

Il dosaggio della **Vitamina D3**: aspetti clinici e laboratoristici

QUALE METABOLITA DELLA VITAMINA D MISURARE?



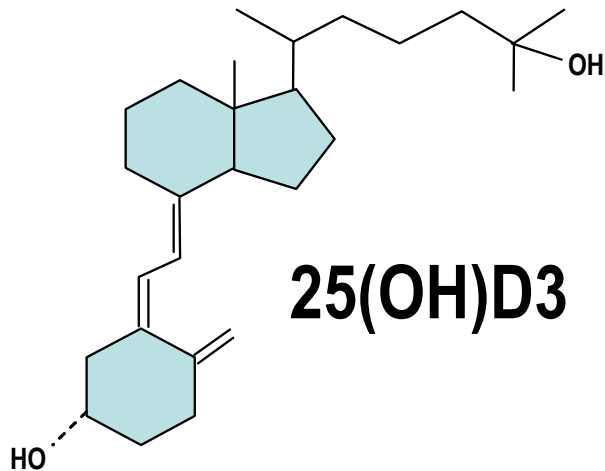
Il miglior indice dello stato vitaminico D è rappresentato dai livelli di:

$$25(OH)D = 25(OH)D3 + 25(OH)D2$$

Fornisce informazioni sulle riserve di vitamina D apportate dall'esposizione al sole, dalla dieta e dalla supplementazione.

Webb AR et al. Am J Clin Nutr (1990) 51: 1075-81; Reichel H et al. N Engl J Med (1989) 320:981-91.

PERCHE LA 25(OH)D?



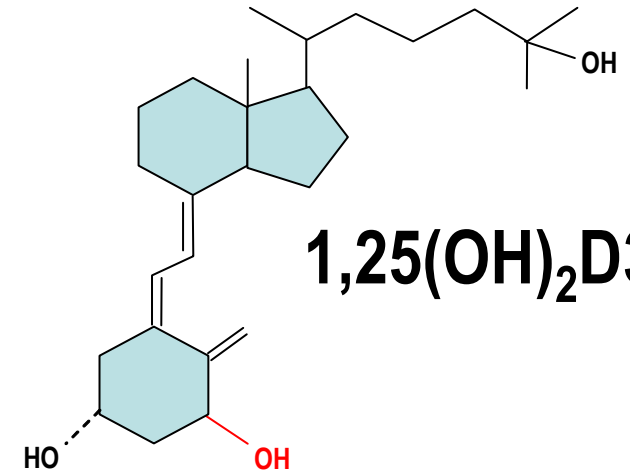
25(OH)D₃

CALCIDILOLO

- Precursore
- Emivita: 2-3 settimane
- [ematiche]: **ng/mL**, ossia 1000 volte quelle della 1,25(OH)₂D₃
- Risente poco di PTH e Ca²⁺

