

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Plazma 25-OH Vitamin D Ölçümünde HPLC, CMIA ve ECLIA Yöntemlerinin Karşılaştırılması *

Yunus Emre USTAALİOĞLU, Melahat DİRİCAN

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı; plazma 25-OH vitamin D ölçümünde kullanılan HPLC yöntemi ile kemilüminesans yöntemler olan elektrokemilüminesans immunoassay (ECLIA) ve kemilüminesans mikropartikül immunoassay (CMIA) yöntemlerinin karşılaştırılmasıdır. Yöntem karşılaştırması için, 121 hastadan kan örnekleri alındı ve 25-OH vitamin D düzeyleri 3 yöntemle ölçülerek değerlendirildi. HPLC ile elde edilen değerlerin diğer iki yöntemle göre daha yüksek olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak yalnızca ECLIA ile anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p=0.011$). Lineer regresyon analizi ile üç yöntem karşılaştırıldığında en yüksek korelasyon HPLC ile ECLIA metotları arasında ($r = 0.869$) saptandı. CMIA ve ECLIA metotları arasında korelasyon orta düzeyde ($r = 0.818$) ve HPLC ve CMIA metotları arasında ise daha düşük ($r = 0.779$) olarak bulundu. Sonuç olarak HPLC metodunda ölçülen değerlerin daha yüksek olmasına rağmen, üç yöntemin de birbiriyle yüksek korelasyon ve iyi bir uyum göstermesi nedeniyle, otomatize sistemlerde kullanılabilen kemilüminesans yöntemlerin tercih edilmesi avantajlı görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: 25-OH vitamin D. HPLC. CMIA. ECLIA.

Comparison of HPLC, CMIA and ECLIA Methods for Measurement of Plasma 25-OH Vitamin D

ABSTRACT

The aim of the study is to compare two automated chemiluminescent immunassays [Chemiluminescence immunoassay (CMIA) and electrochemiluminescent immunoassay (ECLIA)] with the high performance liquid chromatography (HPLC) for quantification of plasma 25-OH vitamin D. Blood samples from 121 consecutive patients were collected and analyzed for the method comparison. Mean 25-OH vitamin D levels obtained by the HPLC method were found to be higher than the other two methods. However, statistically significant difference was found only with ECLIA ($p=0.011$). The three methods were compared by linear regression and the highest correlation was found for HPLC and ECLIA ($r = 0.869$), intermediate for CMIA-ECLIA ($r = 0.818$) and lowest for HPLC-CMIA ($r = 0.779$). As a result, the higher 25-OH vitamin D values were obtained with HPLC method, but the three methods showed good correlation and agreed well with each other. So that preferring the chemiluminescence methods which can be used in automated systems, seems to be advantageous.

Key Words: 25-OH vitamin D. HPLC. CMIA. ECLIA.

D vitamini dört halkadan oluşan bir sterol türevi olup, kemik-mineral metabolizmasında rol alan hormon özellikli yağda çözünen bir vitamindir. İki önemli formda bulunmaktadır. Diyet ile alınan bitkisel kökenli ergosterolden türeyen ergokalsiferol (D2 vitamini, 25-OH D2) olup, diğer form ise hayvansal kökenli olan ve 7-dehidrokolesterolden türeyen kolekalsiferol-

dür (D3 vitamini, 25-OH D3). İnsan vücudunda sadece D3 vitamini sentezlenmektedir. Kolekalsiferol 290-310 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınlarının etkisiyle deride 7- dehidrokolesterolden sentezlenir ve bu endojen üretim D vitamininin temel kaynağıdır.^{1,2}

Deride sentezlenen D3 vitamini ve diyetle alınan D2 ve D3 vitaminleri, D vitamini bağlayıcı proteine bağlanarak karaciğere taşınır. Karaciğere geldikten sonra D2 ve D3 vitaminlerinin metabolizmaları aynıdır. 25-hidroksilaz enzimi ile 25-OH D2 veya 25-OH D3'e dönüşürler. Karaciğerde oluşan D vitamini, D vitamini bağlayıcı proteine bağlanarak böbreğe gelir ve 1- α hidroksilaz enzimi ile ikinci kez hidroksilasyona uğrayarak 1,25-(OH)₂ vitamin D (kalsitriol)'ye dönüşür.³

Serum/plazma 25-OH vitamin D düzeyi, vücudun D vitamini havuzu hakkında en iyi bilgi veren parametredir. Normal serum konsantrasyonu 8-80 $\mu\text{g/L}$ (20-200 nmol/L) arasında değişir. Serumdaki yarı ömrü 2-3 haftadır.⁴

