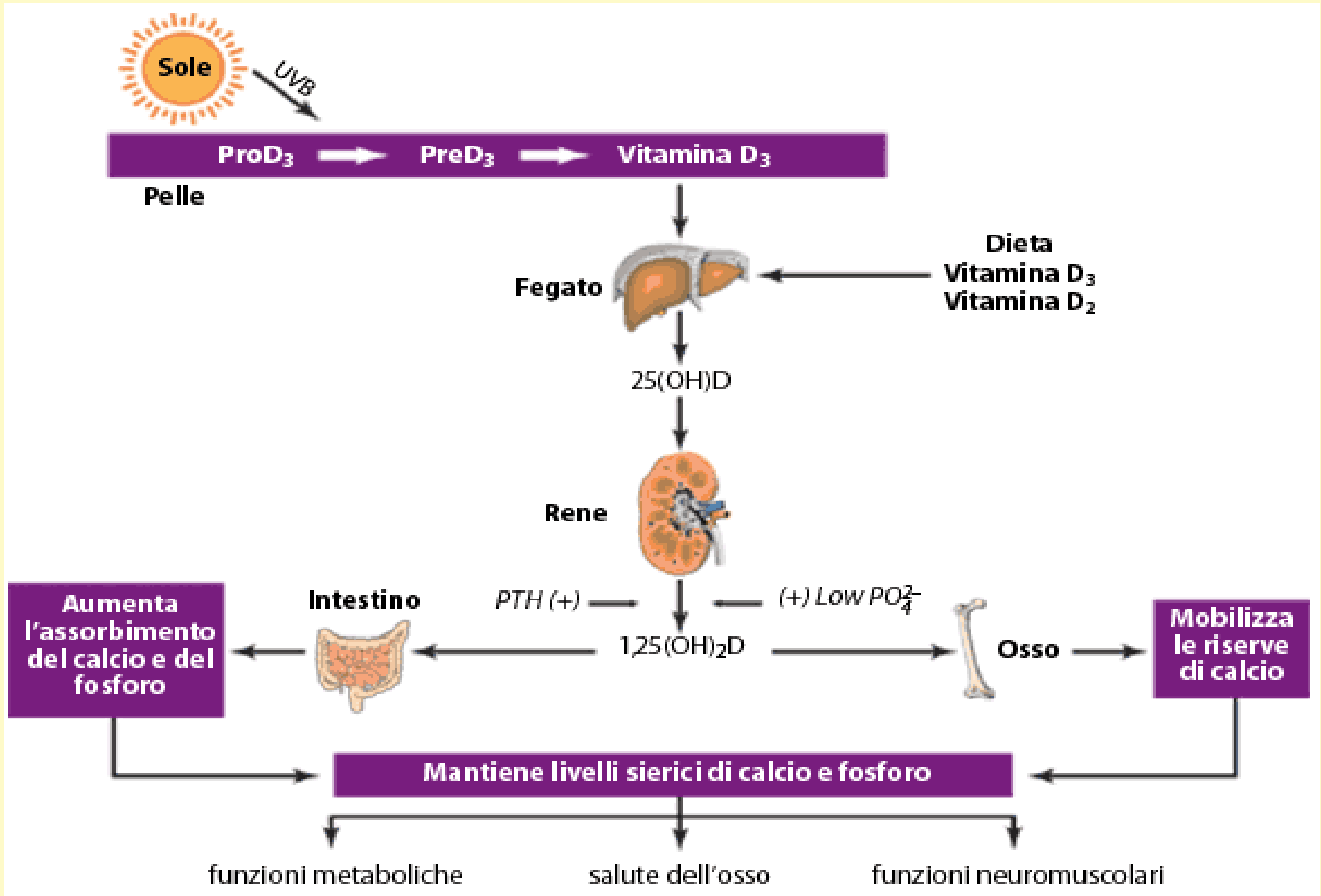
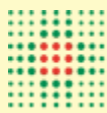


Parliamo di Vitamina D

Il Laboratorio:

andamento della prescrizione diagnostica







Vitamina D è un termine generale comunemente usato per identificare tutti i componenti di una grande famiglia (D1-D5) di proormoni liposolubili.

A seguito dell'esposizione alla luce solare, il 7-deidrocolesterolo, situato in profondità negli strati epidermici in fase di proliferazione attiva, subisce la segmentazione fotolitica dell'anello "B" dando luogo alla formazione di previtamina D3, che si trasforma nel suo isomero **vitamina D3**

(coleciferolo). La vitamina D3 e la vitamina **D2 (ergocalciferolo)**, metaboliti principali della famiglia, possono anche essere assunte tramite integratori alimentari o il consumo di determinati cibi. La vitamina D2 viene metabolizzata in modo simile alla vitamina D3. La vitamina D viene immagazzinata nel tessuto adiposo ed entra nel circolo ematico associata alla proteina di legame della vitamina D (VDBP) e all'albumina.

Nel fegato avviene una prima idrossilazione della vitamina D a 25(OH)D, che viene anch'essa messa in circolo associata alla VDBP.

Nei reni avviene l'ulteriore idrossilazione di una piccola parte di 25(OH)D (processo regolato in modo diretto dall'ormone paratiroideo e dai livelli di calcio ionizzato) **che genera l'ormone calcitropico biologicamente attivo 1,25-diidrossivitamina D.**

Il dosaggio della vitamina D come **indicatore dello status vitaminico** della persona è stato valutato sia come test di screening generale sia come elemento di studio in popolazioni selezionate.

Studi epidemiologici hanno rilevato bassi livelli di Vitamina D in popolazioni affette da malattie cardiovascolari, malattie cerebrovascolari, disturbi immunitari, metabolici e da alcuni tipi di tumore.

Tutto questo ha portato all'ipotesi che la carenza di Vit.D potesse avere un ruolo nello sviluppo di tali stati patologici e quindi alla speranza di potere ridurre il rischio mediante supplementazione di Vit.D.

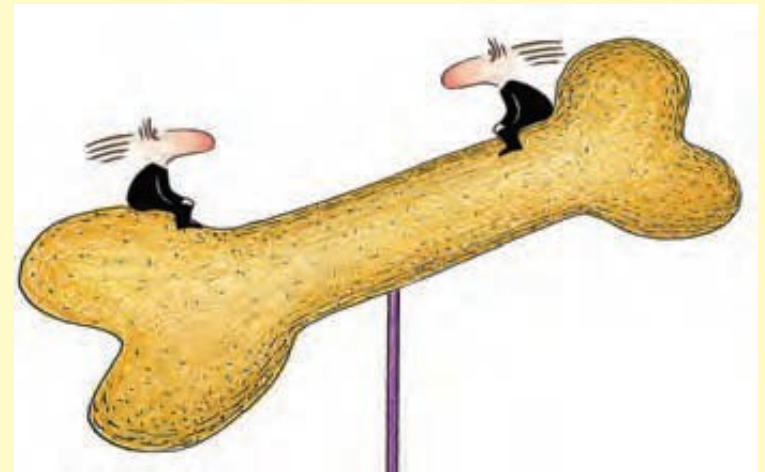
Il dosaggio della 25OHD è stato considerato come possibile test di screening.





