

Vitamin D 2019 - standardizace i chaos. Miniaturní model prezentace vědy v současnosti.

Friedecký B., Vávrová J.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové

SOUHRN

V tomto sdělení je pojednáno o recentních problémech stanovení a interpretace 25-OH vitamínu D. Na podkladě několika zajímavých studií ukazujeme, že jeho nízké hladiny jsou téměř pandemického charakteru, avšak stanovení rozhodovacích limitů pro posouzení stavu suplementace je doposud kontroverzní. Také personalizace stanovení je v počátcích a její použití dosud spíše výjimkou. Pravidla pro exaktní posuzování suplementace vitamínu D jsou však jasná. Striktní použití kalibrace VDSP (LC-MS/MS), ověření starších studií rekalibrací materiálů z příslušných biobank, zaměření studií i na genetické faktory s využitím metabolitů vitamínu D.

Klíčová slova: Vitamin D, metabolity, standardizace, suplementace, personalizace.

SUMMARY

Friedecký B., Vávrová J.: Vitamin D 2019 - standardization and chaos. Miniature model of the presentation of laboratory science at present.

Current problems of 25 OH vitamin D measurement and interpretation of its results have mixed character. Positive influence of standardization via VDSP and negative chaotic problems caused by using immunochemistry methodology, lack of standardization in 1,25 (OH)₂ vitamin D measurement and poor, in practice not applicable methodology for free vitamin D. Some recent publications deal with problems of vitamin D supplementation are main source of data of our introduced work. There is clear that low concentrations of vitamin D are pandemic, but problem of cut off values for deficiency remains. Also personalized approach for vitamin D results is not adequately developed. Information in paper and electronic periodical have often very low quality. Basic factors for increase quality of informatics about supplementation problems are as follows: strict use of reference LC-MS/MS methods in supplementation studies, recalculation of older studies by recalibration of results of their materials from biobanks, use of monitoring CYP24A1 by use of VMR (24,25 (OH)₂ / 25 (OH)).

Keywords: Vitamin D, metabolites, standardization, supplementation, personalization.

Úvod

Problémy s měřením a klinickým hodnocením vitamínu D jsou značné, aktuální, velmi diskutované. Po počáteční konjunktuře zájmu o tento analyt nastala doba kritického přístupu k problému a v poslední době k tomu přistupuje problém často kontroverzních a neobyčejně povrchních informací, šířených na stránkách populárních periodik a (jak jinak) na internetu. Proto by mělo být toto sdělení, stručně shrnující situaci posledních 2-3 let, aktuální.

Opíráme se o data webových stránek VDSP (Vitamin D Standardization Program), o závěry mezinárodních konferencí s tématem kontroverzí kolem vitamínu D z let 2017 a 2019, o stanoviska American Society of Pathology a její iniciativy Choosing Wisely, o výsledky mezinárodního programu EHK DEQAS, pracujících s komutabilními kontrolními materiály se vztažnými hodnotami, zjištěnými referenčními metodami LC-MS/MS.

Interference a zdroje systematických chyb u imunochemických metod

Metabolity vitamínu D jsou významným zdrojem interferencí při stanovení 25-OH-vitamínu D u imunochemických metod s postupy, založenými na vazebném proteinu DBP. Existence pozitivních interferencí

3-epi vitamínu D₃ a zejména 24,25 dihydroxyvitamínu D jsou obecně známé a jejich velikost kolísá nejen v závislosti na koncentraci ve vzorku, ale i na použité imunoanalytické metodě.

Zvýšený obsah vitamínu D₂ může rovněž nepříznivě ovlivnit správnost výsledku měření celkového 25-OH vitamínu D. Čím je vyšší podíl vitamínu D₂ ve vzorku, tím vyšší jsou rozdíly mezi jednotlivými imunoanalytickými metodami.

Zcela recentně je popsán enormní efekt zvýšené koncentrace biotinu na výsledky imunochemických metod, využívajících vazby biotin-streptavidin. V závislosti na koncentraci biotinu lze pozorovat chyby desítek až stovek procent.

Závažné diference hodnot 25-OH vitamínu D jsou pozorovány mezi jednotlivými imunoanalytickými metodami a referenční metodou LC-MS/MS u pacientů, patřících do různých klinicky definovaných skupin - zdraví Evropané, zdraví Afričané, těhotné ženy, hemodialyzovaní pacienti, osteoporotické osoby, těhotné ženy, pacienti na intenzivní péči [1]. Největší diference bývají u pacientů na hemodialýze [1]. Závislost výsledků imunoanalytických metod je tedy významná nejen na použité imunochemické metodě, ale ještě výrazněji na klinickém stavu pacientů.

