

Hızlı, Hassas ve Kolay HPLC-UV 25(OH)D Tayini ve İmmün Ölçüm Yöntemi ile Karşılaştırılması

A Simple, Sensitive and Rapid HPLC-UV Method for the Determination of 25(OH)D and Comparison of the Immunoassay Method

Özgür Baykan

Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Başvuru Tarihi: 14 Temmuz 2019

Kabul Tarihi: 23 Ağustos 2019

ÖZET

Amaç: D vitamini eksikliği, ülkemizde yaygın görülen bir halk sağlığı sorunudur. Eksiklik prevalansını belirlemeye dair yapılan çalışmalarda %90'lara ulaşan verilere rastlamak mümkündür. Son yıllarda bu eksikliğin basın yayın yoluyla da sıkça gündeme getirilmesi, halkımızı kan düzeyinin takibi ile ilgili bir arayışa yönlendirmiştir. Bu sebeplerle laboratuvarlarda D vitamini test sayılarında ciddi artışlar yaşanmaktadır. Hasta başı test maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle de laboratuvar harcamaları içerisinde ön sıralarda yer almaktadır. Laboratuvar maliyetlerinin düşürülmesi, 25(OH)D₂ ve D₃ formlarının ayrı ayrı belirlenebilmesi için ön hazırlık aşaması kolay, hızlı ve hassas 'in-house' bir analiz yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Yöntem geliştirilmesinde Ultimate 3000 HPLC-UV (Dionex, Germany) cihazı, yöntem karşılaştırma çalışması amacıyla da Architect 25(OH)D kiti (Abbott Diagnostic, USA) kullanılmıştır. Validasyon çalışmaları CLSI kılavuzları kullanılarak yapılmıştır (EP5-A2, EP6-A, EP9-A2). Doğruluk, Sertifikalı Referans Malzeme (UME CRM 1308) aracılığıyla değerlendirilmiştir. Kromatografik ayırım için ters faz 150mmX4.6mm,(3.0µm) ODS-1(Thermo Scientific, USA) analitik kolon tercih edilmiştir.

Bulgular: Çalışma içi, çalışmalar arası ve günler arası %CV değerleri 18.9ng/mL 25(OH)D₃ için sırasıyla %2.6, %2.7 ve %6.3 olarak, 57.4ng/mL için ise %1.8, %1.8 ve %4.8 olarak belirlendi. 25(OH)D₃ testi için LOD değeri 0.7ng/mL, LOQ değeri ise 2.1ng/mL olarak tespit edildi. HPLC-UV ve Abbott Architect sistemleri arasındaki uyum Passing Bablok regresyon analizi ile değerlendirildi ($y=0,89x+1,81$).

Sonuç: HPLC-UV ve Abbott Architect arasındaki uyum her iki yönteminde tercih edilebileceğini düşündürmektedir. Ancak her laboratuvar 25(OH)D tayini amacıyla yöntem seçiminde içerisinde bulunduğu şartlara göre karar vermelidir. Çünkü test performanslarının birbirlerine oldukça benzer olduğu bu gibi durumlarda yöntem seçiminde hasta sayısı, tecrübeli personel varlığı ve maliyet belirleyici parametreler olarak daha ön planda yer alacaktır.

Anahtar Sözcükler: Yöntem; Kromatografi; Vitamin D

Özgür Baykan : <https://orcid.org/0000-0001-8551-6900>

Yazışma adresi: Özgür Baykan
Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı Çağış
Kampüsü/Balıkesir
e-mail: ozgurbaykan@gmail.com

ABSTRACT

Aim: Vitamin D deficiency is a common public health problem in our country. It is possible to find data reaching 90% in studies about determining deficiency prevalence. In recent years, this deficiency has been attracted the attention of the press and has directed people to a search for blood level monitoring. For these reasons, there are also serious increases in the number of vitamin D levels analyses in laboratories. Due to the high measurement costs per patient, it is also one of the most important laboratory expenses. It is aimed to develop an simple, sensitive and rapid 'in-house' analysis method in order to reduce laboratory costs and to determine 25(OH)D₂ and D₃ forms separately.

Material and Methods: Ultimate 3000HPLC-UV (Dionex, Germany) was used in the development of the method. Architect 25(OH)D kit (Abbott Diagnostic, USA) were used for method comparison study. Validation studies were performed using CLSI guidelines(EP5-A2,EP6-A,EP9-A2). Accuracy was evaluated using Certified Reference Material (UME CRM 1308). For chromatographic separation, reverse phase 150mmX4.6mm,(3.0 µm) ODS-1 (Thermo Scientific,USA) analytical column was used.

Results: Within run, between run and between day precisions (%CV) for 18.9ng/mL 25(OH)D₃ were 2.6%, 2.7%, 6.3% and for 57.4ng/mL were 1.8%, 1.8% and 4.8% respectively. For 25(OH)D₃, the LOD was 0.7ng/mL and the LOQ was 2.1ng/mL. Correlation between HPLC-UV and Abbott Architect systems was evaluated by Passing Bablok regression analysis ($y=0.89x+1.81$).