Non esistono studi che abbiano valutato in modo appropriato l'efficacia di uno screening nella popolazione generale. Non esistono inoltre dati a favore del fatto che il riconoscimento precoce dell'ipovitaminosi e la sua correzione possano migliorare il senso di benessere e il rischio di frattura nella popolazione non istituzionalizzata.

Quindi



il dosaggio della Vit.D non dovrebbe essere considerato come test di screening.



Gli esperti dell'**Institute of Medicine** (IOM) americano, a seguito di una revisione sistematica hanno riscontrato per livelli di 16 ng/ml di 25OHD uno stato vitaminico adeguato (sufficienza) per almeno la metà della popolazione, ed hanno stabilito in **20 ng/ml** (50 nmol/l) il limite oltre il quale viene garantito l'assorbimento ottimale di calcio dall'intestino e il controllo dei livelli di paratormone nella quasi totalità del campione studiato.

Viene esplicitamente dichiarato che **livelli superiori a 20 ng/ml di Vit.D non conferiscono vantaggi clinici apprezzabili.**



Condizioni predisponenti alla carenza di Vitamina D

Difficoltà di assorbimento:

fibrosi cistica, celiachia, m. Whipple, m. Crohn, chirurgia bariatrica, etc).

Anomala disponibilità (sequestro):

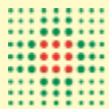
obesità.

Aumentato catabolismo associato a farmaci:

glucocorticoidi, immunosoppressori, anticonvulsivanti, anti-retrovirali.

Ridotta sintesi o elevate perdite:

insufficienza epatica grave, insufficienza renale avanzata, sindrome nefrosica, gravidanza, allattamento.



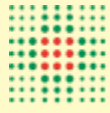
Quando dosare la vitamina D ?

SEMPRE in pazienti nei quali esista il fondato sospetto clinico di una carenza. Per esempio in caso di riscontro di incremento del paratormone oppure in presenza di sintomi neuromuscolari con astenia e mialgie gravi non responsive ai comuni analgesici.

TALVOLTA in persone asintomatiche in presenza di particolari condizioni predisponenti o qualora non siano soddisfatte le condizioni ideali di apporto alimentare e soprattutto di esposizione solare

MAI negli anziani residenti in strutture protette, dove gli studi mostrano una grave ipovitaminosi D nella quasi totalità dei casi. In questa popolazione il dosaggio della 25OHD non aggiunge dati decisionali ed è **sempre indicata una supplementazione** vitaminica

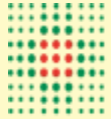
MAI nei pazienti in cura con agenti remineralizzanti in quanto la supplementazione è **comunque prevista** dagli usuali schemi terapeutici.



Quali sono i punti deboli del dosaggio della vitamina D ?

- **Analita difficile per la sua natura idrofobica**
- **esiste in diverse forme molecolari (D2, D3)**
- **è strettamente legata alla sua proteina di trasporto VDBP (separazione necessaria per poter effettuare il dosaggio della vitamina D).**
- **uno standard di riferimento o un metodo di riferimento.**
- **effetto matrice**

Il siero umano è una matrice complessa, ricca di lipidi di varia natura, e quando si mette a punto un dosaggio, i calibratori e gli standard sono costruiti artificialmente in modo simile al siero umano, ma non identico: il fatto che la vitamina D sia di natura lipofila la rende vulnerabile alla presenza di altri lipidi, e questo può provocare per le sostanze leganti che vengono utilizzate, delle differenze di associazione alla vitamina D rispetto a quello che succede nel siero o negli standard.



Come si può dosare la Vitamina D

Metodi indiretti:

Immunodosaggi manuali RIA

Immunodosaggi automatizzati

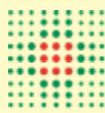
Misurano la vitamina D attraverso reazioni immunologiche, che non evidenziano la vitamina D direttamente ma attraverso degli indicatori di avvenuta reazione. (tracciante luminescente, fluorescente o enzimatico)

Metodi altamente standardizzati e automatizzati

Metodi diretti:

Spettrometria di massa tandem LC-MS/MS.

Evidenziano la sostanza in quanto tale



Contents lists available at ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinchim



Evaluation of automated immunoassays for 25(OH)-vitamin D determination in different critical populations before and after standardization of the assays



Etienne Cavalier^{a,*}, Pierre Lukas^a, Yannick Crine^a, Stéphanie Peeters^a, Agnès Carlisi^a, Caroline Le Goff^a, Romy Gadsisseur^a, Pierre Delanaye^b, Jean-Claude Souberbielle^c

^a Department of Clinical Chemistry, University of Liège, CHU Sart Tilman, Liège, Belgium

^b Nephrology/Dialysis and Hypertension, University of Liège, CHU Sart Tilman, Liège, Belgium

^c Laboratoire d'Explorations Fonctionnelles, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 December 2013

Received in revised form 15 January 2014

Accepted 15 January 2014

Available online 7 February 2014

Keywords:

Vitamin D

Standardization

Vitamin D-binding protein

Uremia

ABSTRACT

Introduction: Standardization of immunoassays for 25(OH)-vitamin D determination is a major problem in clinical practice. A worldwide standardization program has started to address this and will reduce the bias observed between immunoassays. We aimed to calibrate 5 immunoassays on a LC-MS/MS traceable to the SRM 2972 and the ID-LC-MS/MS 25(OH)D Reference Method Procedure to see if the re-standardization would be efficient in a population of 3rd trimester pregnant women (PW), hemodialysis (HD) and osteoporosis (OP) patient.

Material and methods: 184 serum samples (25(OH)D: 8.4–87 ng/ml) were selected to calibrate the immunoassays (Abbott-Architect, Roche-Elecsys, DiaSorin-Liaison, Siemens-Centaur and IDS-iSYS). Chromsystems MassChrom method was used as the referenced. Serum obtained in 34 PW, 25 HD and 34 OP patients were used as comparatives.

Results: After adjusting to LC-MS/MS, immunoassays had regression slopes nearly identical to 1.0 with intercepts < 0.5 ng/ml. However, in special populations, a systematic bias was still observed, except for iSYS.