Proietti A. et al., G Gerontol 2014;62:142-149

VS



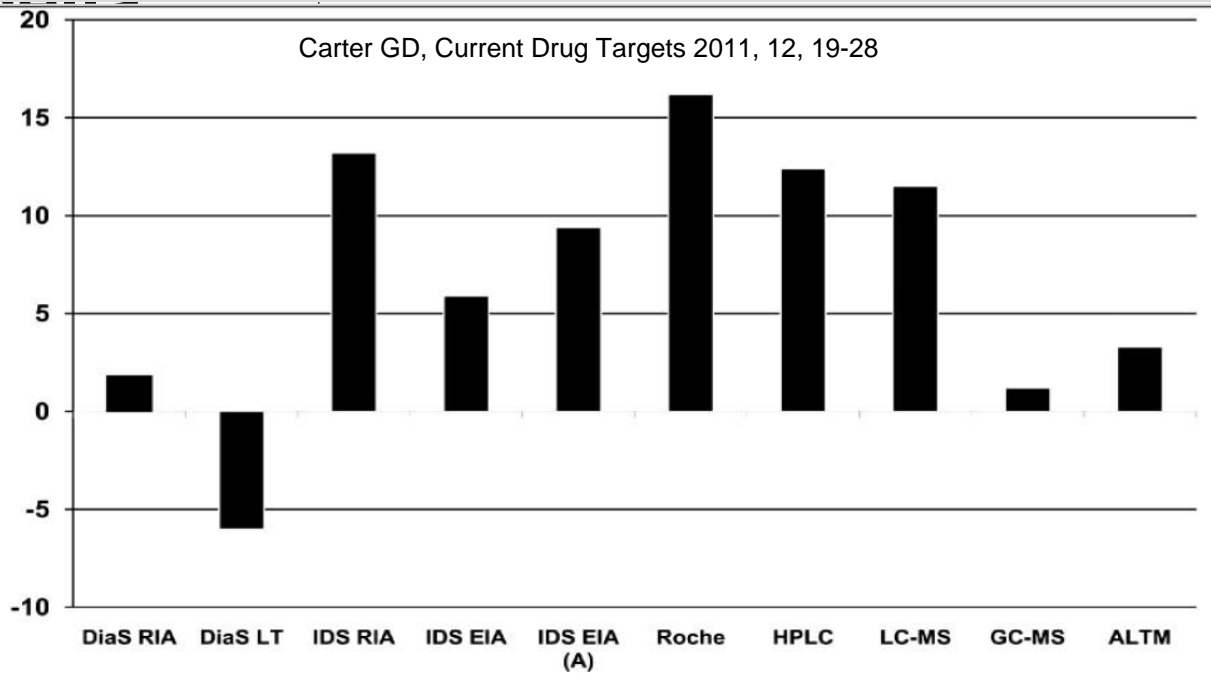
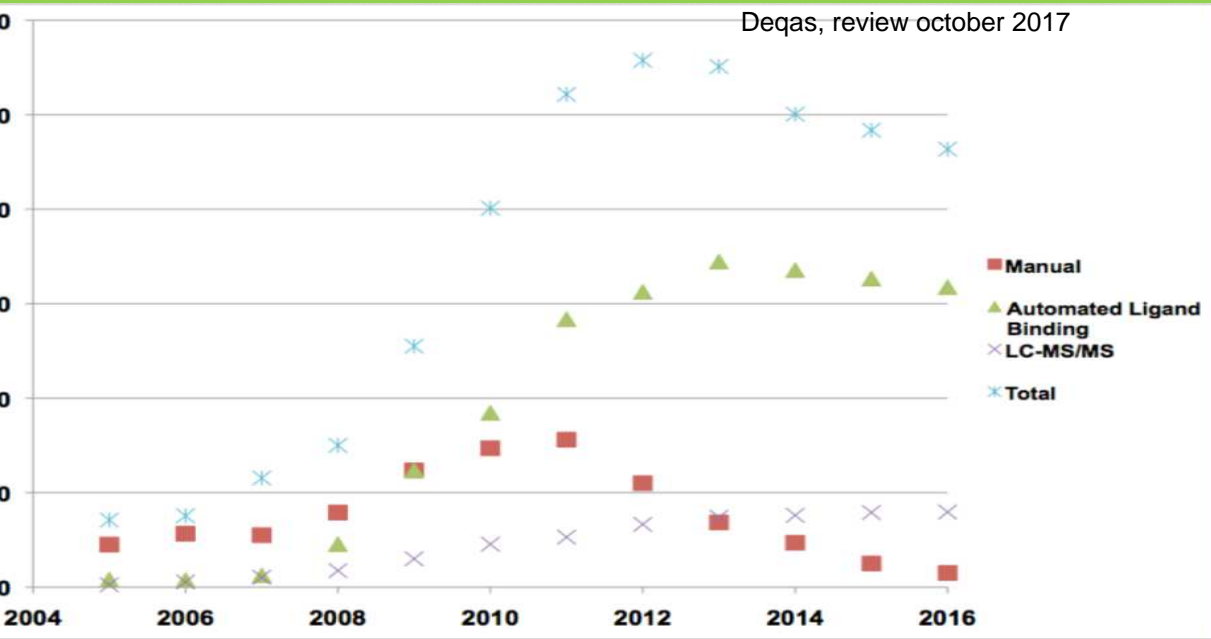
1,25(OH)₂D₃

CALCITRIOLO

- Forma attiva
- Emivita breve: 5-8 h
- [ematiche] ridotte: **pg/mL**
- influenzato dai livelli di PTH e Ca²⁺ (in modo piuttosto rapido)

Mazzaferro S, et al. Curr Vasc Phar-macol 2014;12:339-49.

QUALI METODICHE PER MISURARE LA 25(OH)D?



VANTAGGI

- Alta precisione e accuratezza
- l'estrazione minimizza l'effetto matrice
- riescono a discriminare simultaneamente 25(OH)D2 da 25(OH)D3

SVANTAGGI

- strumenti costosi (bassi costi per i reagenti)
- buon know-how del personale utilizzatore
- Elevati volumi di campioni (LC-MS/MS)
- non automatizzabili e per grandi volumi di lavoro
- difficoltà a separare il 3-e 25(OH)D da 25(OH)D