Conclusion: The compatibility between HPLC-UV and Abbott Architect suggests that both methods can be preferred. However,each laboratory should decide according to the their conditions in which the method is selected for the determination of 25(OH)D. Because in such cases where test performances are very similar. The number of patients, experienced staff presence and cost-determining parameters will be more prominent in the selection of methods,

Keywords: Methods; Chromatography; Vitamin D

GİRİŞ

D vitamini eksikliği ülkemizde yaygın görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Her ne kadar güneşten zengin bir ülkede yaşıyor olsak da güneş ışığından dik geldiği saatlerde yararlanılmaması, güneş koruyucu krem kullanımı, giyinme ve beslenme alışkanlıkları bu sorunun nedenleri arasında sayılabilir. Literatüre baktığımızda D vitamini eksikliği prevalansı ile çok sayıda araştırmaya rastlamak mümkündür. Güneş açısından zengin bir bölge olan Ege bölgesinde yapılan bir çalışmada halkın %75 inde D vitamini eksikliği gözlemlendiği bildirilmiştir(1). Güneydoğu bölgesinde yapılan bir diğer çalışmada ise eksiklik oranlarının %94'lere ulaştığı raporlanmıştır(2). İstanbul'da 688 kişi ile yapılan araştırmada ise katılımcıların %72'sinde D vitamini eksikliği bildirilmiştir (3). Baykan ve arkadaşları da araştırmalarında D vitamini eksikliğinden etkilenenlerin oranını %83,7 olarak belirtmişlerdir(4). Gelişmiş ülkelerde de D vitamini eksikliği olduğuna dair literatürde verilere rastlanmakla birlikte prevalansı ile ilgili %24 ile %50 aralığında verilere rastlanmıştır(5,7). D

vitamini eksikliğinin bu ülkelerde daha az gözleniyor olması; gıdalara yapılan D vitamini desteğinin etkisi sonucu olabileceği düşünülmüştür.

Eksikliğinin birçok hastalığın etiyolojisinde rol alabileceğine dair son yıllarda yapılan çalışmalar tüm dünyada D vitaminine olan ilgiyi artırmıştır. İlgi sadece akademik araştırmalarla sınırlı kalmayıp, özellikle basının da bu vitamine ilgisi ülkemizde de bir duyarlılık artışına neden olmuştur. Özellikle son yıllarda birçok birey hastanelere D vitamini düzeyini ölçtürmek için başvurmakta ve klinisyenden bunu direk talep etmektedir. Artan bu talep laboratuvarlarda D vitamini test sayısının artışı ile sonuçlanmıştır. Test sayısındaki bu artışa sadece ülkemizde değil birçok gelişmiş ülkede rastlamak mümkündür. Örneğin Avustralya'da, 2000 yılında yapılan D vitamini testi 37/100.000 kişi iken 2011'de 3468/100.000 kişiye ulaşmıştır. Bu sürede D vitamini analiz sayısında 94 kat artış yaşanırken açlık kan şekeri ölçümü sayısındaki artış sadece 2,5 kat kadar olmuştur(8). Bir başka araştırmada Fransa'da 2008-2013 yılları arasında D vitamini analiz

sayısındaki artışın 7,5 kat olduğu bildirilmiştir(9). Sonuç olarak artan talep birçok kit üreticisinin de ilgisini çekmiş ve D vitamini ölçüm yöntemlerinin çeşitlenmesini beraberinde getirmiştir.

Geçmişten günümüze kadar 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) vitamini ölçümü amacıyla çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Her bir yöntem ve cihazın avantajları ve dezavantajları yeni teknolojik gelişmelerle sürekli değişmektedir. Laboratuvarlar yöntem seçiminde kolaylık, maliyet, kısa sürede sonuç verme, özgüllük ve doğruluk arasında bir denge bulmak için çaba sarf etmektedir. Birçok üretici tarafından üretilen kitlerin pazara sunulması, farklı cihaz ve yöntemler kullanılması gibi nedenlerle standardizasyonu için yoğun çaba harcanmaktadır. Günümüzde ölçüm yöntemlerinin standardizasyonu için yapılan en kapsamlı çalışma D vitamini kalite değerlendirme programı olan Vitamin D External Quality Assessment Scheme (DEQAS) aracılığıyla yapılmaktadır. Fakat DEQAS'ın tüm uğraşlarına rağmen tam bir standardizasyon sağlamak halen mümkün görülmemektedir(10). Üretici firmalarda bu amaçla yöntemlerini geliştirerek yada değiştirerek yeni versiyon kitlerini pazara sunmaktadırlar. DEQAS üyesi laboratuvarların ölçüm yöntemlerindeki dağılıma bakıldığında ise yaklaşık %20'sinin kromatografik temelli yöntemleri kullandığı (HPLC-UV ya da HPLC-MS/MS), geri kalan diğer laboratuvarların büyük kısmının immünolojik temelli ticari kitler kullanarak analizlerini gerçekleştirdiği gözlenmiştir. Kromatografik temelli yöntemlerde tecrübeli laboratuvar personeli gereksinimi, manuel örnek hazırlığının ve 'in-house' yöntem geliştirilmenin zorluğu gibi nedenler tercih edilmelerini güçleştirirken, 25(OH)D₂ ve D₃ formlarını ayrı ayrı belirleyebilmesi, yüksek doğruluk ve hassasiyetle ölçüm yapabilmesi, interferansların daha az gözlenmesi üstünlükleri arasında sayılabilir. İmmün kökenli ölçüm yöntemleri ise hızlı analiz süresi, düşük örnek hacmi ve tam otomatik cihazlar ile kullanılması gibi avantajlara sahiptir. Kromatografi temelli yöntemleri maliyet açısından karşılaştıracak olursak,

LC-MS/MS'in kurulum maliyeti HPLC-UV sistemlerden yaklaşık 4-5 kat daha fazladır. İlk kurulum maliyetlerinin yüksek olmasından dolayı yöntem geliştirilmesi için HPLC-UV sistemleri tercih edilebilir.