* XII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi'nde (12-15 Nisan 2012, Marmaris/Muğla) bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi: 13 Nisan 2015
Kabul Tarihi: 02 Haziran 2015

Dr. Yunus Emre USTAALİOĞLU
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı,
Bursa.
Tel: 0224 2953915
e-Posta: yunus@uludag.edu.tr

D vitamininin biyolojik olarak en aktif formu kalsitrioldür. Ancak vitamin D düzeyinin ölçümü için ideal bir parametre değildir. Bunun birkaç nedeni vardır: 1,25-(OH)₂ vitamin D'nin yarı ömrü sadece 4-6 saattir ve plazmadaki düzeyi 40-60 pg/ml (16-65 pmol/L) olup 25-OH vitamin D'den yaklaşık olarak 1000 kat daha düşüktür. Ayrıca düşük D vitamini durumlarında bile parathormon etkisiyle kısa zaman içinde kalsitriol düzeyleri artarak normal seviyelere ulaşır ve plazmada düşük olarak saptanmamış olur.⁵

Son yıllarda D vitamini ile ilgili yapılan çalışmalar hızlı bir şekilde artmaktadır. Özellikle D vitamini düzeyindeki azalma, giderek artan sayıda hastalıkla ilişkilendirilmektedir.⁶

Ciddi D vitamini eksikliğinin uzun yıllardır çocuklarda rikets ve erişkinlerde osteomalazi ile ilişkili olduğu bilinmektedir.^{7,8} 25-OH vitamin D plazma konsantrasyonlarının 15-20 µg/L'den düşük olması sekonder hiperparatiroidizme yol açarak, uzun vadede kemik kütlelerinde azalmaya yol açar.⁹ Serum 25-OH vitamin D konsantrasyonu 30 µg/L'den düşük olması intestinal kalsiyum emilimini azaltmaktadır.¹⁰ D vitamini eksikliği özellikle bozulmuş hücre içi kalsiyum metabolizması oluşturarak kas güçsüzlüğüne neden olur.^{11,12} Düşük plazma 25-OH vitamin D konsantrasyonları, konjestif kalp yetmezliği ciddiyetinin bir belirtisi olan NT-proANP'nin yüksek serum konsantrasyonlarıyla ilişkili bulunmuştur.¹³ Bunlara ek olarak, D vitamini düşüklüğünün prostat, meme ve kolon kanseri gibi malignitelerle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.¹⁴⁻¹⁶

D vitamini durumunun en iyi göstergesi olan plazma/serum 25-OH vitamin D ölçümü, birçok hastalığın tanı ve tedavisinde önemli hale gelmiştir. Bu nedenle plazma 25-OH vitamin D'nin doğru olarak ölçülmesi oldukça önemlidir.¹⁷

Tandem kütle spektrofotometri (LC-MS/MS), yüksek verimli sıvı kromatografisi (HPLC), radyoimmunoassay (RIA) ve kemiluminesans yöntemler gibi çeşitli yöntemler D vitamini ölçümünde kullanılmaktadır. Serum D vitamini düzeyinin ölçümünde LC-MS/MS yöntemi altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir.¹⁸

Serum D vitamini ölçümünde, 1980'lerden itibaren kullanılmaya başlanan HPLC yöntemi laboratuvarlarda halen sıklıkla tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu yöntemde interferans veren metabolitler (26,23-lakton, 24,25(OH)₂ D₃, 25,26(OH)₂ D₃, 1α,25(OH)₂ D₃ gibi) uzaklaştırılıp, UV absorpsiyon yolu ile ölçüm yapılmaktadır. Ancak cihazın komplike olması ve kullanımı için deneyim gerektirmesi önemli dezavantajlarıdır.¹⁹

Ayrıca son yıllarda kemiluminesans yöntemler de D vitamini ölçümünde kullanılmaya başlanmıştır. Kemiluminesans yöntemlerin en önemli avantajı otomatize sistemlerde kullanılabilmeleridir.²⁰

Bu çalışmada plazma 25-OH vitamin D ölçümünde kullanılan HPLC yöntemi ile kemiluminesans yöntemler olan elektrokemiluminesans immunoassay (ECLIA) ve kemiluminesans mikropartikül immunoassay (CMIA) yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Olgular

Olgular Uludağ Üniversitesi Sağlık Kuruluşları polikliniklerine başvuran ve laboratuvarından 25-OH vitamin D istemi olan hastalardan seçildi. Çalışmaya 92 kadın 29 erkek olmak üzere toplam 121 kişi dahil edildi. Çalışmaya katılanların yaşları 3 - 88 arasındaydı. Kadın gönüllülerin yaş ortalaması 50 ± 19.9 yıl, erkek gönüllülerin ise 49 ± 15.7 yıl olarak bulundu.

