

Dosaggio del 25-OH-colecalciferolo: confronto tra il metodo di riferimento RIA ed un metodo HPLC

Milena Romanello¹, Gianpietro Colautti¹, Luigi Moro^{1,2}

¹Dipartimento di Biochimica, Biofisica e Chimica delle Macromolecole, Università degli Studi di Trieste, 34127 Trieste

²Centro per lo Studio delle Malattie Metaboliche dell'Osso, Università degli Studi di Trieste, Azienda per i Servizi Sanitari n.° 2 "Isontina", 34170 Gorizia

ABSTRACT

Measurement of 25-hydroxyvitamin D: comparison between the reference-RIA method and an HPLC method

The measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D (25-OH Vit D) is used for diagnosis of hypovitaminosis D which constitutes a major risk factor for osteopenia and bone fracture. The development of an analytical method, accurate and easy to apply, should be useful to measure the vitamin D status in patients presenting the risk of osteoporosis. We have performed a study for the evaluation of an HPLC test for the 25-OH Vit D measurement. We have determined the following performance characteristics: within-run and between-run precision, linearity and detection limit. Moreover, we have compared the HPLC results with those obtained with a RIA method, which is the reference one. The HPLC test proves to be sensitive, accurate, linear to values of 25-OH Vit D so high to be toxic, and easy to perform. The correlation with the RIA method seems to be good even though not optimal, but this is overcome by the advantages of precision of the HPLC method, especially useful in the longitudinal monitoring of patients which are treated with vitaminic compounds.

RIASSUNTO

La misura del 25-idrossicolecalciferolo (25(OH) vit. D₃) circolante viene correntemente utilizzata per monitorare lo stato di ipovitaminosi D, che rappresenta un fattore di rischio di osteopenia e di frattura ossea. Risulta quindi importante la determinazione dello stato vitaminosico D in pazienti a rischio di osteoporosi, utilizzando un metodo analitico preciso e facilmente applicabile. È stato pertanto eseguito uno studio per valutare le caratteristiche di un metodo HPLC per la misura della 25(OH) vit. D₃, rivelandone i parametri di precisione nella serie e tra le serie, la linearità ed il limite di sensibilità. Inoltre, i valori ottenuti sono stati confrontati con quelli di un metodo RIA, che attualmente è il metodo di riferimento per questo analita. Il metodo in HPLC è risultato essere sensibile, preciso, lineare fino a valori che permettono di diagnosticare una intossicazione di vitamina D, e facilmente applicabile. La correlazione con il metodo RIA appare buona anche se non ottimale, ma sufficiente alla luce dei vantaggi di precisione del metodo, utili soprattutto per monitorare longitudinalmente pazienti che entrino in terapia con preparati vitaminici.

INTRODUZIONE

La vitamina D è un composto appartenente alla classe dei secosteroidi che si forma nella cute per effetto della luce solare. La via di sintesi è la stessa che porta alla formazione del colesterolo; infatti il precursore della vitamina D è il 7-deidrocolesterolo che per effetto dei raggi ultravioletti, rompendosi l'anello B del ciclopentanoperidrofenantrene, si trasforma in colecalciferolo. Questo composto è biologicamente inerte e viene attivato da due successive idrossilazioni, la prima in posizione 25 operata da una idrossilasi epatica e la seconda in posizione 1, operata da una idrossilasi renale. Il metabolita attivo, 1,25 diidrossicolecalciferolo (1,25(OH)₂ vit. D₃), controlla la sua stessa sintesi sia attraverso un meccanismo diretto che regola con feed-back negativo l'attività 1- α -idrossilasica

renale, sia indirettamente attraverso la diminuzione del PTH circolante in quanto il PTH stesso stimola l'attività 1- α -idrossilasica. La diminuzione del PTH ha come causa sia l'aumento della calcemia indotta dall'1,25 diidrossicolecalciferolo, che l'interazione a livello delle paratiroidi dell'1,25 diidrossicolecalciferolo con il suo recettore.