Balıkesir Atatürk Devlet Hastanesi Laboratuvarında HPLC-UV sistemi tercih edilerek 25(OH)D analizi yapılmaktadır. Bu makale ile yöntemin geliştirilmesi sürecinde elde edilen validasyon verileri ile hasta örneklerinin karşılaştırılması sayesinde elde edilen verilerin literatüre kazandırılması ve 'in-house' yöntem geliştirecek laboratuvarların faydalanması amaçlanmıştır. Bu nedenle HPLC-UV aracılığıyla geliştirilen yöntemin validasyonu ve yeni versiyon Architect 25(OH)D kiti ile karşılaştırma çalışması yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

25(OH)D vitamini testi için yöntem geliştirilmesi ve validasyonu amacıyla Ultimate 3000 HPLC-UV (Dionex, Germany) cihazı, yöntem karşılaştırma çalışması amacıyla da Abbott Architect i2000 cihazı ve Architect 25(OH)D (LN 5P02) kiti (Abbott Diagnostic, USA) kullanılmıştır. Etik onay Balıkesir Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alınmıştır. Validasyon çalışmaları CLSI (*The Clinical & Laboratory Standards Institute*) kılavuzları kullanılarak yapılmıştır.

Kesinlik CLSI EP5-A2 rehber kılavuzu kullanılarak belirlenmiştir. 2 düzey kontrol ve 2 düzey hasta serum havuzu 20 gün süreyle günde 2 kez 2 tekrar halinde çalışılmıştır. Linearite grafiği CLSI EP-6A kılavuzuna göre 9 nokta belirlenerek oluşturulmuştur. Sinyal/Gürültü oranlarının >10 olma sınırı LOQ (Kantitasyon limiti) olarak kabul edilmiştir. Bu sınırlarda her bir örnek 20 kez tekrar edilmiş, tekrarlanabilirlik değerleri <%20 olarak tespit edilmiştir. Sinyal/Gürültü oranlarının >3 olduğu değer LOD (Deteksiyon limiti) olarak belirlenmiştir. Geri kazanım değerleri ekstraksiyon öncesi ve sonrası 25(OH)D₂ ve D₃ standart solüsyonlarının eklenmesi yöntemi ile hesaplanmıştır. Doğruluk TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü tarafından üretilen Sertifikalı Referans

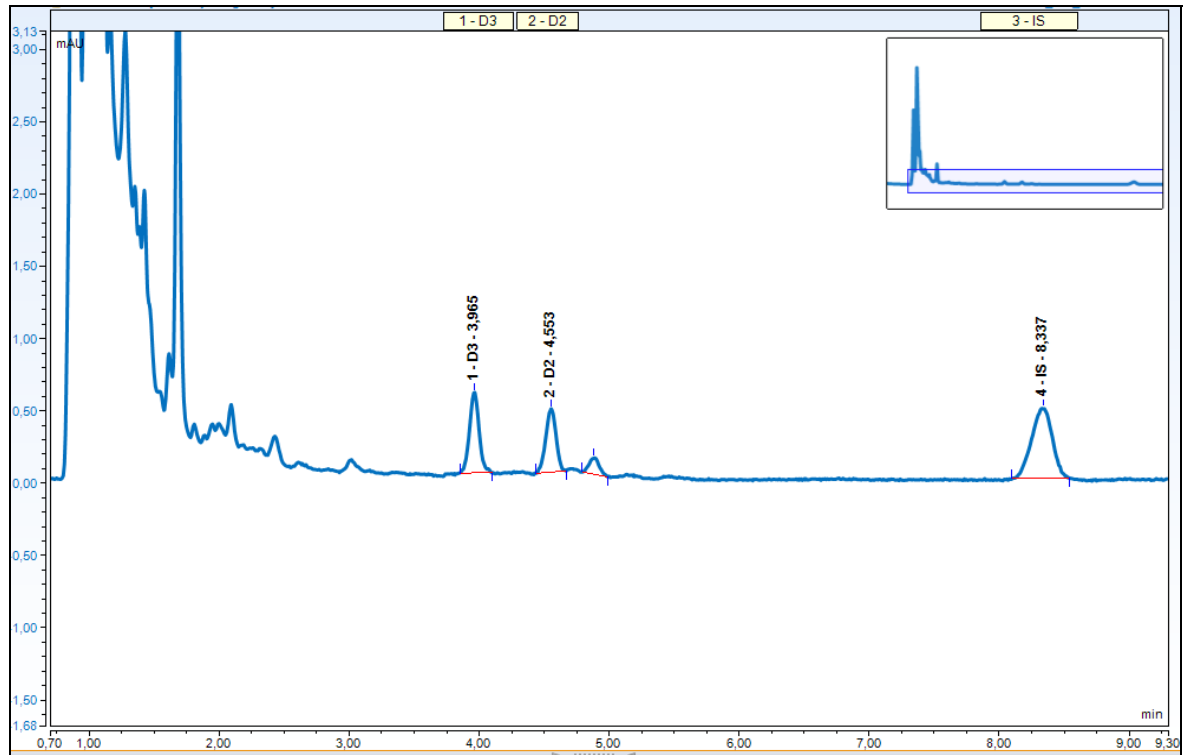
Malzeme (UME CRM 1308) kullanılarak sağlanmıştır. Yöntem karşılaştırma çalışmalarında EP-9A2 kılavuzu kullanılmıştır. Verilerin analizi MedCalc 13.1 ve Analyze-it programları aracılığıyla yapılmıştır.