Çalışma için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun onayı alındı. Ayrıca tüm gönüllülere onam formu imzalatıldı.

Biyokimyasal Analiz

Biyokimya Merkez Laboratuvarı'na Mayıs 2011 tarihinde 25-OH vitamin D ölçümü için başvuran hastalardan, 10-12 saatlik açlık sonrasında sabah 08.30 - 09.00 arası oturur pozisyonda antekübital venden EDTA içeren tüplere (BD Vacutainer, Plymouth/ABD) kan örnekleri alındı. Numuneler alüminyum folyo ile sarılarak ışıktan korundu. Kan örnekleri 1500 g'de 5 dk. santrifüj edildi ve plazmaları ayrıldı. Santrifüj sonrası bekletilmeden HPLC yöntemiyle çalışılan numuneler, bir gün +4 °C'de bekletilerek ECLIA ve CMIA yöntemleri ile çalışıldı.

HPLC ile Analiz

25-OH vitamin D₃ ölçümü, Vitamin D₃ ClinRep HPLC kiti (Recipe Chemicals Instruments, Münih/Almanya) kullanılarak, HPLC cihazında (Thermo-Finnigan, ABD) gerçekleştirildi. Analiz için gereken plazma miktarı 50 µl'dir. Mobil faz akış hızı 1.0-1.2 ml/dk, çalışma süresi 11 dk, kolon sıcaklığı 35°C, uv dedektörle (264 nm) internal kalibrasyon kullanılarak çalışıldı. Alıkonma süreleri (retention times) 25-OH vitamin D₃ için 6.26 dk, 25-OH vitamin D₂ için 7.11 dk, internal standart için 8.11 dk'dır.

CMIA ile Analiz

25-OH vitamin D testi, Architect 25-OH vitamin D kiti ile Architect i2000 cihazında (Abbott Diagnostics, Illinois/ABD) CMIA yöntemi ile çalışıldı. Bu yöntemde ön hazırlık reaktif (trietanolamin metanol ve 8-anilin-1 naftalen sülfonik asit) ile plazma örnekleri (10 µl) inkübe edilir. Ön işlem uygulanmış örnek, paramanyetik antivitamin D kaplı mikropartikülle reaksiyona sokulur. Örnekte mevcut vitamin D, antivitamin D kaplı mikropartiküllere tutunur. İnkübasyondan

Plazma 25-OH Vitamin D Ölçümü

sonra reaksiyon ortamına biyotinlenmiş vitamin D ve anti-biyotin akrinyum işaretli konjugat bileşeni eklenir ve bunlar antivitamin D kaplı mikropartiküllerin boş bağlanma bölgelerine tutunur. Yıkama işleminden sonra pretrigger (%1.32 hidrojen peroksit) ve trigger (0.35 N NaOH) çözeltileri reaksiyon karışımına ilave edilerek kemiluminesans ölçülür. Toplam deney süresi 28 dk'dır.

ECLIA ile Analiz

25-OH vitamin D ölçümü, Cobas Vitamin D total kiti ile Cobas e 411 cihazında (Roche Diagnostics, Mannheim/Almanya) ECLIA yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemde numunedeki (15 µl) D vitamini bağlayıcı proteinden ayrılması için ön hazırlık reaktifi (dithiothreitol 1 g/L ve sodyum hidroksit 55 g/L) ile ön işlem uygulanır. İkinci aşamada ön işlem uygulanan numune, rutenyum işaretli vitamin D bağlayıcı protein ile kompleks oluşturur. Üçüncü inkübasyonda ortama streptavidin kaplı mikropartiküller ve biyotin ile işaretli D vitamini eklenir. İlk aşamada bağlanmamış olarak kalan rutenyum işaretli vitamin D bağlayıcı protein ile biyotin işaretli D vitamini kompleks oluşturur ve bu kompleks biyotin-streptavidin etkileşimi ile mikropartiküle bağlanır. Daha sonra mikropartiküller manyetik alanda yakalanırlar. Böylece bağlanmayan kısım uzaklaştırılmış olur. Kemiluminesan emisyon oluşturmak için elektroda voltaj uygulanır ve oluşan emisyon ölçülür. Deney süresi toplam 27 dk'dır.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 20.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile incelendi. 3 grup arasında plazma 25-OH vitamin D değişkeni açısından istatistiksel olarak karşılaştırma, normal dağılım göstermeyen veriler için 2'den fazla grup olduğunda Kruskal Wallis, 2 grup için Mann-Whitney U; normal dağılım gösteren veriler için tek yönlü varyans analizi ve anlamlı bulunan değişkenler için çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni testi kullanılarak yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler ortanca (minimum; maksimum) ve ortalama ± standart sapma olarak verildi. Değişkenler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon katsayısı ile incelendi. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0.05$ olarak belirlendi. Farklı yöntemlerle yapılan D vitamini ölçümleri arasındaki farkın analizi için Bland-Altman grafikleri çizildi.