L'1,25 diidrossicolecalciferolo partecipa all'omeostasi calcemica integrandosi nella sua azione con il paratormone (PTH) e la calcitonina. Esso ha effetto ipercalcemizzante grazie all'aumento dell'efficienza dell'assorbimento del calcio a livello intestinale e alla mobilizzazione del calcio a livello osseo.

La sintesi cutanea di vitamina è influenzata da alcuni fattori, come la pigmentazione della pelle (la melatonina è un eccellente protettore dei raggi UV), il tempo di esposizione alla luce solare e la superficie cutanea esposta (1).

Tali fattori giustificano la variazione stagionale dei livelli di vitamina che risultano massimi alla fine dell'estate e minimi alla fine dell'inverno. L'età influenza la capacità della cute di sintetizzare il colecalciferolo. In persone al di sopra di 70 anni, questa è ridotta di più del 70%, il che implica un ridotto assorbimento del calcio intestinale (1). La vitamina D è scarsa nei comuni alimenti a meno che non siano fortificati con specifiche aggiunte nel latte e suoi derivati, in alcuni cereali, e nel pane e suoi derivati, di vitamina D₂, un prodotto sintetico strutturalmente molto simile alla vitamina D₃.

Il deficit di vitamina D è un importante fattore di rischio di osteopenia e di frattura ossea (2-6). Numerosi studi hanno stimato nella popolazione non istituzionalizzata prevalenze di ipovitaminosi superiori al 50% che possono essere agevolmente corrette (7-10). La valutazione di uno stato ipovitaminosico e la sua correzione risultano pertanto essere un compito prioritario dell'intervento terapeutico volto alla riduzione del rischio di frattura.

La disponibilità di misurare la 25(OH) vit. D₃ con nuove metodiche permette quindi di estendere la determinazione di questo analita che, per una popolazione a rischio, come gli anziani e le donne in post-menopausa, deve essere considerato un esame di prima scelta. Per tutte queste ragioni, in questo lavoro abbiamo valutato le caratteristiche di un metodo di misura in HPLC della 25(OH) vit. D₃ e si sono confrontati i valori ottenuti con quelli di un metodo RIA, che attualmente è il metodo di riferimento per questo analita.

MATERIALI E METODI

I campioni di siero sono stati ottenuti dal sangue fornito in parte da soggetti volontari sani, in parte da pazienti ambulatoriali o ospedalizzati.

Per il dosaggio della 25(OH) vit. D₃ tramite HPLC si è utilizzato il kit della ditta Bio-Rad Laboratories. La preparazione del campione prevede l'aggiunta di 150 µl di Standard Interno e di tre diversi Reagenti di Precipitazione (150 µl di Reagente 1, 300 µl di Reagente 2 e 200 µl di Reagente 3) a 500 µl di siero. Il precipitato viene rimosso per centrifugazione, quindi 50 µl del surnatante vengono iniettati in un sistema HPLC isocratico. La separazione di 25(OH) vit. D₃, standard interno e vitamina A avviene utilizzando una colonna a fase inversa, termostata a 40°C. I picchi vengono rivelati spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 265 nm. La valutazione quantitativa degli analiti viene effettuata utilizzando un siero di concentrazione nota di 25(OH) vit. D₃ (Calibratore), e tenendo conto dell'altezza del picco dello standard interno, aggiunto nella stessa quantità in ogni campione. La concentrazione 25(OH) vit. D₃ nei campioni si ottiene quindi applicando la formula di seguito indicata:

Concentrazione nel campione = (F x h)

$$F = \frac{\text{Concentrazione di 25 (OH) vit. D}_3}{(\text{Altezza del picco della 25(OH) vit. D}_3 / \text{Altezza del picco dello standard interno})} \text{ nel Calibratore}$$

$$h = \frac{\text{Altezza del picco della 25(OH) vit. D}_3}{\text{Altezza del picco dello standard interno}} \text{ nel Calibratore}$$

I valori vengono espressi in nanogrammi per millilitro di siero.