Serum örneklerinden 25(OH)D'nin ekstraksiyonunda proteinlerin çöktürülmesi amacıyla tuz olarak Amonyum sülfat (Sigma Aldrich, USA) ve likid-likid ekstraksiyon amacıyla Asetonitril (Sigma Aldrich, USA) kullanılmıştır(11). Amonyum sülfat oda ısısında su içerisinde çözündürülerek (%40 w/v) hazırlanmıştır. 300 uL hasta serumu, kontrol (Recipe, Germany) ve kalibratör (Recipe, Germany) üzerine 400uL amonyum sülfat çözeltisi ve 300uL asetonitril ve iç standart karışımı konularak 10 saniye vortekslenmiştir. İç standart olarak Dodecanophenone (Sigma Aldrich, USA) 800 ppb konsantrasyonda olacak şekilde asetonitril içerisinde önceden çözündürülmüş ve asetonitril ile birlikte serum, kontrol ve kalibratöre eklenmiştir. Vortekslenen örnekler 13500Xg de 10 dk

santrifüj edilmiştir. Sonrasında üst fazdan 150 uL alınarak analiz için HPLC sistemine aktarılmıştır.

Kromatografik ayırım için ters faz 150mmX4.6mm (3.0 µm) ODS-1 (Thermo Scientific, USA) analitik kolon kullanıldı. Analiz için optimum numune hacmi 20uL, kolon ısı 40°C, UV dedektör dalga boyu 265 nm olarak belirlendi. Hareketli faz için Asetonitril, Su (Sigma Aldrich, USA) ve İso-propil alkol (Sigma Aldrich, USA) 77,5:20:2,5 oranında kullanıldı. Tampon olarak mobil faz içerisine su ile birlikte 10 mM konsantrasyonda amonyum format ve %0.1 Formik asit eklendi. Akış hızı 1.5 mL/dk ve analiz süresi 9.3 dk olarak belirlendi (Şekil 1).

Analiz sonrası kromatogramda her bir pikin eğri altındaki alanları Chromeleon 7.2 (Thermo Fisher Scientific Inc, USA) programı aracılığıyla hesaplandı. Kalibrasyon eğrisi oluşturulduktan sonra altta verilen formül programa girilerek örneklerin konsantrasyonu belirlendi.



Şekil 1. 25(OH)D₃ ve D₂ kromatogram örneği (D₃, D₂ ve IS için retansiyon zamanları; 3.96, 4.55 ve 8.33 dakika)

Figure 1. 25 (OH) D₃ and D₂ chromatogram samples (retention times for D₃, D₂ and IS; 3.96, 4.55 and 8.33 minutes)

$$\text{Numune konsantrasyonu} = \frac{(\text{Numune pik alanı} / \text{Numune iç std pik alanı}) \times \text{Kalibratör konsantrasyonu}}{(\text{Kalibratörün pik alanı} / \text{Kalibratörün iç std pik alanı})}$$

BULGULAR

Hasta ve kontrol numunelerinden oluşturulan havuz aracılığıyla belirlenen tekrarlanabilirlik verileri Tablo 1 ve 2’de gösterilmiştir.

Tablo 1. 25(OH)D₃ testine ait tekrarlanabilirlik verileri

Table 1. 25 (OH) D3 test reproducibility data

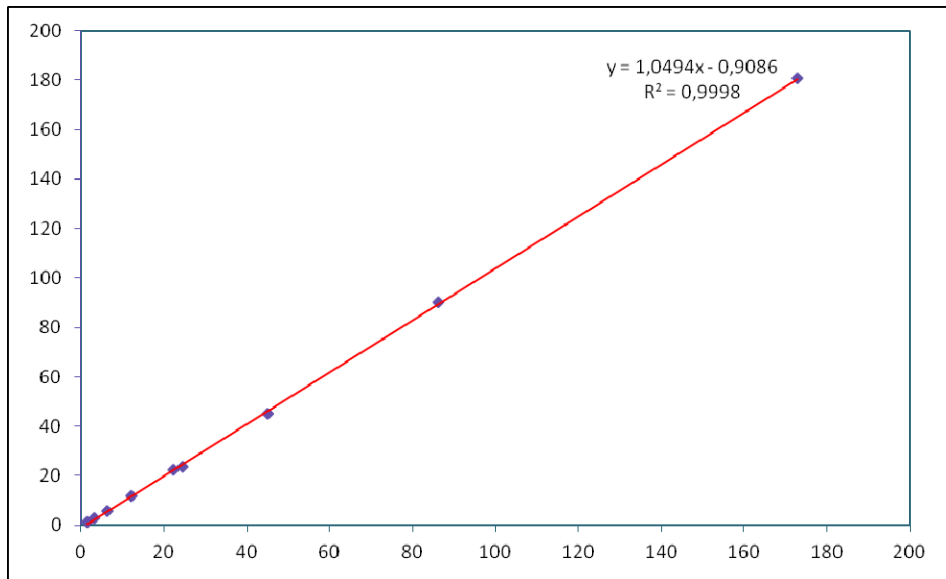
Numune 25(OH)D ₃	Konsantrasyon (ng/mL)	Çalışma içi %CV	Günler arası %CV	Çalışmalar arası %CV
Kontrol serumu 1	24.4 ng/mL	%2.17	%4.22	%3.52
Kontrol serumu 2	88.2 ng/mL	%1.50	%3.18	%3.49
Hasta serumu 1	18.9 ng/mL	%2.62	%6.26	%2.73
Hasta serumu 2	57.4 ng/mL	%1.81	%4.78	%1.82