Bulgular

Plazma D vitamini ölçümünde kullanılan HPLC, CMIA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması Tablo I'de verildi. 3 yöntem arasında ortanca 25-OH D vitamini sonuçlarına göre farklılık olduğu saptandı. Yapılan ikili karşılaştırmalarda HPLC ve ECLIA

sonuçları arasında istatistiksel farklılık bulunurken; HPLC ile CMIA ve CMIA ile ECLIA arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görüldü.

Tablo I. 3 farklı yöntemle ölçülen plazma 25-OH vitamin D (µg/L) düzeylerinin karşılaştırılması

n=121	HPLC	CMIA	ECLIA	p değeri	ikili karşılaştırmalar
Ortanca (min-maks)	18.8 (3.7-56.8)	14.8 (0.8-80.2)	14.4 (3.0-53.6)	p=0.031	HPLC-CMIA p=0.077 HPLC-ECLIA p=0.011 CMIA-ECLIA p=0.347

HPLC metodu ile elde edilen D vitamini sonuçları kullanılarak olgular 3 alt gruba ayrıldı (<10 µg/L n=31, 10-30 µg/L n=67, >30 µg/L n=23). <10 µg/L olan grupta 3 yöntem arasında ortalama 25-OH D vitamini düzeylerine göre farklılık olduğu bulundu. Yapılan ikili karşılaştırmalarda, HPLC ile CMIA arasında istatistiksel fark bulunurken; HPLC ile ECLIA arasında ve CMIA ile ECLIA arasında farklılık olmadığı saptandı (Tablo II).

Tablo II. Alt gruplarda plazma 25-OH vitamin D ölçümlerinin karşılaştırılması

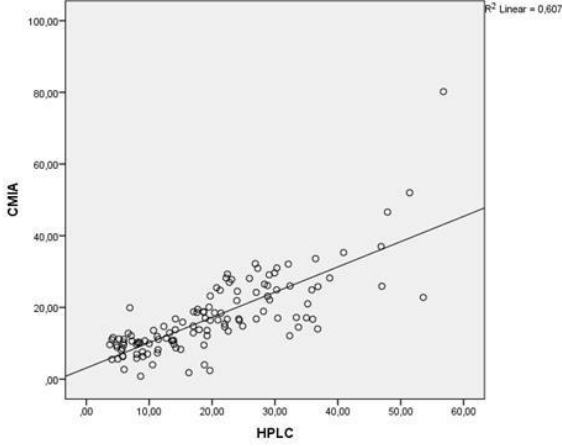
	HPLC (Ortalama ± SS)	CMIA (Ortalama ± SS)	ECLIA (Ortalama ± SS)	p değeri	ikili karşılaştırmalar
<10 µg/L n=31	6.6 ± 1.7	8.8 ± 3.4	6.8 ± 3.4	p=0.004	HPLC-CMIA p=0.008 HPLC-ECLIA p=1.0 CMIA-ECLIA p=0.150
10-30 µg/L n=67	19.6 ± 5.5	17.1 ± 7.3	15.9 ± 6.5	p=0.003	HPLC-CMIA p=0.070 HPLC-ECLIA p=0.003 CMIA-ECLIA p=0.839
>30 µg/L n=23	38.7 ± 7.9	28.5 ± 16.2	29.7 ± 10.4	p=0.007	HPLC-CMIA p=0.012 HPLC-ECLIA p=0.031 CMIA-ECLIA p=1.0