Per determinare la correlazione tra i due metodi, i dati della 25(OH) vit. D₃, dosata con il metodo HPLC, sono stati confrontati con quelli ottenuti sugli stessi sieri, dosati con il metodo RIA (Nichols Institute Diagnostics), in un altro laboratorio. In questo metodo, 50 µl di estratto alcolico ottenuto da 100 µl di siero vengono incubati con una proteina legante la vitamina D e una piccola quantità di 25(OH) vit. D₃ triziata. Dopo tre ore di incubazione a 4°C, si aggiunge una sospensione di carbone rivestito di destrano per ottenere una separazione tra la vitamina combinata alla proteina legante e quella libera. Dopo altri 20 minuti di incubazione, il surnatante ottenuto in seguito a centrifugazione viene trasferito in apposite provette contenenti quantità costanti di liquido di scintillazione. Si misura quindi la radioattività della vitamina D triziata utilizzando un β-counter. La concentrazione di 25(OH) vit. D₃ nei sieri in esame viene determinata confrontando le misure ottenute dai campioni con quelle degli standards di concentrazione nota. I valori vengono espressi in nanogrammi per millilitro di siero.

RISULTATI

Precisione nella serie. Per determinare la precisione nella serie è stata dosata la concentrazione di 25(OH) vit. D₃ in 3 diversi campioni di siero 7 volte durante una singola seduta analitica. I risultati sono mostrati nella Tabella 1.

Precisione tra serie. Per determinare la precisione tra serie è stata dosata la concentrazione di 25(OH) vit. D₃ in 3 diversi campioni di siero in 6 diverse singole sedute analitiche. I risultati sono mostrati nella Tabella 2.

Linearità. Per determinare la linearità sono stati preparati 6 livelli di concentrazione di 25(OH) vit. D₃. Sono stati analizzati tre replicati di ogni livello di concentrazione. La valutazione è stata effettuata in un intervallo di concentrazione tra 0 e 140 ng/ml. La retta di regressione è mostrata in Figura I; i parametri della regressione sono riportati nella Tabella 3.

Limite di sensibilità. Per determinare il limite di sensibilità, un campione di siero è stato diluito fino ad ottenere una concentrazione di 5 ng/ml di 25(OH) vit. D₃. Il dosaggio è stato ripetuto 6 volte (Tabella 4).

Correlazione tra il metodo HPLC e il metodo RIA. Per determinare la correlazione tra i valori determinati con il metodo HPLC e il metodo di riferimento RIA è stata misurata la concentrazione di 25-idrossicolecalciferolo in 192 sieri con entrambi i metodi. La retta di regressione è mostrata in Figura II; i parametri della regressione sono riportati nella Tabella 5.

Tabella 1Componenti dell'imprecisione nella serie del metodo HPLC per la misura di 25-OH-Vitamina D₃

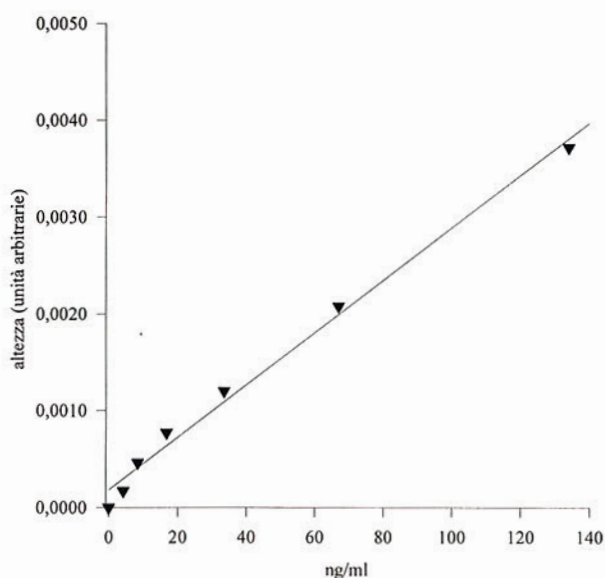
25-OH-Vitamina D ₃	Campione basso ng/ml	Campione medio ng/ml	Campione alto ng/ml
n	7	7	7
Media	29,88	50,69	124,21
Deviazione Standard	1,66	1,99	3,09
CV%	5,57	3,92	2,49