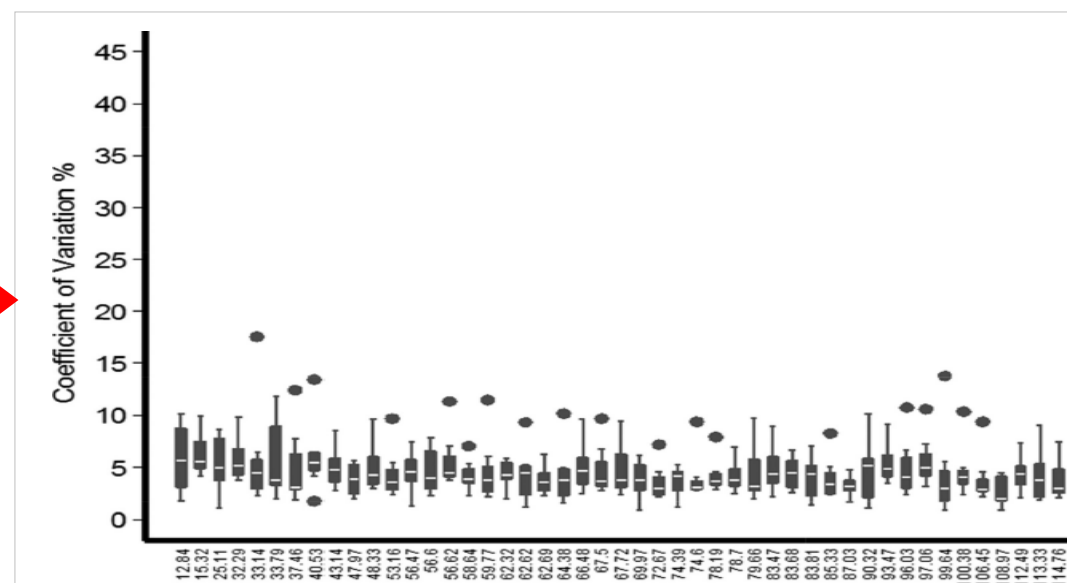
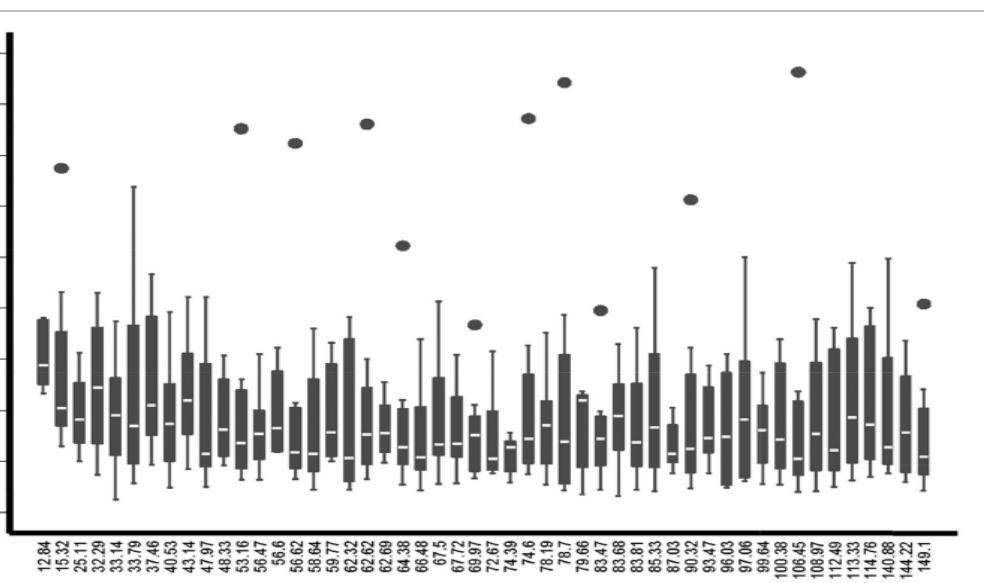
- alta sensibilità
- automatizzabili e per grandi volumi di lavoro
- tecnicamente semplici
- volumi ridotti di campione

- non riescono a discriminare simultaneamente 25(OH)D2 da 25(OH)D3
- variabilità tra lotti (per i kit che usano Ab policlonali)

VITAMIN D STANDARDIZATION PROGRAM (VDSP) - 2010

Element	Level 1			Level 2			Level 3			Level 4			Total Bias (mean) (%)	VDSP requirements fulfilled?
	Measured value (nmol/L)	Bias (%)	CV (%)	Measured value (nmol/L)	Bias (%)	CV (%)	Measured value (nmol/L)	Bias (%)	CV (%)	Measured value (nmol/L)	Bias (%)	CV (%)		
25-OH Vitamin D	74.5	1.6	3.1	49.1	3.7	1.6	83.8	0.9	0.9	70.6	-5.9	3.1	3.0	Yes
	75.6	3.1	0.5	47.2	-0.3	2.0	74.6	-10.2	1.8	75.9	1.2	0.1	3.7	Yes
1,25-Dihydroxyvitamin D	85.4	16.5	2.3	49.9	5.5	3.6	81.8	-1.5	2.4	104.3	39.0	2.8	15.6	No
25-Hydroxyvitamin D	83.1	13.4	1.6	56.1	18.6	4.1	77.4	-6.7	1.9	109.9	46.6	1.9	21.3	No
25-Hydroxyvitamin D ₃	66.5	-9.2	4.0	34.1	-27.8	9.1	77.6	-6.5	2.9	65.6	-12.5	0.0	14.0	No
25-Hydroxyvitamin D ₂	98.9	34.9	0.8	61.3	29.6	0.9	92.9	11.9	3.4	137.8	83.7	0.3	40.0	No

L.N. Bjerg, et al. *J Ster Biochem & Mol Biol* (2019) 190:224-231



PROBLEMATICHE IMMUNODOSAGGIO 25(OH)D

FETTO MATRICE

"25(OH) vitamina D:

un'analisi difficile"

or GD. Clin Chem 2012;58:486-8.

vitamina D è:

una **natura idrofobica**,

esiste in diverse forme

isomeri,

è strettamente legata alla sua

proteina di trasporto (**VDBP**),

il sero umano è una matrice

complessa, **ricca di lipidi** di

origine naturale, che possono

causare differenze di

specificità **con la proteina**

di trasporto (**VDBP**) della

vitamina D e quindi influenzare il

risultato del test.

È pertanto necessario un

pretrattamento del campione in

modo da staccare la vitamina D

dalla sua proteina di trasporto,

per una determinazione

accurata.

Anticorpi ETEROFILI

Sono **Ab umani endogeni** detti eterofili, perché capaci di legare Ig di altre specie animali (es. Ab umani diretti vs pt animali, FR, crioglob. e auto Ab).

Possono dare **risultati inattesi** nei **test di laboratorio** (prevalenza: ~0,5-10%), con un impatto clinico-diagnostico importante.

Perché molti sist. di dosaggio in laboratorio si basano su **reazioni immunologiche tra Ag e Ab** (gli Ab policlonali prodotti in diverse specie animali, i monoclonali sono per lo più murini).