Tablo 2. 25(OH)D₂ testine ait tekrarlanabilirlik verileri

Table 2. 25 (OH) D2 test reproducibility data

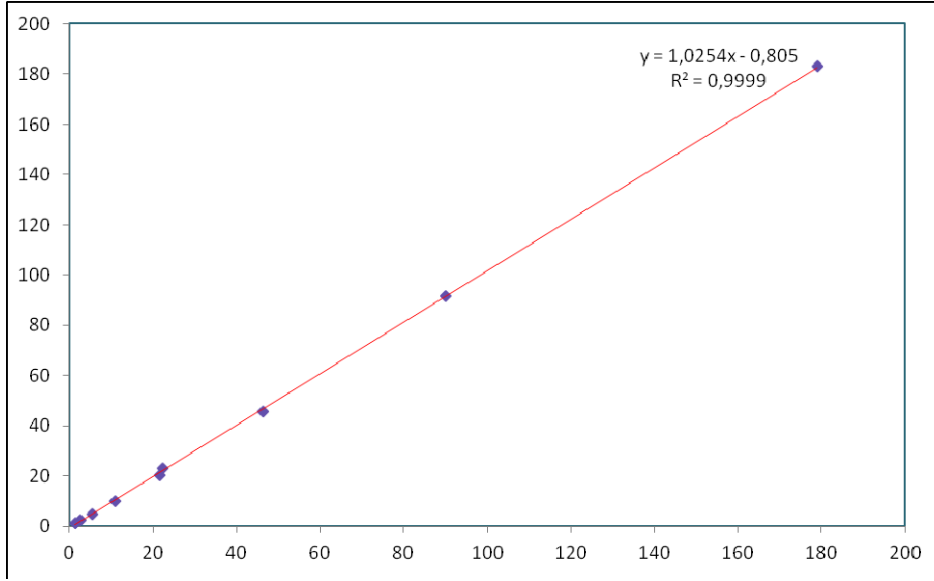
Numune 25(OH)D ₂	Konsantrasyon (ng/mL)	Çalışma içi %CV	Günler arası %CV	Çalışmalar arası %CV
Kontrol serumu 1	21.7 ng/mL	%3.28	%4.63	%2.86
Kontrol serumu 2	89.3 ng/mL	%1.66	%3.76	%3.32
Hasta serumu 1	28.6 ng/mL	%3.01	%5.62	%4.54
Hasta serumu 2	144.8 ng/mL	%1.73	%4.21	%1.76

Testlerin linearite grafikleri Şekil 2 ve Şekil 3’de gösterilmiş olup, her iki 25(OH)D vitamini formunun da 180ng/mL düzeyine kadar lineer olduğu gözlenmiştir.



Şekil 2. 25(OH)D₃ için linearite grafiği

Figure 2. Linearity graph for 25 (OH) D₃



Şekil 3. 25(OH)D₂ için linearite grafiği
Figure 3. Linearity graph for 25 (OH) D₂

Numunelerin alt tespit (LOD) ve kantite edilebilen en küçük değerleri (LOQ) Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3. Numunelerin LOD ve LOQ değerleri.
Table 3. LOD and LOQ values of samples.

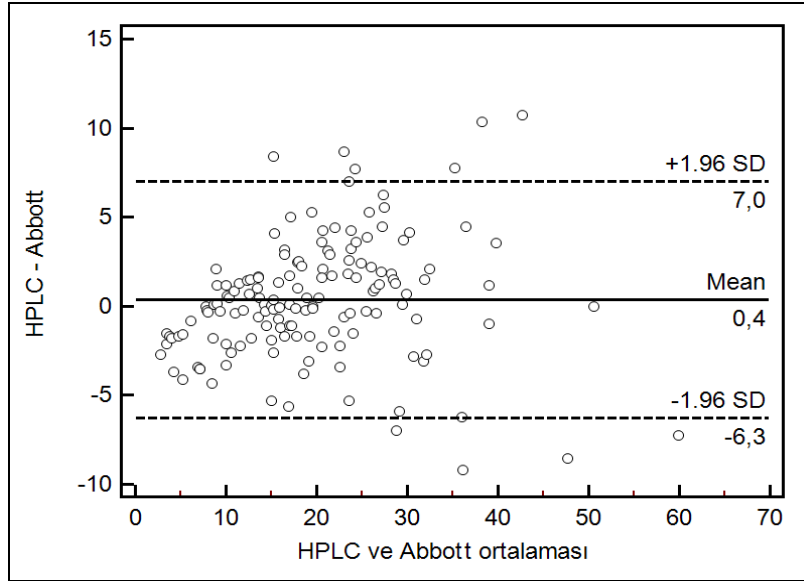
Numune	LOD	LOQ
25-hidroksivitamin D ₃	0.7 ng/mL	2.1 ng/mL
25-hidroksivitamin D ₂	0.6 ng/mL	2.4 ng/mL

Geri kazanım değerlerinin belirlenmesi için kontrol ve hasta havuzlarından oluşan 4 ayrı düzeyde numune kullanılmıştır. Geri kazanım değerlerinin 25-OH-D₃ için %97 – %112 aralığında 25-OH-D₂ için ise %99-%108 aralığında değiştiği belirlenmiştir.