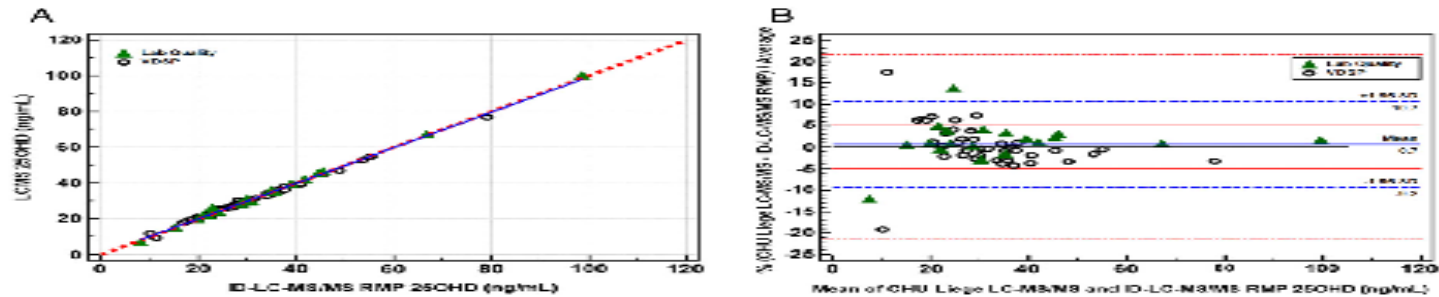
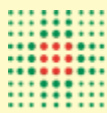


Fig. 1. Verification of the traceability and performance of the Chromasystems MassChrom LC-MS/MS method on ABSciex QTRAP 5500 system and the ID-LC-MS/MS Reference Method Procedure using single donor human serum panels. (▲) VDSP Phase I samples (n = 40); (■) Lab Quality samples (n = 20). A. Dering regression analysis of the sera panels. — Solid blue line indicates the mean regression line. - - - Broken red diagonal line represents the slope value of 1. B. Bias–Akman bias plot of the sera panels. — Solid blue line illustrates the mean bias. - - - Broken blue line represents $\pm 1.96 \times$ SD of the bias. — Solid red line indicates the $\pm 5\%$ bias limit for the VDSP standardization program. - - - Broken red line denotes the $\pm 21.5\%$ TE limit for the VDSP standardization program.

compare the results obtained in their patients with the cut-offs obtained in the observational or interventional studies that had been using this assay. The upraise of chromatographic methods has shown that the results obtained with the DiaSorin RIA were often lower than those

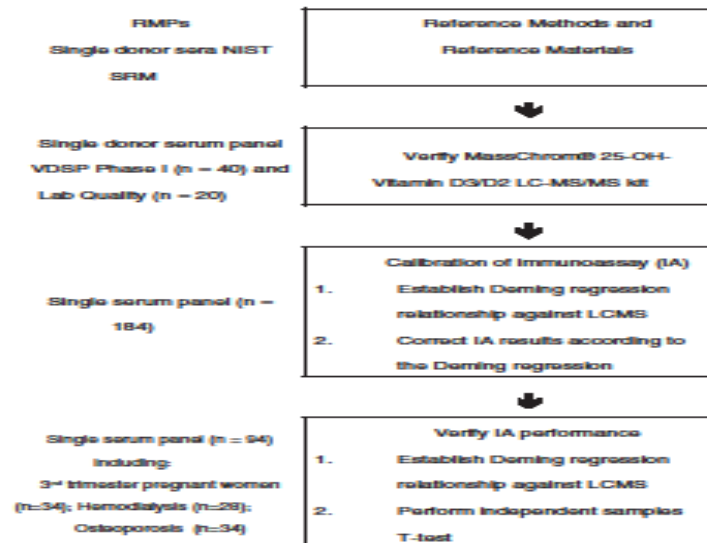


Fig. 2. Steps in the calibration and verification process.

obtained with chromatographic methods. These chromatographic methods were most often “home-brewed” methods and were calibrated against a curve obtained by gravimetric addition of known concentrations of 25(OH)D. Unfortunately, the results of these methods presented also a high variation, mainly due to extraction and calibration problems, and the results obtained by LC-MS/MS could not be transposable from one lab to the other. Different standards were then issued by the National Institute of Standards and Technology (NIST 972) and LC-MS/MS methods could thus be calibrated against this material. Unfortunately, due to different matrix problems, it was impossible for immunoassay manufacturers to use these standards to calibrate their assays. They thus chose to indirectly calibrate their tests on serum standards whose concentration had been established with a LC-MS/MS method traceable to the NIST 972 or to remain indirectly calibrated against the DiaSorin RIA. To overcome this problem, a worldwide standardization program, coordinated by the CDC, the NIST and the University of Ghent, is ongoing: 40 serum samples obtained in apparently healthy single donors and containing 25(OH)D amounts determined with a LC-MS/MS method accepted now as the only reference method for 25(OH)D determination are distributed to laboratories and manufacturers and are expected to allow an unambiguous calibration of the commercially available or the “home-brewed” methods, as well as all the immunoassays [8]. This ambitious analytical program will certainly reduce the variation observed between the methods and the laboratories in healthy individuals. In this work, we aimed to compare the results obtained between a commercially available, CE-marked and NIST 972 traceable LC-MS/MS method with the vast majority of the automated immunoassays present on the market in a population of apparently healthy individuals, 3rd trimester pregnant women, hemodialyzed and osteoporotic patients. From the comparison data, we aimed to see if the re-standardization of the immunoassays on the LC-MS/MS would be efficient in these special populations.

2. Materials and methods

2.1. Samples

2.1.1. Calibration samples

A total of 184 serum samples, from routine 25(OH)-vitamin D blood test requests with circulating level of 25-hydroxyvitamin D ranging