L'uso di calibratori e controlli non allerta in alcun modo il laboratorista sull'esistenza del problema. È **solo la richiesta di aiuto** del clinico richiedente per l'interpretazione di un risultato non atteso, che fa attivare un campanello d'allarme e può evidenziare il fenomeno.

Perché **non** sono state dimostrate **differenze** significative nella **distribuzione del fenomeno** attribuibili a **caratteristiche demografiche e/o stili di vita**

BIOTINA

Utilizzata nel trattamento di patologie a carico di organi (sclerosi multipla); donne in gravidanza (favorendo il corretto sviluppo fetale), persone con alopecia; è aggiunta in prodotti per la cura di capelli, pelli e unghie → negli ultimi anni ad un progressivo aumento dell'assunzione di biotina (anche senza prescrizione o suggerimento medico), senza apparenti effetti collaterali.

La biotina forma legami ad alta affinità con diverse molecole (senza alterarne le proprietà strutturali e antigeniche), es. streptavidina e avidina (componenti essenziali di molti immunodosaggi).

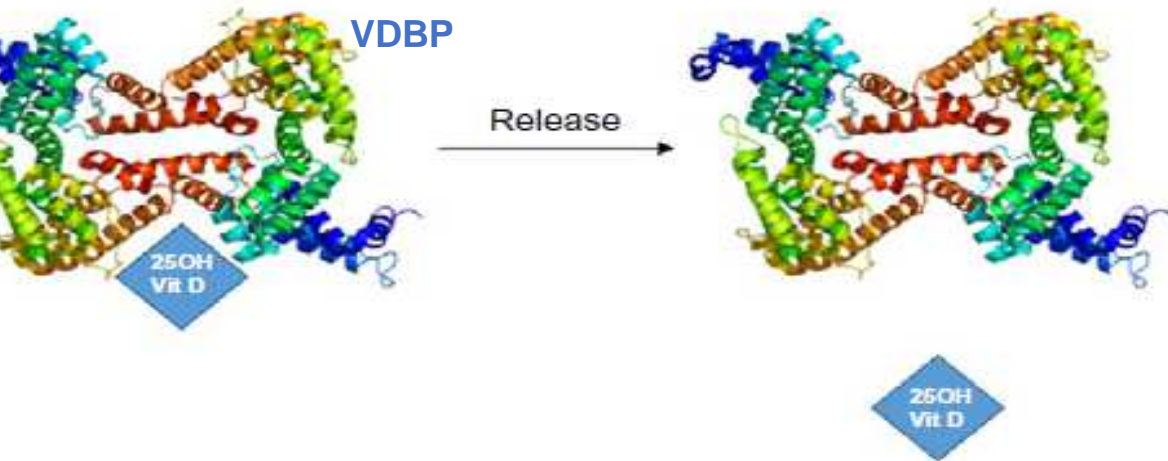
Gli Ab mono- o policlonali vengono coniugati con la biotina e fatti reagire con un campione del paziente. L'Ab biotinilato è poi catturato da una fase solida contenente streptavidina.

In pz che abbiano assunto alte dosi di biotina, il legame tra Ab biotinilato e la streptavidina in fase solida viene influenzato (immunodosaggi non competitivi la [25(OH)D] ↓, nei competitivi invece ↑).

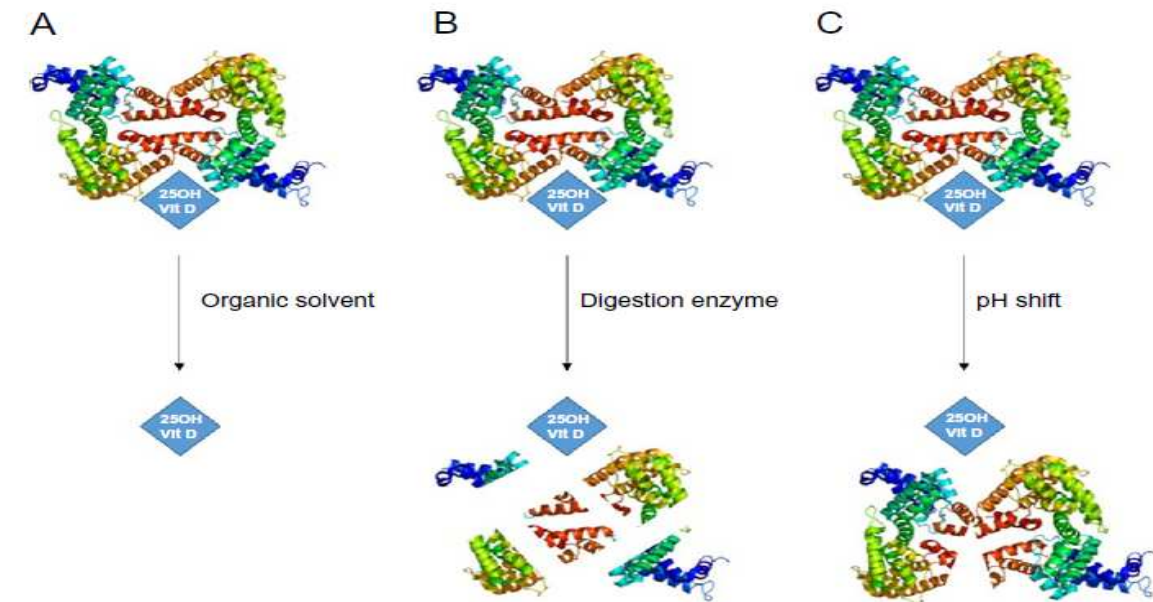
Maggiore è la [biotina] libera nel campione, maggiore è l'interferenza.