Bias değerlerinin belirlenmesinde UME CRM 1308 (Ulusal Metroloji Enstitüsü, TÜBİTAK) hedef değerleri kullanıldı. 25(OH)D₂ için bildirilen hedef değer 50,09 iken ölçülen değer 51,5 ng/mL olarak belirlenmiş olup 25(OH)D₂ için %Bias değeri %2,8 olarak hesaplandı. 25(OH)D₃ için bildirilen değer 48,85 olup ölçülen değer 49,5 olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre 25(OH)D₃ için hesaplanan %Bias değeri ise %1,3 olarak tespit edildi.

Her iki yöntem arasındaki uyumun değerlendirilebilmesi amacıyla Bland-Altman grafiği (Şekil 4) ve Passing ve Bablok regresyon analizi (Tablo IV) yapılmıştır. Her iki yöntem ortalaması ile HPLC ve Abbott arasındaki farkın karşılaştırılması amacıyla çizilen Bland Altman grafiği incelendiğinde ortalama Bias değeri 0,4ng/mL olarak gözlenmiştir. Bu değer her iki yöntem arasındaki ortalama farkın oldukça düşük olduğunu göstermektedir.

HPLC ve Abbott ile ölçülen 25(OH)D ölçümleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinde Passing ve Bablok regresyon analizi yapılarak regresyon doğrusu çizilmiştir (Şekil 5). Regresyon doğrusunun lineariteden sapmadığı belirlenmiştir (P=0.37)



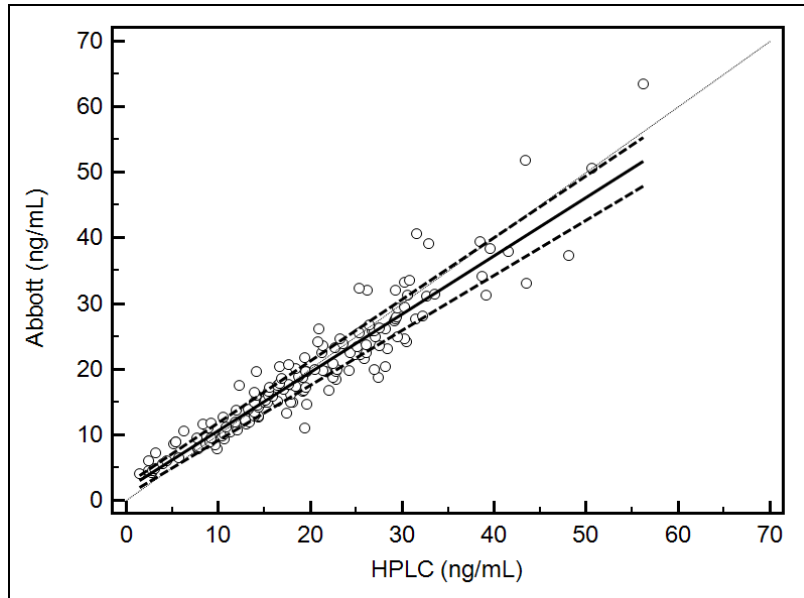
Şekil 4. HPLC ve Abbott 25(OH)D ölçümlerinin Blant Altman grafiği ile karşılaştırılması. (X eksenini her iki yöntemle ölçülen 25(OH)D sonuçlarının aritmetik ortalaması iken Y eksenini HPLC ile ölçülen sonuçların Abbott ile ölçülen sonuçlardan farkını ifade etmektedir. Her 2 ekseninde de birimler ng/mL olarak verilmiştir)

Figure 4. Comparison of HPLC and Abbott 25 (OH) D measurements with Blant Altman graph. (The X-axis is the arithmetic mean of 25 (OH) D results measured by both methods, whereas the Y-axis represents the difference from the Abbott results measured by HPLC. Units are given in ng / mL on both axes.)

Tablo 4. İki yöntem arasındaki ilişkinin Passing ve Bablok regresyon analizi verileri ile değerlendirilmesi.

Table 4. Evaluating the relationship between two methods with Passing and Bablok regression analysis data.

	Örnek Sayısı	Ortalama (ng/mL)	Standart Sapma (ng/mL)
HPLC	147	19.95	10.43
Abbott	147	19.58	9.92
$(y=0,89x+1,81)$			



Şekil 5. HPLC ve Abbott ölçüm yöntemleri ile ölçülen 25(OH)D sonuçlarının dağılımı.

Figure 5. Distribution of 25 (OH) D results measured by HPLC and Abbott measurement methods.