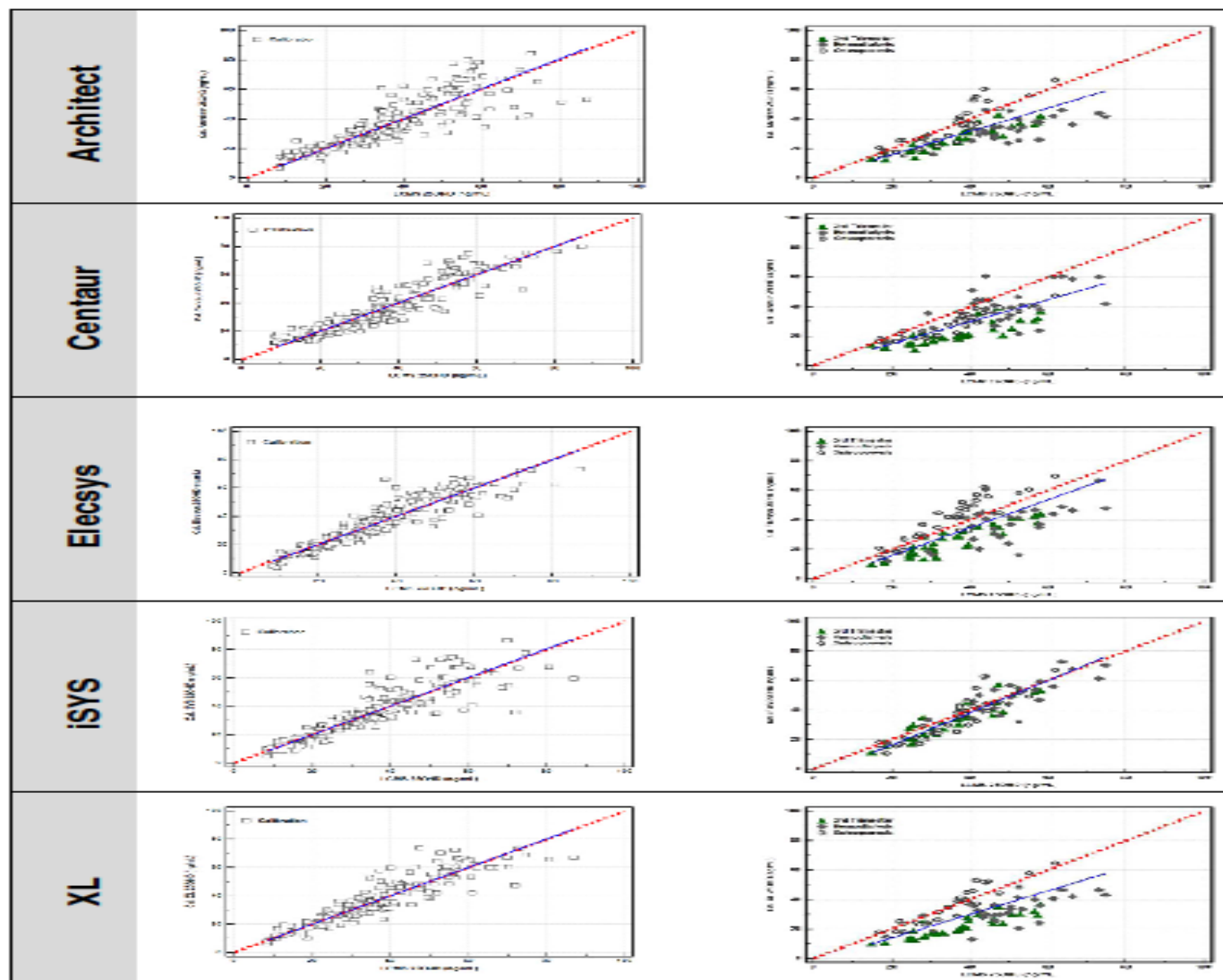
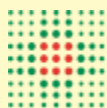
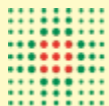


Fig. 3. Comparison of the ZSOD results between the traceable LC-MS/MS method and frequently used in routine automated immunoassays after calibration. A. Deming regression analysis for the calibration samples panel (n = 184). B. Deming regression analysis for the samples of clinically defined cohorts (▲ 3rd trimester pregnant women (n = 34); ○ hemodialysis (n = 28); ◆ osteoporosis (n = 34)). — Broken red diagonal line represents the slope value of 1. — Solid blue line indicates the regression line.





Laboratorio Unico Metropolitano: Dosaggio di 25OHD

- **IDS-iSYS 25 VitDS** per la determinazione quantitativa della 25-idrossivitamina D [(25(OH)D] totale nel siero o nel plasma umano mediante l'impiego dell'analizzatore **IDS-iSYS Multi-Discipline Automated System**
- **Chemiluminescenza.**

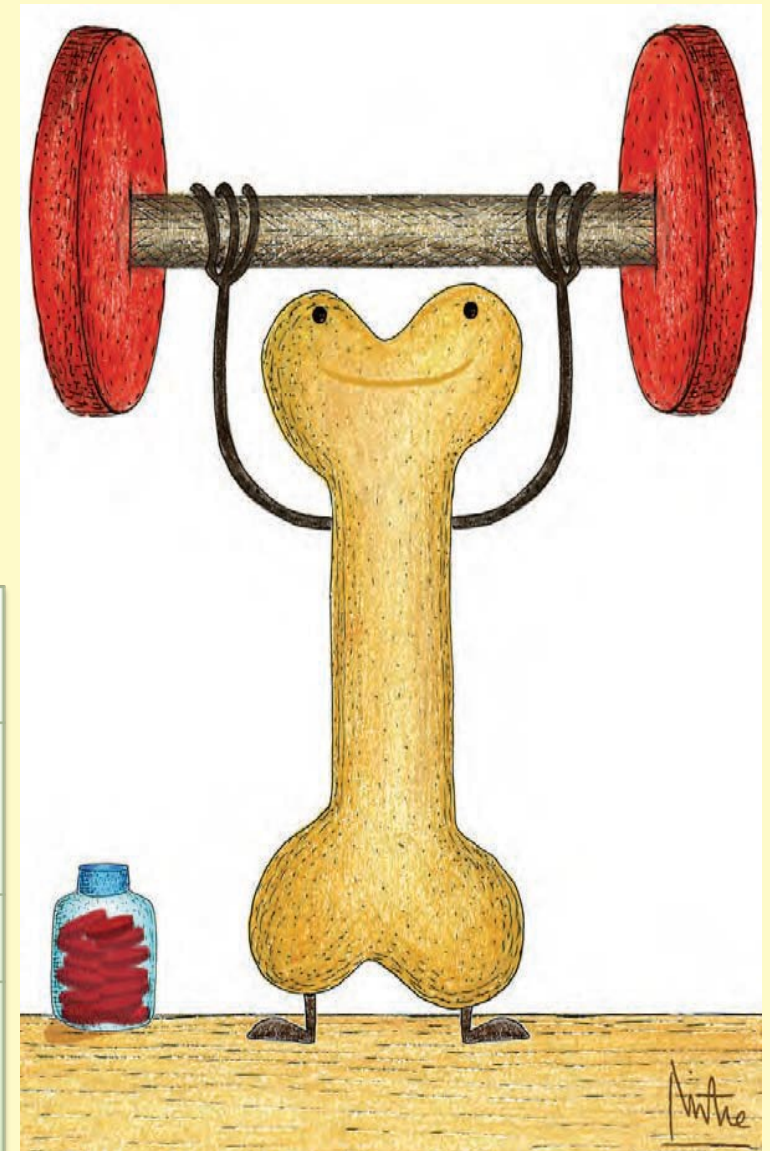
Il range refertabile del dosaggio è **4–110 ng/mL** (10–275 nmol/L).
Sensibilità del metodo < 4ng/ml

Il dosaggio **IDS-iSYS 25 VitDS** è riferibile alla **Isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry (ID-LCMS/MS) 25(OH)D Reference Method Procedure (RMP)** che è stata impiegata per assegnare il valore atteso dei campioni del Vitamin D Standardisation Program (VDSP).
L'ID-LCMS/MS RMP è riferibile al National Institute of Standards and Technology Standard Reference Material (NIST SRM) 297225,26.