Systematické sledování a hodnocení výsledků srovnávání používaných metod různých producentů, kvantifikace bias jako diferencí od vztažných hodnot referen-

čních metod LC-MS/MS a vyhodnocování interferencí metabolitů, biotinu a hodnot poměru D3/D2 se věnuje v Evropě kontrolní program DEQAS [2] a v USA na stejném principu fungující program CAP-ABVD. Podstatou jejich efektivity jsou komutabilní kontrolní materiály se vztažnými hodnotami, získanými referenčními LC-MS/MS metodami, dovolující exaktně hodnotit bias jednotlivých laboratoří a metod jako diferencí od nich. Oba programy jsou považovány za oficiální nástroje VDSP.

Autorům jsou známy jen tyto dva programy efektivní kontroly kvality stanovení vitamínu D. Programy EHK, používající nekomutabilních kontrolních materiálů hodnotí jen difference laboratoří od průměrů výsledků vlastní použité metody, což významné informace o kvalitě výsledků neposkytne.

Hodnocení stavu výživy a potřeb suplementace

Řada prací z let 2017-2019 potvrzuje fakt, že populační studie nutričního charakteru a zejména pak u dětské populace by měly vycházet z dat, získaných separační metodou LC-MS/MS, významně spolehlivějších, než dat, získaných imunoanalytickými metodami. Populační screening vitamínu D není například americkými internisty mimo rámec velkých národních nutričních studií doporučován vůbec [3]. Použití imunoanalytických metod by mělo být určeno především ke kontrole účinnosti suplementace.

Výsledky počtu pacientů s nedostatkem vitamínu D, získané imunochemickým měřením se velmi významně liší od výsledků, získaných metodami LC-MS/MS. Uvádí se, že ve Velké Británii četnost 69 % osob s nedostatkem vitamínu D, získaná imunochemickými postupy, klesla při opakovaném měření pomocí metod LC-MS/MS na 46 %. Představa o úrovni stavu nutriční u obyvatelstva je tedy silně závislá na stavu a druhu použité analytické metodiky [4].

Velké populační studie, prováděné v osmdesátých a devadesátých letech v předstandardizační éře problém zjištění skutečné míry potřeby suplementace vitamínem neřeší dostatečně přesně. To dokazují rekalibrace soudobými referenčními materiály a metodami vzorků z biobank [5, 6]. Rekalibrace vzorků z biobank u německé studie KIGGS, provedené u dětské populace v letech 2003 -2006 zaznamenala pokles četnosti snížených hodnot vitamínu D z 26 % na 13 %. Naopak tatáž rekalibrace u vzorků smíšené populace NHANES III z konce osmdesátých a počátku devadesátých let k zásadní změně počtu jedinců se sníženou hodnotou vitamínu D kupodivu nevedla.

V tomto „předstandardizačním“ období vzniklo kolem 60 000 publikací včetně několika velkých populačních studií a rekalibrace výsledků těchto časných studií by byla velmi vhodná. Postup takové rekalibrace je navržený a popsán recentně na stránkách VDSP.

Podle dokumentace programu DEQAS používá metod LC-MS/MS jen přibližně 20 % laboratoří. V ČR a v Německu je to v současnosti ještě mnohem méně - 0-3 % účastníků. Řada autorů se domnívá, že počet

těchto laboratoří by měl být podstatně vyšší, někdy se klade i otázka, zda je vůbec použití imunoanalytických metod za jejich současného stavu vhodné [4].

Preference LC-MS/MS metod před imunochemickými by zjevně urychlila řešení prezentovaných problémů, zejména otázku potřeby suplementace. Ostatně široké používání hmotnostní spektrometrie v praxi laboratoří je na pořadu dne a lze od něj očekávat nejen zlepšení klinické efektivity, ale i podstatně hlubší přístup k hodnocení analytické kvality měření v budoucnosti, odpovídající podmínkám 4. průmyslové revoluce – digitalizaci [6].