PROBLEMATICHE DOSAGGIO 25(OH)D - VDBP

Advances in Clinical Chemistry 78:59-101



Part I—Release of 25OH Vitamin D from the binding proteins



la vitamina D viene trasportata in circolo legata a proteine plasmatiche:

-15% all'albumina,
-85% ad una glicoproteina circolante denominata *Vitamin D Binding Protein* o VDBP

Per poter effettuare il dosaggio della vitamina libera è necessario separarla dalla sua proteina di trasporto VDBP, attraverso metodi di estrazione ed eliminare con:

• con acetonitrile o altre sostanze organiche, che migliorano il recupero di vitamina

• denaturazione attraverso un Δ di pH nei immunodosaggi automatizzati (provoca sottostima delle [vitamina D])

La [VDBP] può essere \neq a seconda del pz in esame

• le donne in gravidanza, le persone di colore hanno valori più \uparrow

• i pz dializzati e quelli in terapia intensiva hanno invece concentrazioni più \downarrow .

VITAMINA D – CONCETTO DI NORMALITÀ

25(OH)D unità di misura: **ng/mL** - nmol/L (SI)

Fattore di conversione 25(OH)D: $\text{ng/mL} \times 2,5 = \text{nmol/L}$



	25(OH)D ng/ml			
	Deficit ve	Carenza	Insufficienza	Sufficienza
Europa Centrale (Fiddowski 2013)	-	<20	20-29	≥ 30
Society for Adolescent Health and Medicine (2013)	-	<20	-	≥ 30
Australia/Nuova Zelanda (Paxton 2013)	5	-	-	≥ 30
AAP (AAP 2012-Golden 2014)	-	-	-	≥ 30
Consensus Vitamina D in età pediatrica (2015)	-	-	-	≥ 30
SIOMMMS (2016)	-	-	-	≥ 30
Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN) (2016) (in Bouillon 2017)	-	-	-	≥ 12
Netherlands (2012)	-	-	-	≥ 12
Institute of Medicine (IOM) (in Bouillon 2017)	-	-	12-19	≥ 20
European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) (in Bouillon 2017)	<10-11	-	12-19	≥ 20
Endocrine Society (in Bouillon 2017)	<10-11	12-19	19-29	≥ 30
International Osteoporosis Foundation (IFO) (2017)	<10-11	12-19	19-29	≥ 30
American Geriatrics Society (AGS) (2014) (in Bouillon 2017)	<10-11	12-19	19-29	≥ 30
Vitamin D Council and "a few experts" (in Bouillon 2017)	<10-11	12-19	20-39	≥ 40

No consensus



- **20 ng/mL** (50 nmol/L) appropriate nella popolazione generale
- **30 ng/mL** (75 nmol/L) appropriate per le categorie a rischio
(Cesareo R. et al., Nutrients **2018**, 10, 546)

INTERPRETARE I DOSAGGI DELLA VITAMINA D

20 ng/mL il limite oltre il quale viene garantito l'assorbimento ottimale di Ca dall'intestino e il controllo dei livelli di PTH nella quasi totalità del campione studiato



Livelli superiori a
20 ng/mL
NON conferiscono vantaggi clinici apprezzabili

Presso il Laboratorio Unico Provinciale (LUP) sono stati pertanto adottati i seguenti cut-off per i livelli sierici per definire le condizioni patologiche legate alla vitamina D:

AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA
LABORATORIO DI ANALISI UNICO PROVINCIALE – Direttore Dr.ssa Enrica Montanari
SC LABANALISI CHIM.CLIN e MICROBIOLOGIA

Segreteria Arcispedale S. Anna-CONA Tel. 0532 236250 (dalle 10:00-alle 12:00)-Segreteria Centro prelievi San Rocco Tel. 0532235655

Sig.ra NOME COGNOME GG/MM/AA
Via XXXXXXXXXXX, X
CITTÀ XXX
Sesso: X
Data Nascita: GG/MM/AAAA
Codice Fiscale: XXXXXXXXXXXXXXXXX
Id: nnnnnnn Tes. Sanitario: XXXX
Richiesta: XXXX del: GG/MM/AAAA
Provenienza: 346 DAY SERVICE ENDOCRIN. (3

