OH Vitamin D, Multicenter Evaluation and Practical Performance. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 00:1-11.
 135. Lipkie TE, Janasch A, Cooper BR, Hohman EE, Weaver CM, Ferruzzi MG (2013). Quantification of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in soft tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 932:6-11.