Valori di riferimento

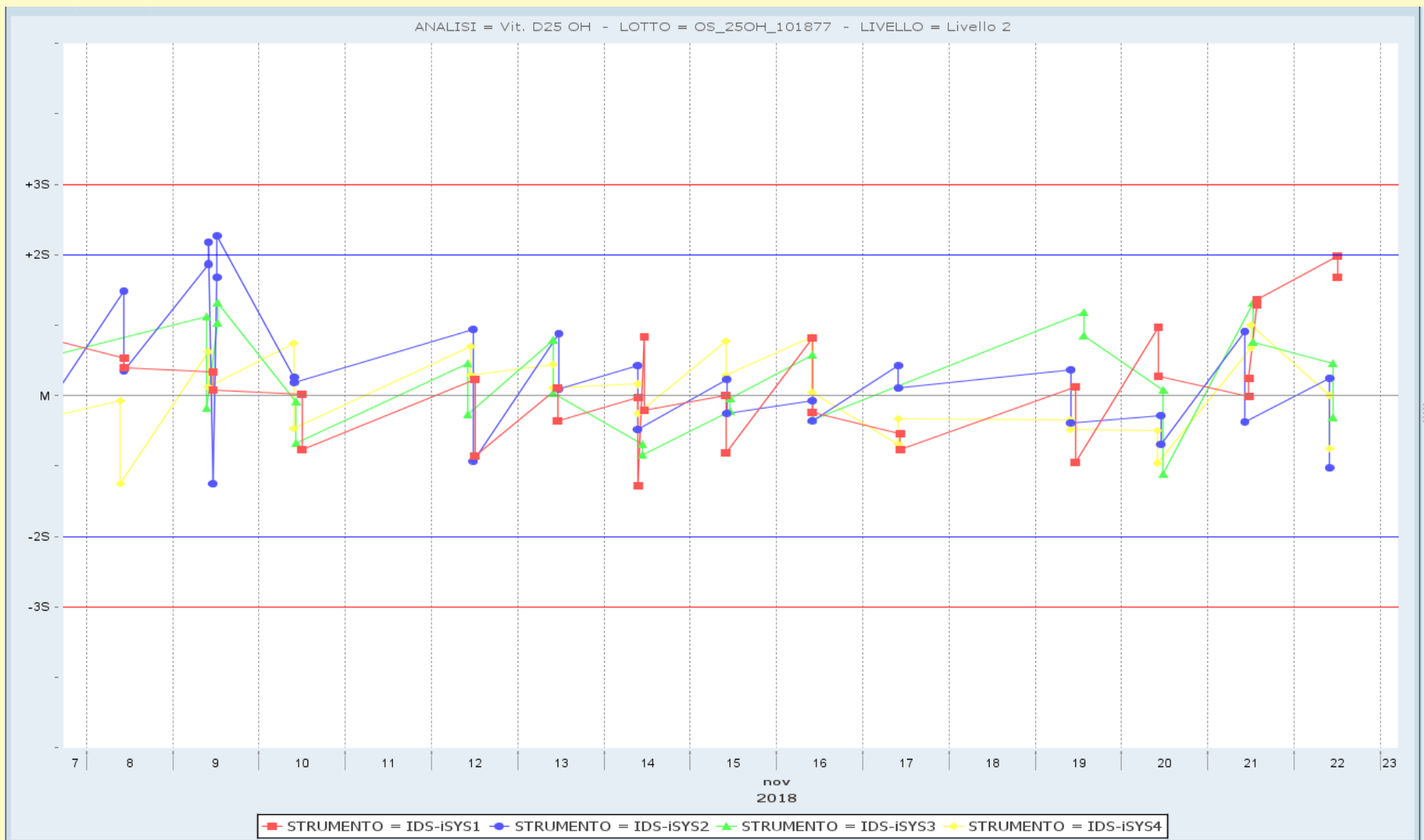
25(OH)D è il principale metabolita circolante della Vitamina D e la sua concentrazione sierica è l'indice biochimico più attendibile dello stato di deplezione vitaminica

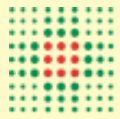
| | | |
|--|-------------------------------------|---------|
| | 25(OH)D | |
| | 20 - 100 ng/ml (75 - 250 nmol/l) | Normale |
| | < 20 ng/ml (<50 nmol/l) | Carenza |