[0] VITAMINA D (come 25-idrossi): CLIA 21.8 ng/ml < 20 Carenza >100 Tossicità

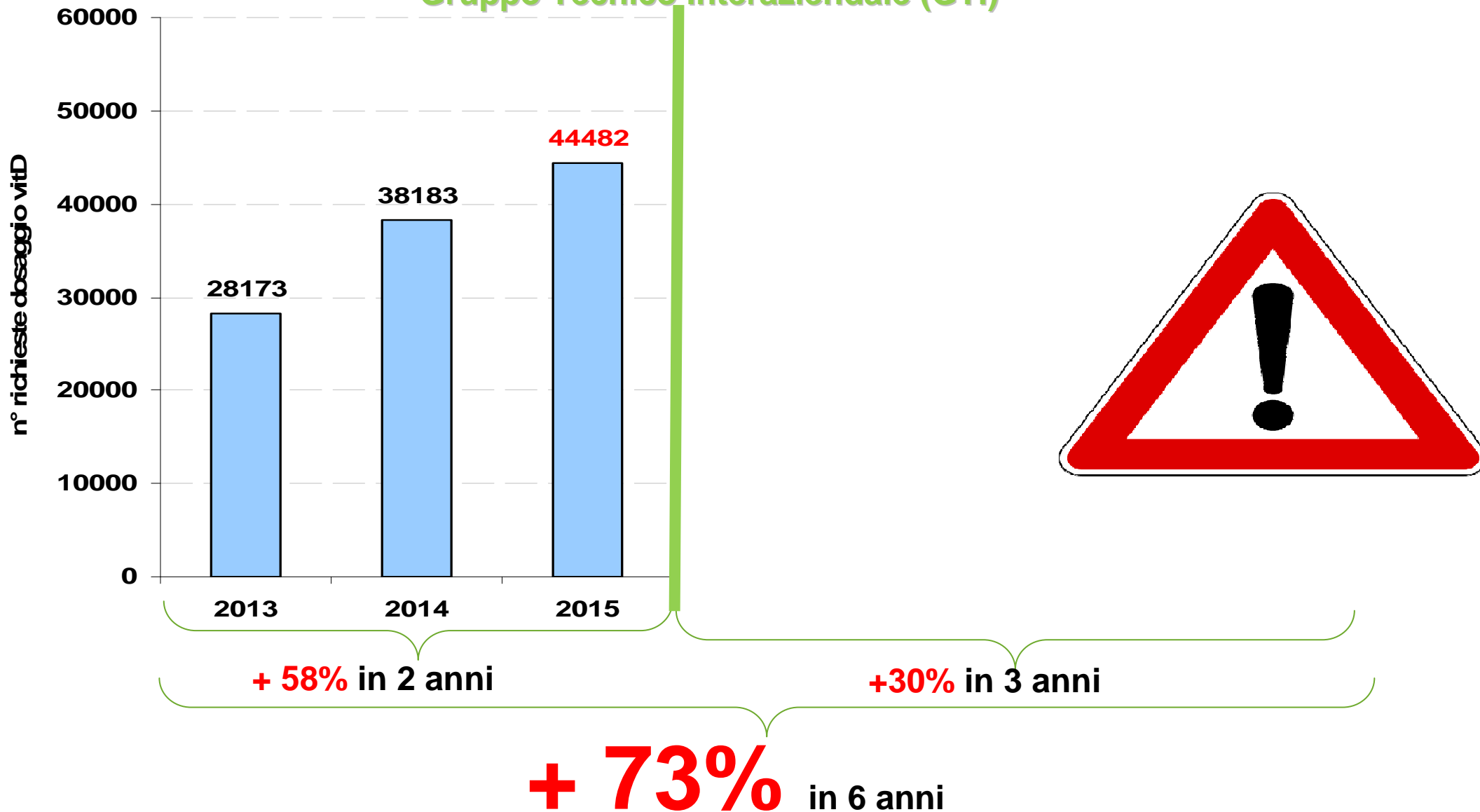
SITUAZIONE DOSAGGI VITAMINA D NELLA PROVINCIA DI FERRARA?



N° RICHIESTE DOSAGGIO VITAMINA D – LUP (2013-2019)

olazione residente in provincia di FE (dati ISTAT)	355.101	354.073	351.436	348.362	346.975	345.691	?
--	---------	---------	---------	---------	---------	---------	---