SS: Standart sapma

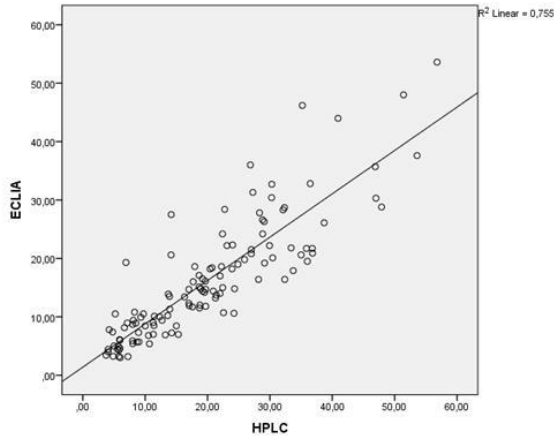
10-30 µg/L olan grupta, 3 yöntem arasında ortalama 25-OH D vitamini düzeylerine göre farklılık olduğu saptandı. Yapılan ikili karşılaştırmalarda, HPLC ile ECLIA arasında fark bulunurken; HPLC ile CMIA arasında ve CMIA ile ECLIA arasında istatistiksel fark olmadığı görüldü (Tablo II).

>30 µg/L olan grupta da, 3 yöntem arasında ortalama 25-OH D vitamini düzeylerine göre farklılık olduğu bulundu. Yapılan ikili karşılaştırmalarda, HPLC ile CMIA arasında ve HPLC ile ECLIA arasında istatistiksel olarak fark bulunurken; CMIA ve ECLIA arasında anlamlı farklılık olmadığı görüldü (Tablo II).

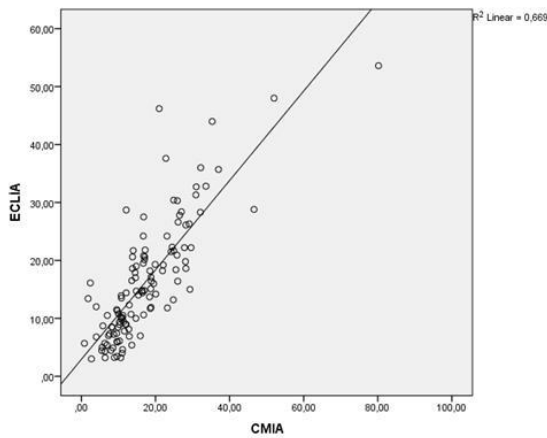
Yapılan korelasyon incelemesinde her üç yöntemin birbiriyle anlamlı pozitif korelasyon gösterdiği bulundu. HPLC ve CMIA metotları arasında $r = 0.779$ ve $p < 0.001$, HPLC ile ECLIA metotları arasında $r = 0.869$ ve $p < 0.001$, CMIA ve ECLIA metotları arasında $r = 0.818$ ve $p < 0.001$ olarak bulundu (Şekil 1,2 ve 3).



Şekil 1:
HPLC ve CMIA yöntemlerinin ilişkisi.

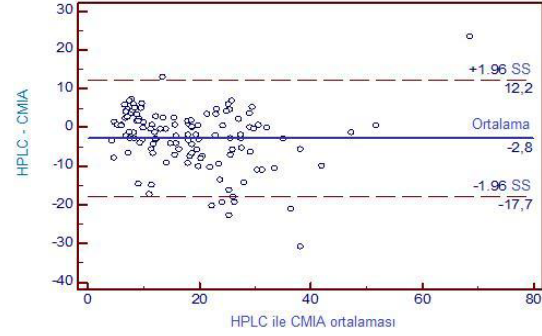


Şekil 2:
HPLC ve ECLIA yöntemlerinin ilişkisi.

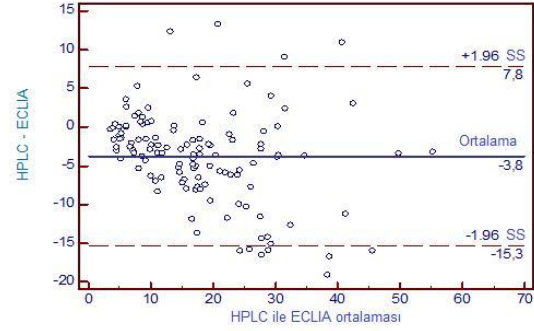


Şekil 3:
CMIA ve ECLIA yöntemlerinin ilişkisi.

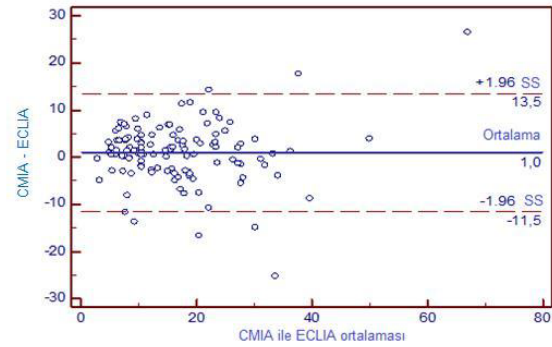
Bland-Altman grafiği ile verilerin uyumuna bakıldığında her üç grafikteki sonuçların homojen dağıldığı saptandı. HPLC ile CMIA metotları uyumunda 8 sonucun, HPLC ile ECLIA' da 11 sonucun, CMIA ile ECLIA' da ise 7 sonucun güven sınırları dışında kaldığı bulundu (Şekil 4, 5 ve 6).