Mezinárodní konference, věnované vitamínu D v letech 2017 - 2019 ukázaly dvojí tvář problému. Pozitivní efekt standardizace a VDSP na jedné straně a řadu nedořešených problémů, přerůstajících až do stavu chaosu, na straně druhé. Pozitivní stránku věci představuje například skutečnost, že počet výsledků měření v DEQAS s požadovanou hodnotou bias $\leq 5\%$ vzrostl z 33 % v roce 2014 na 54 % v roce 2018. Problémy a chaos s nimi spojený se týkají zejména otázek jak, kdy a zda vůbec stanovovat metabolity vitamínu D, nedostatečné standardizace 1,25 dihydroxyvitamínu D, zatím zdá se neřešitelných problémů volného (free) vitamínu D [7, 8, 9], ale i velmi úzce souvisejících problémů s chronicky zaostávající standardizací PTH. Zcela základním problémem se zdá vyřešení otázek suplementace u dětských a onkologických pacientů.

1,25 dihydroxyvitamin D, metabolity a DEQAS

Orientaci o současném stavu měření těchto analytů může poskytnout sledování výsledků programu DEQAS. Z výsledků cyklu DEQAS v březnu 2019 je zřejmé:

- Diference průměrů jednotlivých kitů imunoanalytických metod při měření 1,25 (OH)₂ vitamínu D od průměru jsou neadekvátně vysoké (-7 až 43 %) a od referenční LC-MS/MS metody ještě podstatně vyšší (-15 až 91 %)
- Jen 9 % účastníků používá ke stanovení 1,25 (OH)₂ vitamínu D metody LC-MS/MS
- Preciznost LC-MS/MS metod měření metabolitů vitamínu D je: CV% = 30 u 3-epi-25 (OH) D3 a CV% = 13 u 24,25 (OH)₂ vitamínu D
- Počet laboratoří, provádějících vyšetření metabolitů je nízký, jen v řádu několika procent účastníků.

Personalizovaný přístup k stavu suplementace vitamínem D u mladých osob

Stanovení hodnot VMR (vitamin D metabolite ratio) jako poměru hodnot 24,25 (OH)₂/25 OH se snaží recentně použít kolektiv belgických autorů jako ukazatele regulace vitamínu D genem CYP24A1 [10], jakožto důležitého faktoru úrovně suplementace. Při studiu věkově mladé populace, zahrnující novorozence, děti,

adolescenty a mladistvé odvodili Cavalier a spol. cut off hodnotu dostatečné suplementace 25 OH vitamínu D na 52 nmol/l. Pak se více, než 50% mladé belgické populace ocitá ve skupině osob s problémy suplementace vitamínu D a regulace CYP24A1 [11]. Hodnoty vitamínu D pod 50 nmol/l souvisí se snižováním hodnot katabolického metabolitu 24,25 (OH), často až na hodnoty pod mez stanovitelnosti. Hledání hlubších příčin nedostatku suplementace vitamínem D v oblasti genu a s využitím jednoho z jeho metabolitů může být považováno za cenný pokus podívat se na chronický problém cestou personalizované medicíny [11]. Striktní podmínkou takového hlubšího přístupu je použití standardizované metody LC-MS/MS.

Problém suplementace a deficiencie vitamínu D v Evropě byl již předmětem rozsáhlé metaanalytické a analytické studie v roce 2016 [12], jejíž další součástí byla i již výše zmíněná recalibrace materiálů z biobank pomocí reference VDSP (vitamin D standardizační program). Její výsledky jasně ukázaly klíčový význam kalibrace referenční metodou LC-MS/MS v programu VDSP. Rozdíly mezi původními nestandardizovanými hodnotami vitamínu D a hodnotami standardizovanými nebo nekalibrovanými podle VDSP činily při použití hodnoty cut off 50 nmol/l 40%! Problémy suplementace vitamínu D lze smysluplně řešit pouze pomocí standardizace metod a tato zásada platí obecně. Do budoucna poroste význam personalizovaného přístupu podobně, jak se snažili ukázat Cavalier a spol. [10].

Závěrečná poznámka

Klinický význam každého vyšetřovaného analytu v biologickém vzorku je dán v první řadě úrovní analytické a preanalytické kvality jeho měření. Nedůsledné respektování tohoto jen zdánlivě banálního a samozřejmého faktu je velmi časté jak ze strany laboratoří, tak i ze strany producentů metod a přístrojových platforem. Separovaná řešení buď jen analytických, nebo jen klinických problémů bez jejich integrace nevedou k cíli. V současnosti je třeba brát v úvahu rozvoj nových analytických technologií vážněji, než se děje doposud. V případě vitamínu D jde o vyšší úroveň prosazení metod hmotnostní spektrometrie. Jejich rozvoj je rychlý, jejich přínos vysoký a pro budoucnost rozhodný. Podmínkou (*conditio sine qua non*) je prosazovat odborný rozvoj laboratorních pracovníků a poskytnout šanci k profesionálnímu růstu zejména mladých kvalifikovaných odborníků.