TARTIŞMA

D vitamini eksikliği prevelansında gözlenen yükselme ve bu duruma karşı gerek halkımızda gerekse hekimlerde duyarlılığın artması, laboratuvarlarda analiz sayısının artması ile sonuçlanmıştır. Test başı maliyetlerinin de yüksek olması toplam laboratuvar harcamalarında önemli bir pay almasına neden olmaktadır. Bunun sonucu olarak maliyet etkin yöntemlerin tercih edilmesi gündeme gelmektedir. DEQAS verilerine göre rutin laboratuvarların %80'den fazlası otomatize sistemleri ve özellikle immün temelli ölçüm yöntemlerini tercih etmektedir. Bu yöntemler hızlı, düşük hacimle çalışabilmeleri ve tecrübeli eleman ihtiyacı gereksiniminin daha az olması nedeniyle daha sık tercih edilmektedir. Ancak çapraz reaksiyonlara açık olmaları, D_2 ve D_3 formlarını ayıramamaları ve kit maliyetleri açısından halen 'in-house' yöntemlerin çok üzerinde olmaları gibi nedenlerde belirgin dezavantajlarıdır. Laboratuvarların yaklaşık geri kalan %20 kadarı da kromatografik temelli yöntemleri tercih etmektedir. Ancak kromatografik yöntemler kullananların hangi oranlarda ticari kit ya da 'in-house' yöntem kullandığına dair bir veriye rastlanmamıştır. Kromatografik yöntemler ile analizlerde ise son yıllarda LC-MS/MS kullanımı %80'lerin üzerine çıkmaya başlamıştır. Altın standart yöntem olması, analiz süresinin HPLC'ye göre daha kısa olması gibi nedenler avantajları arasında sayılabilir. Ancak ilk kurulum maliyetlerinin HPLC'ye göre yaklaşık 4-5 kat daha yüksek olması ise önemli bir sorun olarak karşımızda durmaktadır. Bu sebeplerden ötürü analiz sayısı günlük 100-150 numunenin altında olan laboratuvarlarda HPLC sistemleri kurulması LC-MS/MS'e göre maliyet-etkin olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 'in-house' yöntem kullanılması maliyetleri ciddi oranda düşürmektedir. Bu çalışma sonucu ortaya çıkarılan yöntem ile otomatize sistemlere göre yaklaşık 4 katın üzerinde bir tasarruf sağlanabildiği gözlenmiştir.

Araştırmada rutin laboratuvarlarda yaygın kullanılmakta olan immün ölçüm temelli kit yerine HPLC-UV sistemlerde geliştirilen

yöntem aracılığıyla ölçüm yapmanın etkisini değerlendirilmiştir. Geliştirilen yöntemde ön hazırlık süresi diğer manuel yöntemlere göre daha kısa tutulmuştur. İşgücü ve zaman kaybının azaltılması açısından bu durum son derece önemlidir. Literatürde azot altında uçurma yapılarak geliştirilen yöntemlere sık rastlanmakla birlikte 100'ün üzerinde örnek gelen laboratuvarlarda bu yöntemlerin uygulanması da zaman ve işgücü kaybına neden olacaktır. Çalışmada ön hazırlık amacıyla kullanılan yöntemde hasta plazmasına 2 farklı çözücünün eklenmesi sonrası 10 sn vorteks ve 10 dk santrifüj işlemi sonrası üst fazın direk cihaza verilmesi en önemli avantajları arasındadır.

Tekrarlanabilirlik açısından değerlendirildiğinde hem çalışma içi hem çalışmalar arası hem de günler arası verilerin ortalaması %5'in altında gözlenmiş olup, kabul edilebilir sınırlar içerisinde değerlendirilmiştir. Standart referans materyal kullanılarak yapılan çalışmada %Bias değerleri 25(OH) D_3 için %1,3 iken, 25(OH) D_2 için ise %2,8 olarak bulunmuş olup testin performansının yeterli olduğu değerlendirilmiştir. Abbott Architect cihazı kullanılarak yapılan karşılaştırmada her 2 testin performansı birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Her 2 yöntemin karşılaştırılması amacıyla çizilen Bland Altman grafiğinde aralarındaki ortalama Bias değeri 0.4 ng/mL gibi oldukça düşük bulunmuştur. Passing ve Bablok regresyon analizi yapılarak çizilen regresyon doğrusunun lineariteden sapmadığı belirlenmiştir ($P=0.37$). Literatürde Architect (5P02) 25(OH)D kiti, Elecsys Total D vitamini kiti (Roche diagnostics, Germany), Advia Centaur Total D vitamini kiti (Siemens, NY) ve ID-LC-MS/MS referans metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada Architect kitinin performansı yeterli görülmüşken, otomatize Total 25(OH)D testlerinin halen standardizasyona ihtiyaç duydukları bildirilmiştir(12). Architect 25(OH)D kitinin güncel olan 5P02 versiyonunun performansı ile ilgili literatürde rastlanan olumlu veriler yanında bir önceki versiyon olan 3L52 ile ilgili bias hedeflerini karşılamadığına dair veride rapor edilmiştir(13). Bu durum immün temelli

ölçüm yöntemlerinin performansının sürekli geliştirildiğini bize göstermektedir.

D vitaminin kemik iskelet patolojileri dışında literatürde kanserler başta olmak üzere depresyon ve hatta tüberküloz ile ilişkisini irdeleyen çalışmalara rastlamak mümkündür (4,14,15). Bu durum bilim insanlarının bu vitamine ilgisinin artmasına neden olurken, halkımızda da duyarlılığın artmasına ve sonuçta birçok hastane laboratuvarında analizinin yapılmasına neden olmaktadır. Ancak hasta başı test maliyetleri halen oldukça yüksek seyretmektedir. Bu nedenle bazı laboratuvarlar maliyetleri düşürmeye yönelik arayışlara girmek durumunda kalmışlardır. Bu nedenle yöntem seçiminde her laboratuvar için farklı dinamiklerin varlığı göz önünde tutulmalıdır. Çalışmada da gözlemlendiği üzere iki farklı yöntemle yapılan analizler arasındaki uyumun yeterli olması aslında doğruluk, tekrarlanabilirlik gibi verilerin yerini maliyet gibi başka dinamiklerin almasına neden olmuştur. HPLC kurulum maliyetlerinin LC-MS/MS'e göre düşük olması, laboratuvarda yeterince deneyimli personel varlığı, geliştirilen yöntemin ön hazırlığının ve analiz süresinin kısa olması gibi nedenlerin yanında maliyet-etkin olması bizim HPLC tercihimizde belirleyici olmuştur.