Tabella 2Componenti dell'imprecisione tra serie del metodo HPLC per la misura di 25-OH-Vitamina D₃

25-OH-Vitamina D ₃	Campione basso ng/ml	Campione medio ng/ml	Campione alto ng/ml
n	6	6	6
Media	28	50,01	125,4
Deviazione Standard	1,58	1,53	3,86
CV%	5,64	3,06	3,08

Tabella 3Parametri della regressione lineare relativi alla linearità del metodo HPLC per la misura di 25-OH-Vitamina D₃

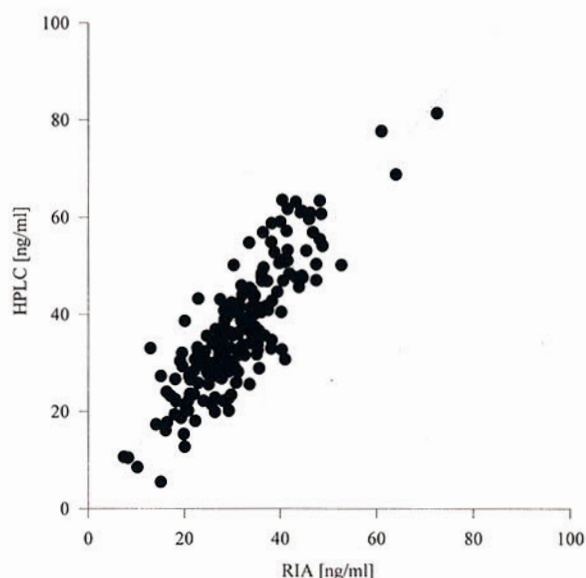
n	r	r ²	Regressione lineare
7	0,9953	0,9906	$y=2,7080 \cdot 10^{-5} x+1,7942 \cdot 10^{-4}$

**Figura I**

Linearità in funzione della concentrazione di 25-OH Vit D₃ per il metodo HPLC. In ordinata viene riportata l'altezza del picco di interesse in unità arbitrarie, in ascissa la sua concentrazione

DISCUSSIONE

Sebbene la forma biologicamente attiva della vitamina D è l'1,25- diidrossicalciferolo, è ampiamente accettato che la misura dei livelli circolanti di 25-idrossicalcalci-

**Figura II**

Confronto tra metodi per la determinazione della concentrazione 25-OH Vit D₃ nel siero: in ascissa viene riportata la concentrazione determinata con il metodo RIA, in ordinata quella determinata con il metodo HPLC

ferolo fornisce migliori informazioni sullo stato vitaminico (11,12). Esso è comunemente usato per diagnosticare la condizione di ipovitaminosi in quanto si correla in maniera inversa al livello di PTH (1). Il deficit di vitamina D ha infatti come conseguenza un ridotto assorbimento calcico ed un

Tabella 4Valutazione del limite di sensibilità del metodo HPLC per la misura di 25-OH-Vitamina D₃

	25-OH-Vitamina D ₃
n	6
Media	5,74
Deviazione Standard	0,7
CV%	12

Tabella 5Parametri della regressione lineare relativi al confronto tra il metodo HPLC e il metodo RIA per la misura di 25-OH-Vitamina D₃

n	r	r ²	Regressione lineare
192	0,8563	0,7333	y=1,14x + 0,92

iperparatiroidismo secondario atto a compensare la tendente ipocalcemia, attraverso la mobilizzazione del calcio a livello osseo. A sua volta questo fatto è responsabile della perdita di massa ossea e dell'aumento del rischio di frattura. La somministrazione di 25-idrossicolecalciferolo diminuisce rapidamente il tasso di PTH circolante; ciò ha indotto a definire la condizione di ipovitaminosi D non in termini di valori generici, ma in termini di valori ai quali il tasso ematico di PTH rientra nell'intervallo di riferimento (12).