IDS ISYS 1, 2, 3, 4
VIT D25-OH Livello 1

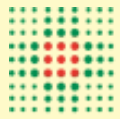
Controlli di qualità





Controlli di qualità





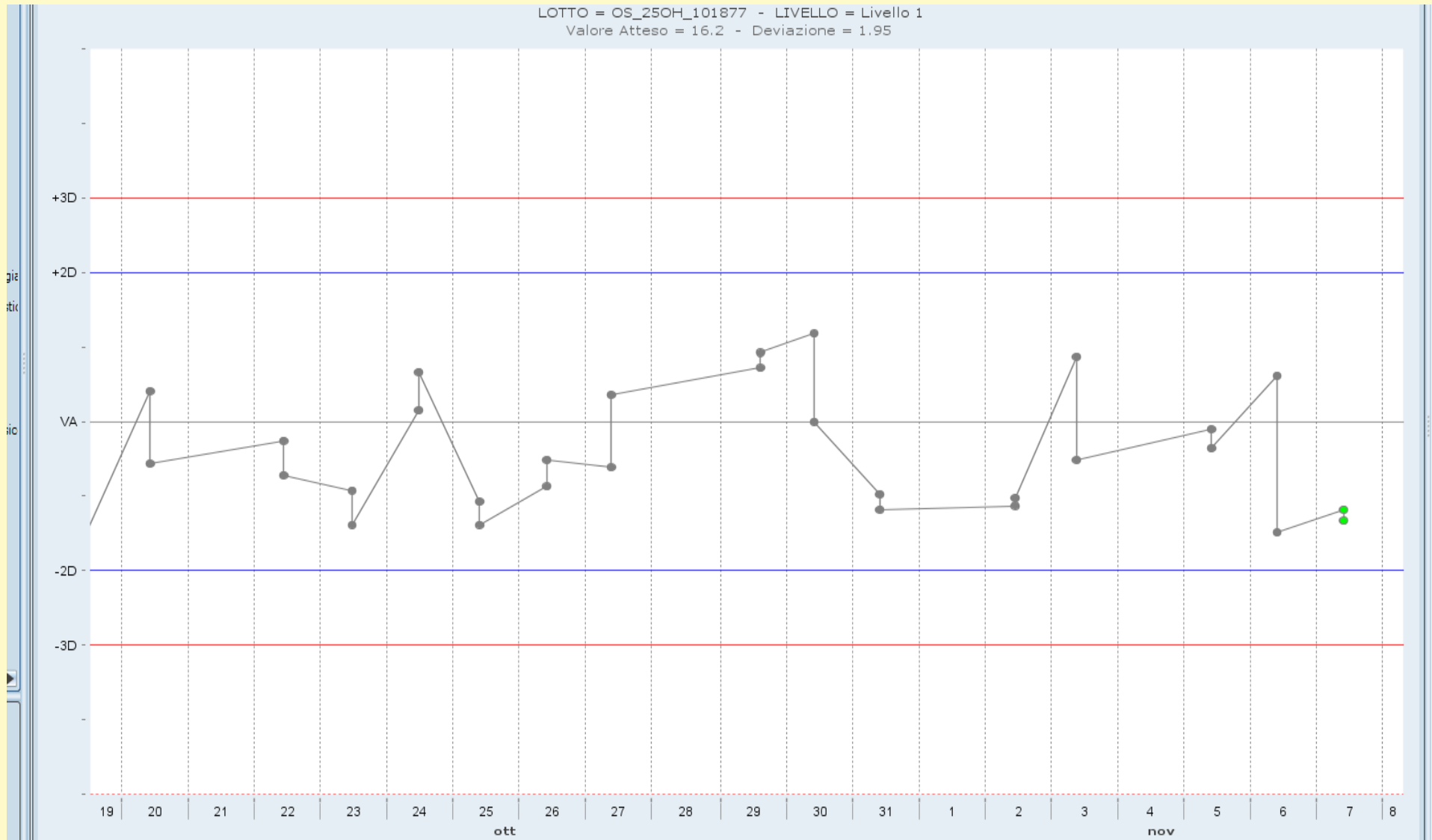
IDS ISYS 1

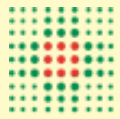
VIT D25-OH Livello 1

Valore atteso: 16.2 ng/ml

DS 1.5 CV 9.9

Controlli di qualità





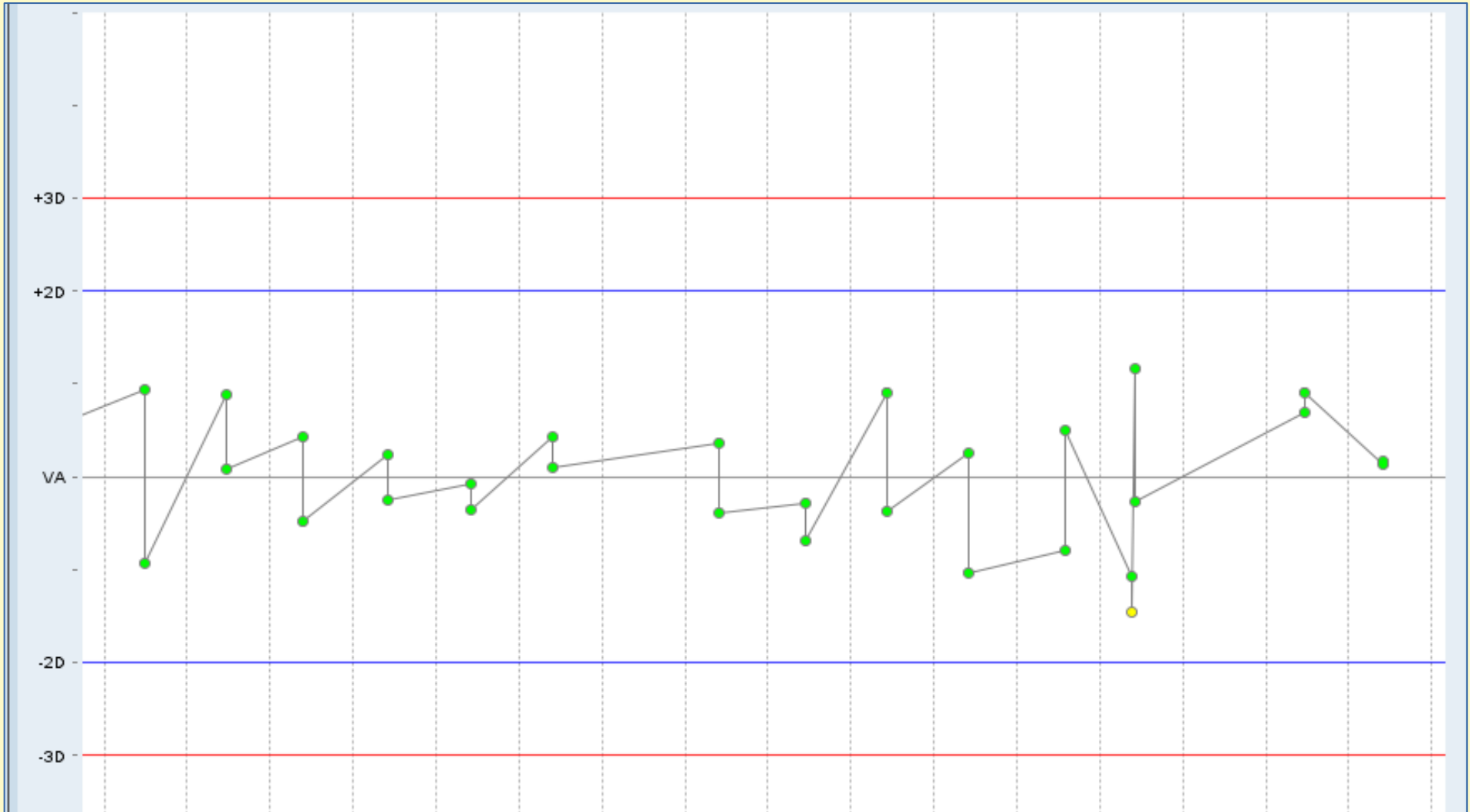
IDS ISYS 2

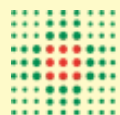
VIT D25-OH Livello 2

Valore atteso: 67.8 ng/ml

DS 5.3 CV 8.2

Controlli di qualità





Controlli di qualità

Strumento: **BO-ISYS-3**

Strumento: **IDS-iSYS3**

Esame: **Vit. D25 OH**

| Materiale di Controllo | | Range Accettabilità | Ris Totali | Ris Considerati | Min | Max | M | DS | CV | [M-2DS / M+2DS] |
|------------------------|-----------|---------------------|------------|-----------------|------|------|------|-----|------|-------------------|
| OS_25OH_101500 | Livello 1 | [13.3 / 21.7] | 144 | 127 | 13.4 | 21.6 | 18.3 | 1.8 | 9.7% | [14.7 / 21.9] |
| OS_25OH_101500 | Livello 2 | [51.6 / 77.6] | 147 | 128 | 54.4 | 76.4 | 66.0 | 5.0 | 7.6% | [56.0 / 76.0] |
| OS_25OH_101639 | Livello 1 | [12.1 / 19.7] | 169 | 161 | 12.5 | 19.6 | 16.6 | 1.4 | 8.5% | [13.8 / 19.4] |
| OS_25OH_101639 | Livello 2 | [58.4 / 87.6] | 168 | 163 | 59.3 | 83.4 | 69.3 | 4.7 | 6.8% | [59.9 / 78.7] |
| OS_25OH_101842 | Livello 1 | [12.5 / 20.3] | 30 | 29 | 15.0 | 19.6 | 16.9 | 1.1 | 6.8% | [14.7 / 19.1] |
| OS_25OH_101842 | Livello 2 | [55.0 / 82.6] | 33 | 31 | 55.9 | 77.1 | 67.2 | 4.6 | 6.9% | [58.0 / 76.4] |
| OS_25OH_101877 | Livello 1 | [12.3 / 20.1] | 197 | 188 | 12.4 | 19.8 | 15.6 | 1.5 | 9.9% | [12.6 / 18.6] |
| OS_25OH_101877 | Livello 2 | [54.3 / 81.5] | 197 | 188 | 55.7 | 81.2 | 64.3 | 5.3 | 8.2% | [53.7 / 74.9] |