Şekil 4:
HPLC ve CMIA yöntemlerinin Bland-Altman grafikleriyle gösterilmesi.



Şekil 5:
HPLC ve ECLIA yöntemlerinin Bland-Altman grafikleriyle gösterilmesi.



Şekil 6:
CMIA ve ECLIA yöntemlerinin Bland-Altman grafikleriyle gösterilmesi.

Yapılan deney-içi tekrarlanabilirlik çalışmalarında normal serum havuzunda (25 µg/L) HPLC, CMIA ve ECLIA metotlarının % CV değerleri sırası ile % 2.12, % 3.40, % 2.38 idi. Düşük serum havuzunda (8 µg/L) ise % CV değerleri % 5.38, % 9.10 ve % 8.01 olarak saptandı.

Tartışma

Klinik laboratuvarlarda çeşitli nedenlerle aynı test farklı yöntem ve/veya analizörlerle çalışılabilir. Bu nedenle, laboratuvarlarda kullanılması düşünülen yeni bir yöntemin uygulamaya konulmadan önce değerlendirilmesi gereken aşamalar bulunmaktadır. Laboratuvar koşullarına en uygun olan yöntemin seçilmesinde kalite, zaman ve maliyet faktörlerinin yanı sıra analitik performans parametreleri de değerlendirilmelidir.

25-OH vitamin D ölçümünde kullanılan mevcut yöntemlerde önemli sınırlamalar vardır. Sorunların çoğu araştırmacılar tarafından fark edilmekle birlikte, ilk olarak Binkley ve ark.'nın yaptıkları çalışmada yöntemler ve laboratuvarlar arasında sonuçlarda büyük farklılıkların bulunması konunun önemini arttırmıştır.²¹

Düşük D vitamininin osteoporoz, raşitizm, osteomalazi, kalp yetmezliği, multipl skleroz ve bazı kanserler gibi birçok hastalıkla ilişki gösterdiğinin saptanması nedeniyle, D vitamininin doğru olarak ölçülmesi son yıllarda çok önemli hale gelmiştir.⁶

25-OH vitamin D, hidrofobik yapısı ve D vitamini bağlayan proteine yüksek afinite ile bağlanması nedeniyle ölçümü kolay bir analit değildir.²² 25-OH vitamin D testinin farklı çalışma yöntemlerinde standardizasyonunun olmaması hekimin test sonuçlarını değerlendirmesini zorlaştırmaktadır. Son yıllarda teste olan ilgi arttığında klinik laboratuvarlar, iş yükünü azaltmak amacıyla otomatize ölçüm sistemlerini tercih etmeye başlamışlardır. CMIA metodu 2011 yılında, ECLIA metodu 2012 yılında 25-OH vitamin D ölçümü için FDA onayı almıştır.^{23,24}

Çalışmamızda total grup ele alındığında HPLC metoduyla saptanan ortanca D vitamini değerinin ECLIA metodundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü. Hastalar HPLC ölçümlerine göre gruplara ayrıldığında ise 10-30 µg/L ve >30 µg/L olan gruplarda HPLC sonuçlarının daha yüksek, <10 µg/L olan grupta ise daha düşük olduğu saptandı. Lensmeyer ve ark. 25-OH vitamin D ölçümünde LC-MS/MS ile HPLC ve kemilüminesans metodlarını karşılaştırdıklarında, HPLC ve LC-MS/MS metodları ile elde edilen değerlerin farklı olmadığını, ancak bu iki yöntemde kemilüminesans yöntemden anlamlı olarak daha yüksek sonuçlar elde edildiğini saptamışlardır.²⁵ Sahillioğlu ve ark. 2011 yılında yaptıkları çalışmada LC-MS/MS ile HPLC ve kemilüminesans metodlarını karşılaştırmışlardır. Altın standart yöntem olan LC-MS/MS ile en iyi uyumu HPLC yönteminin gösterdiğini bulmuşlardır. Kemilüminesans yöntem ile LC-MS/MS sonuçlarının ise istatistiksel olarak anlamlı olarak farklı olduğunu bulmuşlardır.¹⁸ Snellman ve ark. 2010 yılında HPLC ve kemilüminesans yöntemleriyle 25-OH vitamin D'yi ölçtüklerinde; HPLC yöntemi ile ölçülen

sonuçların yüksek olduğunu ve iki yöntemin istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğunu saptamışlardır.²⁶ Nyugen ve ark. 25-OH vitamin D ölçümünde LC-MS/MS yöntemi ile CMIA yöntemini karşılaştırmışlar ve CMIA'daki sonuçların daha düşük olduğunu saptamışlardır.²⁷