Solo quando c'è il sospetto di un disordine acquisito o ereditario del metabolismo della 25(OH) vit. D₃ può essere ragionevole misurare le concentrazioni circolanti di 1,25(OH)₂ vit. D₃, le quali raramente e solo in specifici casi sono al di fuori dei valori di riferimento (11). Questi casi possono essere alcune situazioni cliniche come il rachitismo di tipo I o II, l'ipercalcemia nella sarcoidosi, la tubercolosi, le infezioni fungine, la malattia di Hodgkin, il linfoma e la granulomatosi di Wegener, situazioni nelle quali i meccanismi di produzione di 1,25(OH)₂ vit. D₃ sono svincolati dai controlli omeostatici sopra riportati (11). In queste patologie la produzione del metabolita è extrarenale, soprattutto ad opera dei macrofagi che possiedono una attività 25-(OH) colecalciferol-1- α -idrossilasica insensibile alla retroinibizione del prodotto della reazione.

Il metodo in HPLC è risultato essere sensibile, preciso, lineare fino a valori che permettono di diagnosticare una intossicazione di vitamina D, e facilmente applicabile. La correlazione con il metodo RIA appare buona anche se non ottimale, ma sufficiente alla luce dei vantaggi di precisione del metodo, utili soprattutto per monitorare longitudinalmente pazienti che entrino in terapia con preparati vitaminici.

In conclusione, per la somma di tutte le ragioni riportate, è auspicabile che il dosaggio del 25(OH) colecalciferolo possa essere più ampiamente diffuso, e ciò passa oltretutto attraverso una maggiore conoscenza della fisiopatologia anche alla disponibilità di metodi di dosaggio del metabolita, semplici ed affidabili, precisi ed accurati e possibilmente poco costosi.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano i dottori Maurizio Bevilacqua e Tarcisio Vago per le misure del 25-OH-colecalciferolo con il metodo RIA.

BIBLIOGRAFIA

- Holick MF. Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications. In: Favus MJ, editor. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, 4th edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA 1999;92-98.
- Parfitt AM. Osteomalacia and related disorders. In: Avioli LV, Krane SM, editors. Metabolic bone disease, 3rd ed. Academic Press, San Diego, California 1998;827-886.
- Gloth FM III, Tobin JD. Vitamin D deficiency in older people. J Am Geriatr Soc 1995;43:822-828.
- Meunier PJ. Prevention of hip fractures. Am J Med 1993;95,Suppl 5A:5A-75S-78S.
- Boonen S, Aerssens J, Dequeker J. Age-related endocrine deficiencies and fractures of the proximal femur. Implications of vitamin D deficiency in the elderly. J Endocrinol 1996;149:13-17.
- Baker MR, McDonnell H, Peacock M, Nordin BEC. Plasma 25-hydroxy vitamin D concentrations in patients with fractures of the femoral neck. Brit Med J 1979;1:589.
- Omdahl JL, Garry PJ, Hunt WC, Goodwin JS. Nutritional status in a healthy elderly population: vitamin D. Am J Clin Nutr 1982;36:1225-1233.
- McKenna MJ. Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. Am J Med 1992;93:69-77.
- Goldray D, Mizrahi-Sasson E, Merdler C, Edelstein-Singer M, et al. Vitamin D deficiency in elderly patients in a general hospital. J Am Geriatr Soc 1989;37:589-592.
- Gloth FM III, Gundberg CM, Hollis BW, Haddad JG Jr, Tobin ID. Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. JAMA 1995;274:1683-1686.
- 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.
- Thomas MK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, Shaw AC, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. New Eng J Med 1998;338:777-783.