Veq

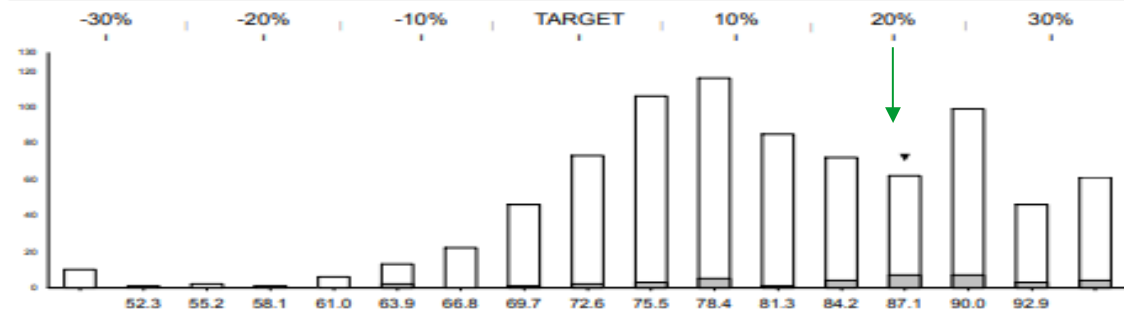
25 Hydroxyvitamin D

July 2018

Laboratory

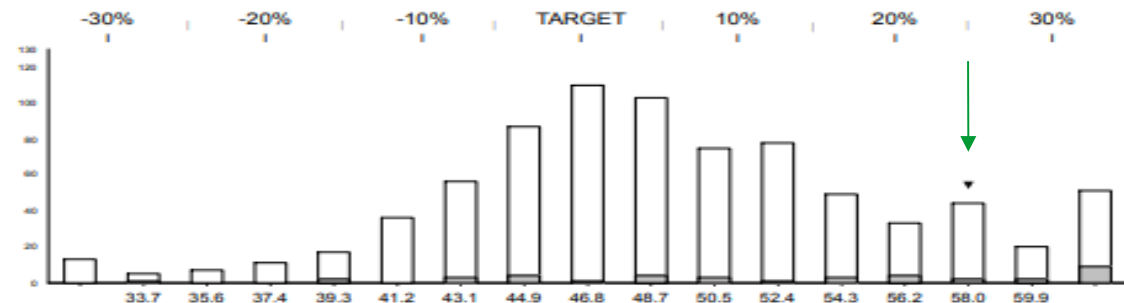
1011

Histograms



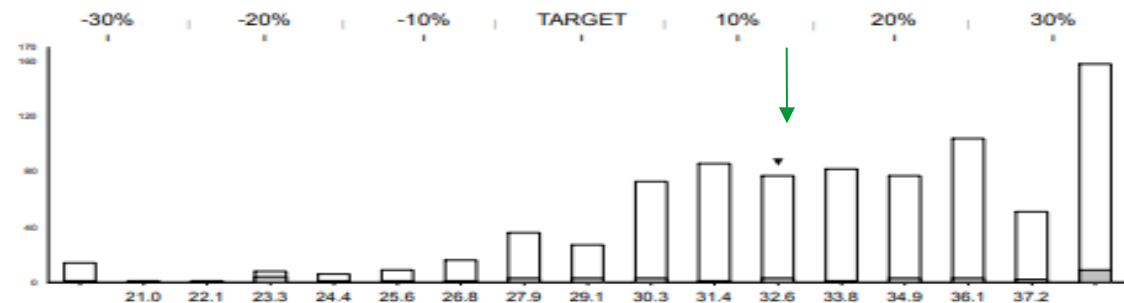
Sample: 536 (n=775)
 Target Value : 72.6 nmol/L
 ALTМ 80.6 nmol/L
 Your Method Mean (MM) : 84.7 nmol/L
 Your result : ▼ 87.5 nmol/L
 Bias from Target Value : 20.5 %
 Bias from ALTМ : 8.5 %
 Bias from MM: 3.3 %

□ All Methods
 ■ Your method (IDS-iSYS)



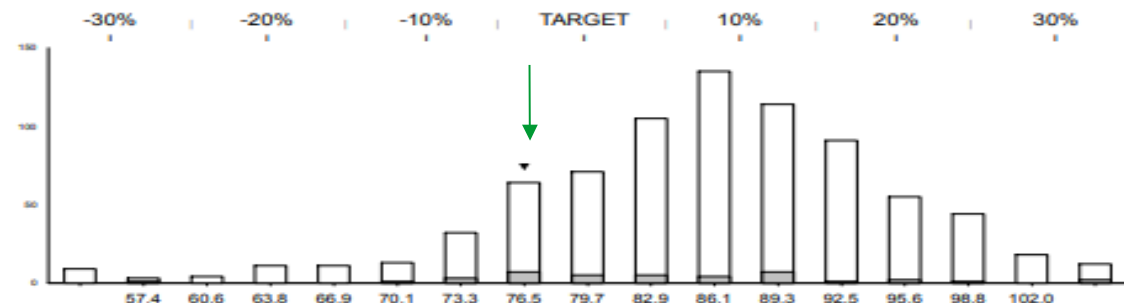
Sample: 537 (n=775)
 Target Value : 46.8 nmol/L
 ALTМ 49.1 nmol/L
 Your Method Mean (MM) : 53.1 nmol/L
 Your result : ▼ 57.5 nmol/L
 Bias from Target Value : 22.9 %
 Bias from ALTМ : 17.1 %
 Bias from MM: 8.3 %

□ All Methods
 ■ Your method (IDS-iSYS)



Sample: 538 (n=775)
 Target Value : 29.1 nmol/L
 ALTМ 34.0 nmol/L
 Your Method Mean (MM) : 32.7 nmol/L
 Your result : ▼ 32.5 nmol/L
 Bias from Target Value : 11.7 %
 Bias from ALTМ : -4.4 %
 Bias from MM: -0.5 %

□ All Methods
 ■ Your method (IDS-iSYS)



Sample: 539 (n=774)
 Target Value : 79.7 nmol/L
 ALTМ 85.6 nmol/L
 Your Method Mean (MM) : 83.6 nmol/L
 Your result : ▼ 75.0 nmol/L
 Bias from Target Value : -5.9 %
 Bias from ALTМ : -12.4 %
 Bias from MM: -10.3 %

□ All Methods
 ■ Your method (IDS-iSYS)



CQI

L'avvicinamento e/o il raggiungimento e il mantenimento degli obiettivi di imprecisione analitica devono essere monitorati mediante il coefficiente di variazione (CV) calcolato sui risultati di almeno sei mesi di un programma di controllo di qualità interno, che impieghi un materiale di controllo su più livelli, e lotti di materiale della durata non inferiore ad un anno.