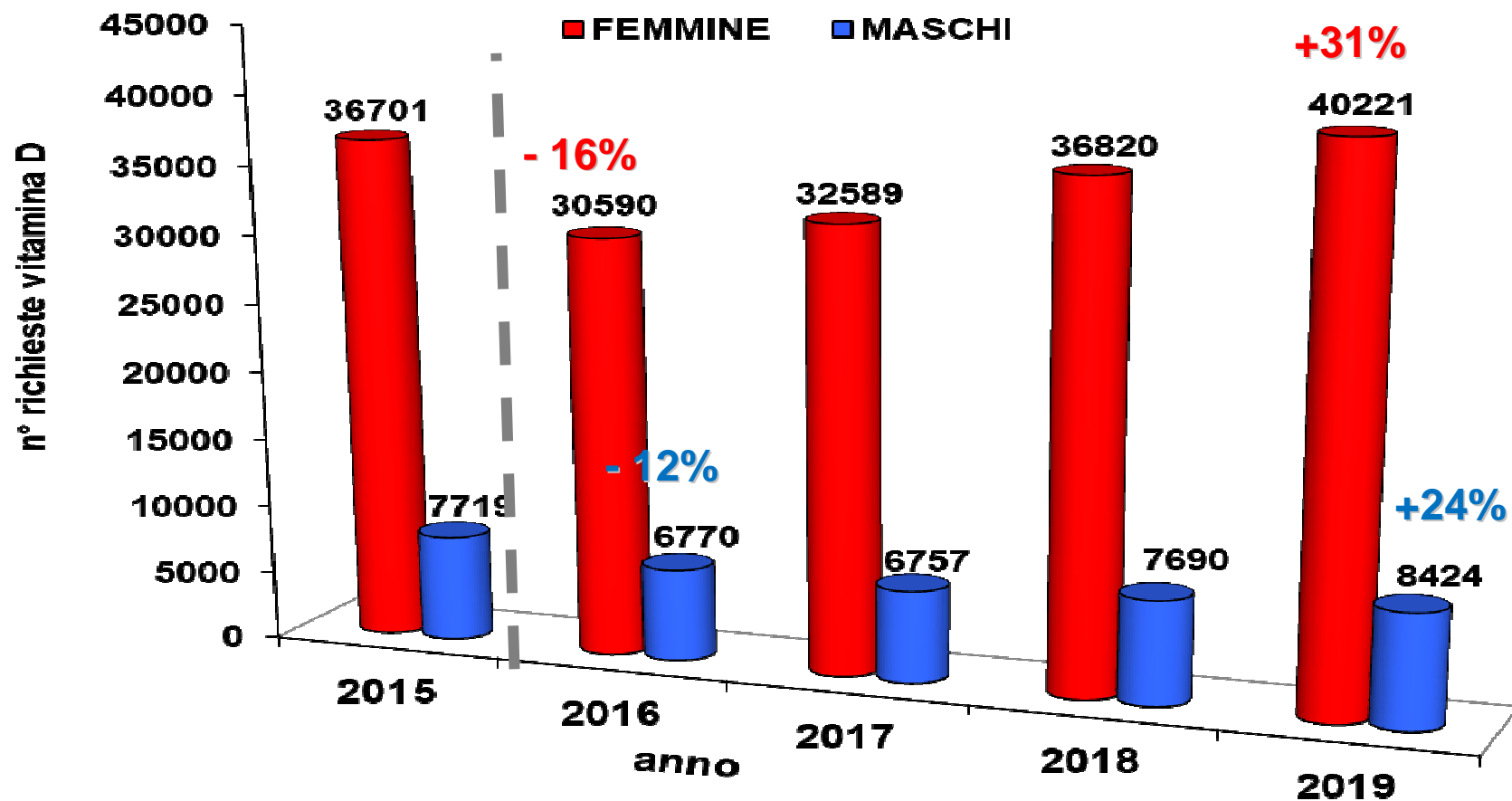
Gruppo Tecnico Interaziendale (GTI)



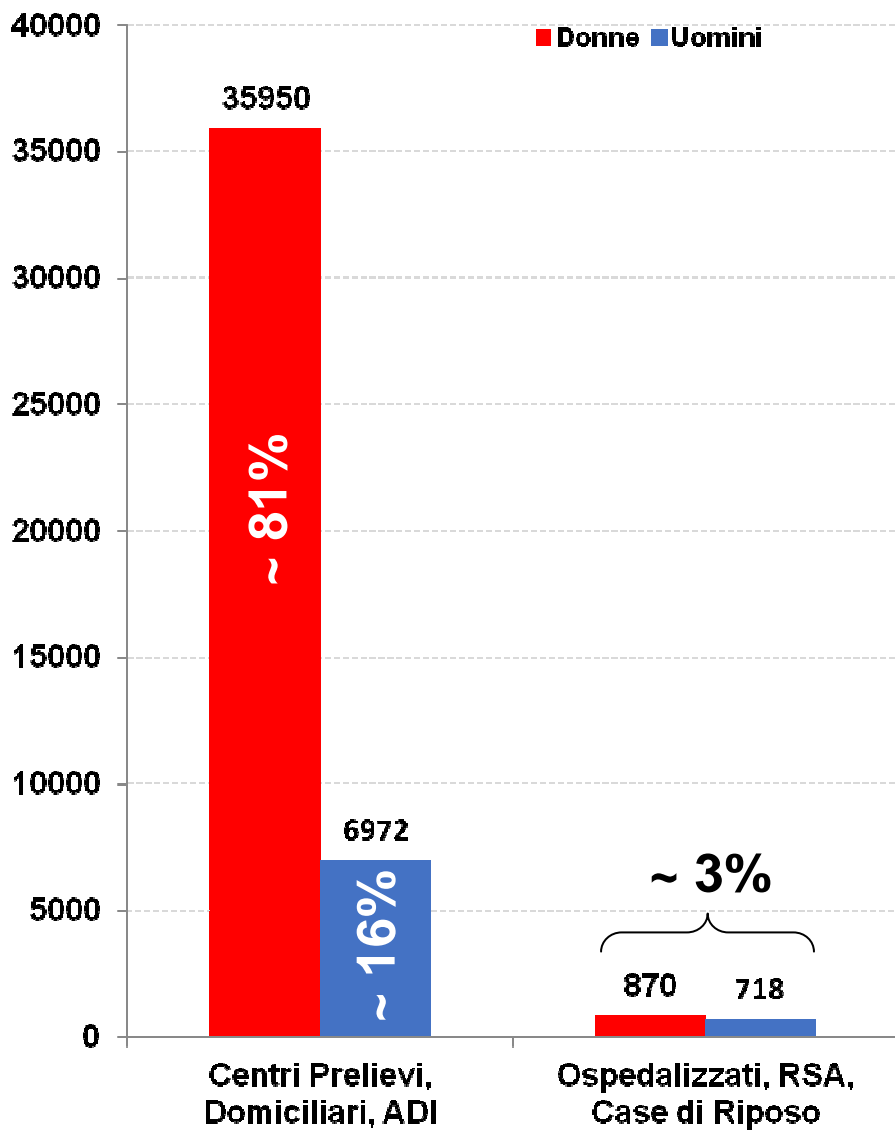
N° RICHIESTE DOSAGGIO VITAMINA D – LUP (2015-2019)

Popolazione residente in provincia di FE (dati ISTAT)

	2015	2016	2017	2018	2019
UOMINI	168.148	166.883	166.605	166.099	?
DONNE	183.288	181.479	180.370	179.592	?