HPLC ve LC-MS/MS metodları 25-OH vitamin D2 ve D3'ü ayrı ayrı saptarken, CMIA ve ECLIA yöntemlerinde ise 25-OH vitamin D total olarak ölçülmektedir. Çalışmamızda ve diğer araştırmacıların HPLC yöntemiyle saptadıkları daha yüksek 25-OH vitamin D değerlerine, bu ölçüm farklılığı yol açmış olabilir.^{18,25-27}

Yöntemler arası korelasyonlar ve Bland-Altman grafikleri incelendiğinde her üç (HPLC, CMIA ve ECLIA) yöntemin de birbirleriyle yüksek korelasyon ve iyi bir uyum gösterdiği görüldü. Leino ve ark. 25-OH vitamin D ölçümünde LC-MS/MS ve ECLIA arasında anlamlı bir korelasyon ve uyum saptamışlardır.²⁸ Bauesela ve ark. 150 kişide LC-MS/MS sonuçları ile CMIA ve ECLIA sonuçlarını karşılaştırmışlardır. Her iki yöntemin de korelasyon ve uyum katsayısı açısından LC-MS/MS yöntemi ile kabul edilir düzeyde saptanması, D vitamini ölçümünde CMIA ve ECLIA yöntemlerinin de kullanılabileceğini düşündürmüştür.²⁹ Vogrinc ve ark. D vitamini ölçümünde HPLC ve ECLIA yöntemlerini karşılaştırmışlar ve ECLIA yönteminin HPLC yöntemi ile iyi bir korelasyon ve uyum gösterdiğini bulmuşlardır.³⁰ 25-OH vitamin D ölçümünde otomatize sistemlerde kullanılabilen CMIA ve ECLIA sonuçlarının karşılaştırıldığı bir başka çalışmada da bu iki yöntem arasında güçlü korelasyon ve uyum olduğu saptanmıştır.³¹

Çalışmalarda LC-MS/MS ile yapılan ölçümlerde deney içi % CV değerleri % 3.5 ile % 12 arasında değiştiği bildirilmiştir.^{18,32-34} Farrell ve ark.'nın çalışmasında (CMIA) ise deney içi % CV değerleri düşük serum havuzunda % 4.2, yüksek serum havuzunda % 1.9 olarak saptanmıştır.³⁵ Çalışmamızda deney içi tekrarlanabilirlik açısından hem düşük serum havuzunda (8 µg/L, % 5.38 - 9.1) hem de normal serum havuzunda (25 µg/L, % 2.12 - 3.4) % CV değerlerinin, diğer araştırmacıların bildirdikleri değerlerle benzerlik gösterdiği görüldü.^{18,32-35}

Sonuç olarak 25-OH vitamin D ölçümünde kemilüminesans yöntemler HPLC yöntemine göre daha az numune hacmi ve daha az deneyim gerektirmektedir. Ayrıca bu yöntemler ön işlem gerektirmemekte ve bu yöntemlerde daha az emek ile daha çok numune çalışılması mümkün olmaktadır. Özellikle örnek sayıları çok olan laboratuvarların 25-OH vitamin D ölçümlerinde kemilüminesans metodları tercih etmeleri hız ve kolaylık açısından önemli avantajlar sağlayacaktır.