SONUÇ

Her laboratuvar 25(OH)D tayini amacıyla yöntem seçiminde içerisinde bulunduğu şartlara göre karar vermelidir. Yapılan çalışmada ve literatür verilerinden elde edilen verilere göre son yıllarda gerek immün gerekse kromatografik temelli yöntemler birbirleriyle kıyaslandığında çeşitli artı veya eksi yönleri bulunmakla birlikte analitik performansları birbirlerine yakındır. Ortaya çıkan farklarında klinik karar düzeyini etkileyecek düzeyde olmadığı düşünülmektedir. Bu sebeplerle laboratuvara 25(OH)D düzeyi tayini için yöntem seçiminde hasta sayısı, tecrübeli personel varlığı ve maliyet-etkin bir yöntem olması belirleyici parametreler olarak ön planda düşünülmelidir.

Teşekkür: Yöntem geliştirme sürecinde laboratuvarında gösterdikleri çalışmalarından dolayı Laboratuvar Teknisyenleri Aslı Tırnıvalı ve Mustafa Dolgun'a, Çalışmanın yapıldığı süreçte altyapının oluşturulmasında idari olarak destek sağlayan ve ilgili tarihlerde Balıkesir Atatürk Devlet Hastanesi Başhekimliği Op. Dr. Nazmi Başaran ve Balıkesir Kamu Hastaneleri Genel Sekreteri Op. Dr. Hasan Hocaoglu'na teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Hekimsoy Z, Dinç G, Kafesçiler S, Onur E, Güvenç Y, Pala T. Vitamin D status among adults in the Aegean region of Turkey. BMC Public Health 2010;10(782):1-7.
2. Taşkiran B, Cansu GB. Güneydoğu Bölgesinde Erişkinlerde D Vitamini Eksikliği. Osmangazi Journal of Medicine, 2016;38:1-8
3. Şenyiğit A, Orhanoğlu T, İnce B, Yaprak B. Vitamin D Levels in Routine Medical Examination. J Ist Faculty Med. 2018;81(4):115-118.
4. Baykan O, Akgül M, Uren N, Yaman A, Tinay I, Ergül E et al. The Relationship between Urothelial Type Bladder Cancer, Plasma 25-Hydroxyvitamin D Levels, and Vitamin D Receptor Apal, BsmI, FokI, and TaqI Polymorphisms. Clin Lab.2019;65:445-452.
5. Gordon CM, DePeter KC, Feldman HA, Grace E, Emans SJ. Arch Pediatr Adolesc Med. 2004; 158:531-537
6. Nesby-O'Dell S, Scanlon KS, Cogswell ME, Gillespie C, Hollis BW, Looker AC et al. Hypovitaminosis D prevalence and determinants among African American and white women of reproductive age: third National Health and Nutrition Examination Survey 1988-1994. Am J Clin Nutr 2002;76:187-92.
7. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D Insufficiency among Free-Living Healthy Young Adults. Am J Med. 2002;112(8): 659-662.
8. Bilinski K, Boyages S. Evidence of overtesting for vitamin D in Australia: an analysis of 4.5 years of Medicare Benefits Schedule (MBS) data. BMJ Open 2013;3:e002955. doi:10.1136/bmjopen-2013-002955
9. Caillet P, Goyer-Joos A, Viprey M, Schott AM. Increase of vitamin D assays prescriptions and associated factors: a population-based cohort study. Scientific Reports.2017;7:10361,DOI:10.1038/s41598-017-10263-8

10. Fraser WD, Milan AM. Vitamin D Assays: Past and Present Debates, Difficulties, and Developments. *Calcif Tissue Int.* 2013;92:118–127
11. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvanan V, Grant R. Optimization Of Protein Precipitation Based Upon Effectiveness of Protein Removal and Ionization Effect in Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2003;785:263–275
12. Lim YK, Park AJ, Kweon OJ, Choi JH, Performance Evaluation and Measurement Uncertainty Determination of the New Version of the Abbott ARCHITECT 25-OH Vitamin D 5P02 Assay. *Am J Clin Pathol* 2018;00:1-8.
13. Kulan P, Uras AR, Delibaş S, Durmuşcan M, Yıldırım S. 25-Hidroksivitamin D İmmün Ölçüm Yönteminin Analitik Performansı. *Türk Klinik Biyokimya Derg.*2016;14(3):181-188.
14. Can MŞ, Baykan H, Baykan Ö, Erensoy N, Karlıdere T. Vitamin D Levels and Vitamin D Receptor Gene Polymorphism in Major Depression. *Psychiatria Danubina*, 2017;29(2):179-185.
15. Wu YJ, Yang X, Wang XX, Qiu MT, You YZ, Zhang ZX, et al. Association of vitamin D receptor BsmI gene polymorphism with risk of tuberculosis: a meta-analysis of 15 studies. *PLoS One* 2013;8(6):e66944.