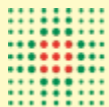
VEQ

valutazione esterna della qualità analitica, **fornisce una valutazione a posteriori dell'attendibilità analitica**, e deriva l'informazione di controllo dai materiali di controllo. La VEQ, attraverso la misura della capacità dei laboratori di fornire, su uno stesso materiale di controllo, uguali risultati, consente di verificare fino a che punto è stato raggiunto l'obiettivo primario della chimica clinica: **ottenere, per un dato paziente lo stesso risultato in tutti i laboratori.**



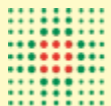
Facciamo i conti coi nostri numeri: **Vitamina D** **la statistica del LUM**





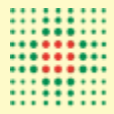
Statistica a confronto

| D25 OH | Dai 120000/130000 test anno 600 test die | |
|---------------------------|---|-----------------------------|
| | 2017 1° semestre | 2018 1° semestre |
| Totali | 55970 | 64365 |
| Punti prelievo Bologna | 39138 | 43658 |
| Punti prelievo Imola | 5206 | 6890 |
| OM interni | 5507 | 5890 |
| AOSP interni | 6119 | 7927 |



Statistica a confronto

| 1° quadrimestre 2017 | 34755 pazienti | 1° quadrimestre 2018 | 36818 pazienti |
|----------------------------|---|----------------------------|---|
| | 1 pz ha ripetuto 11 volte | | |
| | 1 pz 7 volte | | |
| | 2 pz 5 volte | | 1 pz 5 volte |
| | 6 pz 4 volte | | 10 pz 4 volte |
| | 45 pz 3 volte | | 77 pz 3 volte |
| | 757 pz 2 volte | | 1033 pz 2 volte |
| | 284 con valore < 20 ng/ml | | 431 con valore < 20 ng/ml |



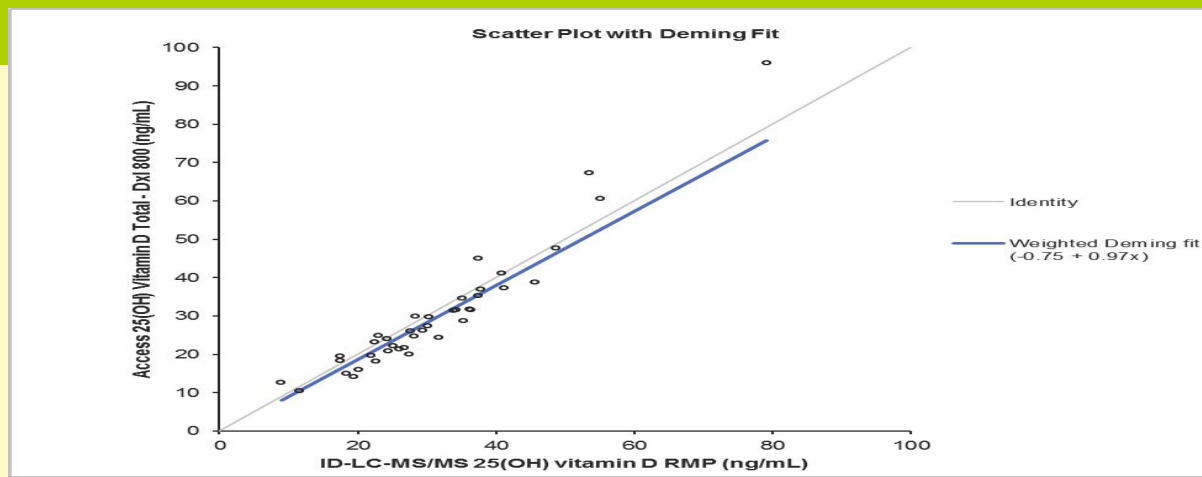
| 01/01/2018-10/09/2018 9 mesi | < 20 ng/ml | > 20 ng/ml |
|---------------------------------|--------------|--------------|
| Età < 50 anni | 19780 | 44240 |
| Età > 50 anni | 8819 | 16185 |

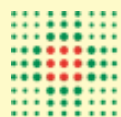
Caratteristica delle prestazioni

Confronto tra 144 campioni di siero valutati con il dosaggio **Access 25(OH) Vitamin D Total** su **UniCel DxI 800 Immunoassay System** e una metodica comprendente **cromatografia in liquido associata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS)** ha fornito i risultati seguenti (regressione Passing-Bablok e correlazione Pearson):

| n° | Pendenza (95% IC) | Coef. correlazione | Unità | ng/ml | Unità | nmoli/L |
|-----|---------------------|--------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|
| | | | Range di osservazione | Intercetta (95% IC) | Range di osservazione | Intercetta (95% IC) |
| 144 | 0.95 (0.88-1.03) | 0.91 | 5.31-147.71 | -0.89 | 13.27-369.28 | -2.23 |

linearità metodo 2 – 210 ng/ml





SERVIZIO SANITARIO REGIONALE
EMILIA-ROMAGNA
Azienda Unità Sanitaria Locale di Bologna

Istituto delle Scienze Neurologiche
Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico

LUM

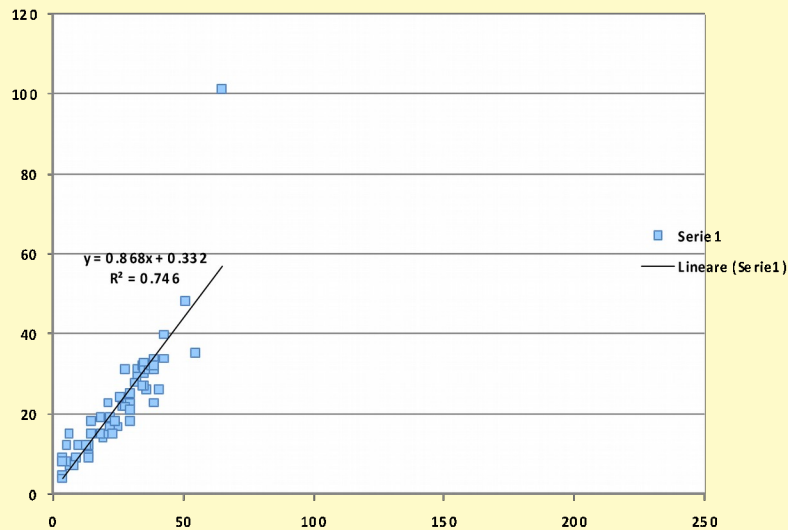
La nostra esperienza



Confronto preliminare tra metodi

grafico di correlazione

Access
25(OH)
Vitamin D
Beckman



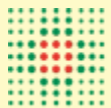
r

0.863860846

70 campioni analizzati in entrambe le strumentazioni
Valutazioni dei risultati

Vantaggi in termini di:

- molteplicità delle provette
- personale
- tempi di esecuzione



Parliamo di Vitamina D

**Il Laboratorio:
andamento della prescrizione diagnostica**

GRAZIE PER L'ATTENZIONE