Kaynaklar

- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289(1):8-28.
- MacDonald MH, Seshia MMK, Mullet MD, (eds). *Avery's Neonatology Pathophysiology & Management of the Newborn*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott W&W; 2005;847-75.
- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Eng J Med* 2007;357(3):266-81.
- Kochupillai N. The physiology of vitamin D: current concepts. *Indian J Med Res* 2008;127(3):256-62.
- Souberbielle JC, Friedlander G, Kahan A, Cormier C. Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. *Joint Bone Spine* 2006;73(3):249-53.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, et al. 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* 2011;96(1):53-8.
- Ward LM, Gaboury I, Ladhani M, Zlotkin S. Vitamin D-deficiency rickets among children in Canada. *CMAJ* 2007;177(2):161-6.
- Zitterman A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr* 2003;89:552-72.
- McKenna MJ, Freaney R. Secondary hyperparathyroidism in the elderly: means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 1998;8:3-6.
- Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003;22:142-6.
- Ritz E, Boland R, Kreusser W. Effects of vitamin D and parathyroid hormone on muscle: potential role in uremic myopathy. *Am J Clin Nutr* 1980;33:1522-9.
- Curry OB, Bastein JF, Francis MJ, Smith R. Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum of muscle from vitamin D deficient rabbits. *Nature* 1974;249:83-4.
- Zitterman A, Schleithoff SS, Tenderich G, Berthold HK, Körfer R, Stehle P. Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:105-12.
- Guyton KZ, Kensler TW, Posner GH. Cancer chemoprevention using natural vitamin D and synthetic analogs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:421-42.
- John EM, Schwartz GG, Dreon DM, Koo J. Vitamin D and breast cancer risk: the NHANES I epidemiologic follow-up study, 1971-1975 to 1992. *National Health and Nutrition Examination Survey. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:399-406.
- Schwartz GG. Multiple sclerosis and prostate cancer: what do their similar geographies suggest? *Neuroepidemiology* 1992;11:244-54.
- Hollis BW. Assessment of vitamin D nutritional and hormonal status: what to measure and how to do it. *Calcif Tissue Int* 1996;58:4-5.
- Sahillioğlu B, Serdar MA, Erkal N, ve ark. 25-OH-Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrometredede Yöntem Geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması. *Turk J Biochem* 2011;36(1):73-9.
- Thomas SD, Fudge AN, Whiting M, Coates PS. The correlation between third-trimester maternal and newborn serum 25-hydroxy-vitamin D in a selected South Australian group of newborn samples. *BMJ Open* 2011;1(2):e000236.
- Zerwekh JE. The Measurement of vitamin D: analytical aspects. *Ann Clin Biochem* 2004;41(4):272-81.
- Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: A call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3152-7.
- Chen Y, Kinney L, Bozovic A, et al. Performance evaluation of Siemens ADVIA Centaur and Roche Modular Analytics E170 Total 25-OH Vitamin D assays. *Clin Biochem* 2012;45(16-17):1485-90.
- Media Release. Abbott Receives FDA Clearance for New Test to Detect Vitamin D Levels. Press release. Abbott Laboratories Web site. http://www.abbott.com/news-media/press-releases/2011_november30.
- Media Release. FDA clears Roche's vitamin D laboratory test: Fully automated assay for widely available platforms offers labs efficient solution to help assess patient vitamin D level. Hoffmann-La Roche Ltd Web site. http://www.roche.com/media/media_releases/medcor-2012-07-26
- Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays. *Clin Chem* 2006; 52(6):1120-6.
- Snellman G, Melhus H, Gedeberg R, et al. Determining vitamin D status: A comparison between commercially available assays. *PLoS One* 2010;5(7):e11555.
- Nguyen VT, Li X, Castellanos KJ, Fantuzzi G, Mazzone T, Braunschweig CA. The accuracy of vitamin D assays of circulating 25-hydroxyvitamin D values: Influence of 25-hydroxylated ergocalciferol concentration. *J AOAC Int* 2014;97(4):1048-55.
- Leino A, Turpeinen U, Koskinen P. Automated measurement of 25-OH vitamin D3 on the Roche Modular E170 Analyzer. *Clin Chem* 2008; 54(12):2059-62.
- Bausela C, Gavina B, Ortega I, Torrejon M, Arroyo M. Comparison of total 25-OH vitamin D automated immunoassays versus LC-MS/MS. *Biochemia Medica* 2012;22(3):A198.
- Vogrinc Z, Lovric M, Sertic J. Evaluation of automated method for measurement of serum 25-hydroxyvitamin D. *Biochemia Medica* 2012;22(3):A199.
- Martins-Costa P, Martins H, Bravo F, Cruz M, Reis J, Oliveira JC. Comparison of automated methods for measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Lab* 2013;59(7-8):885-91.
- Maunsell Z, Wright DJ, Rainbow SJ. Routine isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D2 and D3. *Clin Chem* 2005;51(9):1683-90.
- Saenger AK, Laha TJ, Bremner DE, Sadrzadeh SM. Quantification of serum 25-hydroxyvitamin D2 and D3 using HPLC-tandem mass spectrometry and examination of reference intervals for diagnosis of vitamin D deficiency. *Am J Clin Pathol* 2006;125:914-20.
- Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D3 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50(8):1415-7.
- Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State of the art vitamin D assays: A comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem* 2012;58(3):531-42.