Jsme v éře, kdy by věda měla zaujmout vysoce angažovanou pozici v řešení problémů současné civilizace, které mohou být rozhodné pro její osud. Po mnoha letech se opakuje vyhrčená situace z padesátých let minulého století, kdy špičkoví vědci (Einstein, Russell a další) svými postoji pomohli odvrátit hrozbu zániků lidstva jadernou katastrofou. V současnosti hrozící ekologické pohromy angažovaný přístup i s možnými osobními riziky znovu vyžadují. Velmi aktuální článek, publikovaný 7. srpna 2019 v *Nature* [13] je hodný přečtení a uvážení. Objektivní a uvážlivé hodnocení stavu

měření a interpretace některých problémových analytů, provedené bez ohledu na komerční zájmy a s poctivým ohledem na známá fakta, je ve srovnání se závažností dnešních problémů světa zanedbatelná a zvládnutelná maličkost.

Literatura

1. **Cavalier, E., Lukas, P., Bekaert, A. C. et al.** Analytical and clinical evaluation of the new Fujirebio Lumipulse G non-competitive assay for 25 (OH)-vitamin D and three immunoassays for 25 (OH)D in healthy subjects, osteoporotic patients, third trimester pregnant women, healthy African subjects, hemodialyzed and intensive care patients. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2016, 54, p. 1347-1355
2. **Carter, G. D., Berry, J., Durazo-Arvizu, R. et al.** Hydroxyvitamin D assays: An historical perspective from DEQAS. *J Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 2018, 177, p. 30-35
3. **American Society for Clinical Pathology 2018.** Choosing Wisely ABIM Foundation: Twenty-five things physicians and patients should question.
4. **Avenall, A., Bolland, M. J., Grey, A.** 25-Hydroxyvitamin D – Should labs be measuring it? *Ann. Clin. Biochem.*, 2019, 56, p. 188-189
5. **Brinkley, N., Dawson-Hughes, B., Durazo Arvizu, R. et al.** Vitamin D measurement standardization. The way out of chaos. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2017, p. 117-123
6. **Hayden, J., Bachmann, L.** Questioning quality assurance in clinical mass spectrometry. *Clin. Lab. News*, 2019.
7. **Giustina, A., Adler, R. A., Binkley, N. et al.** Controversies in vitamin D: Summary statement from an International Conference *J Clin. Endocrinol. Metab.*, 2019, 104, p. 234-240.
8. **Sempos, C. T. et al.** Vitamin D assay and the definitivity of hypovitaminosis D: results from the First International Conference on controversies in vitamin D. *Br. J Clin. Pharmacol.*, 2018, 84, p. 2194-2207.
9. **Minisola, S., Ferrone, F., Danese, V. et al.** Controversies surrounding vitamin D: focus in supplementation and cancer. *Int. J Environ. Res. Public Health*, 2019, doi:10.3390/ijerph16020189.
10. **Cavalier, E., Huyghebaert, L., Rousselle, O. et al.** Simultaneous measurement of 25 (OH)-vitamin D and 24,25(OH)₂-vitamin D to define cut-offs for CYP24A1 mutation and vitamin D deficiency in a population of 1200 young subjects. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012, <http://doi.org/10.1515/cclm-2019-0996>
11. **Herrman, M.** Towards a personalized assessment of vitamin D status. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2020, <http://doi.org/10.1515/cclm-2019-1213>
12. **Cashman, A. D., Dowling, K. G., Škrabáková, Z. et al.** Vitamin D deficiency in Europe-Pandemic? *Am J Nutr.*, 2016, 103, p. 1033-1044
13. **Editorial.** Scientists must rise above politics - and restate their value to society. *Nature*, 572, 153 (2019) doi:101038/d41586-019-02379-w

Autoři prohlašují, že nejsou ve střetu zájmů.

Do redakce došlo 14. 8. 2019.

Adresa pro korespondenci:
RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.
Štřelničná 1680
182 00 Praha 8
e-mail: friedecky@sekk.cz