N° DOSAGGI VITAMINA D PER PAZIENTI OSPEDALIZZATI E NON (2018)



N° DOSAGGI VITAMINA D PER ETÀ E GENERE (2018)

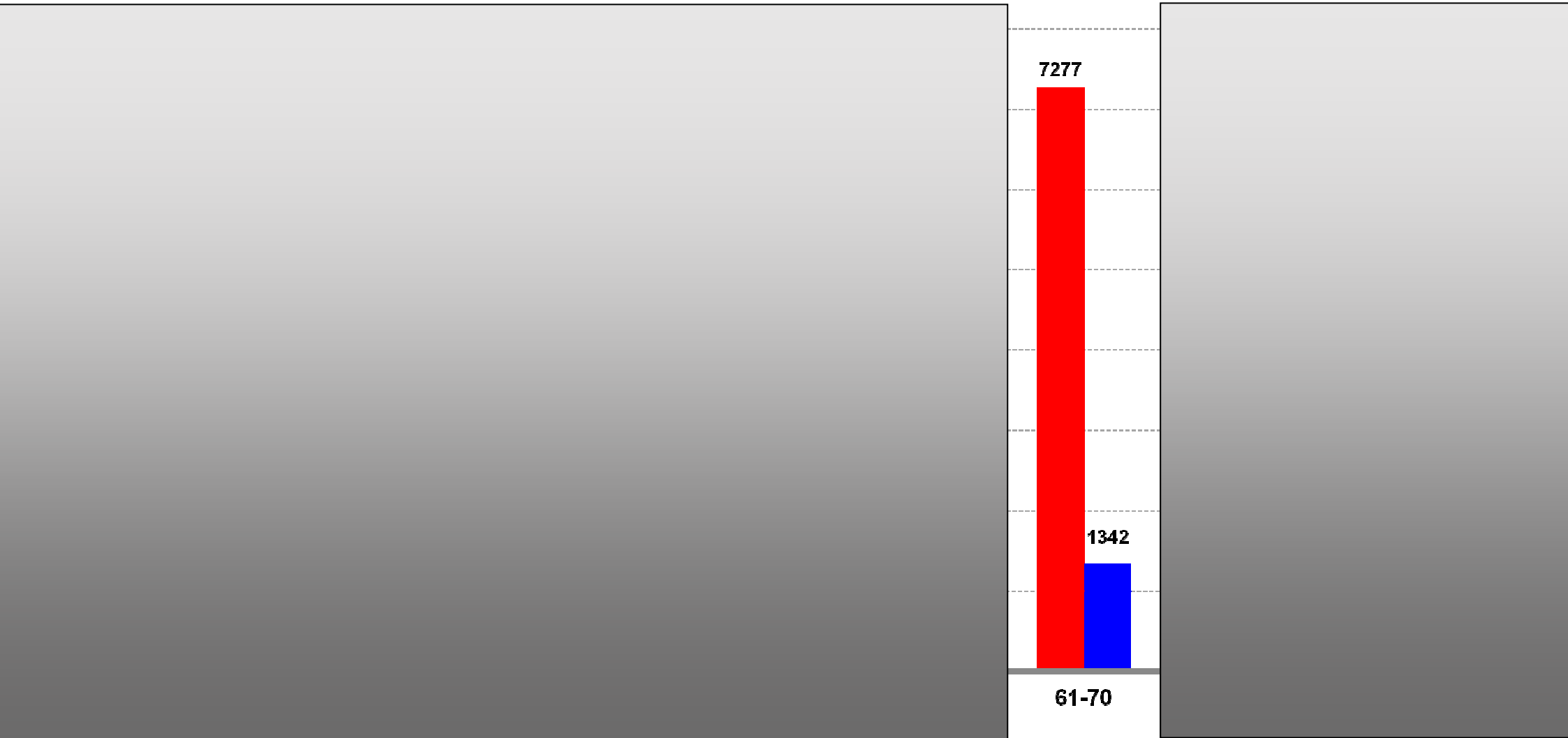
Popolazione residente in provincia di FE (dati ISTAT 2018)

12.167	10.050	14.950	17.383	26.841	27.610	22.640	18.816	10.331	1.4
11.871	13.050	13.559	17.272	26.824	28.779	25.352	22.453	16.128	4.2

7277

1342


61-70





Article

25-Hydroxyvitamin D Measurement in Human Hair: Results from a Proof-of-Concept study

Lina Zgaga ^{1,*}, Eamon Laird ¹  and Martin Healy ²

¹ School of Medicine, Trinity College Dublin, The University of Dublin, Dublin 2, Ireland; lairdea@tcd.ie

² Department of Biochemistry, St James's Hospital, Dublin 8, Ireland; mhealy@stjames.ie

* Correspondence: zgagal@tcd.ie; Tel.: +353-01-896-1545

Received: 8 January 2019; Accepted: 14 February 2019; Published: 18 February 2019



Abstract: Vitamin D deficiency has been implicated in numerous human diseases leading to an increased interest in assessing vitamin D status. Consequentially, the number of requests for vitamin D measurement keeps dramatically increasing year-on-year. Currently, the recognised best marker of vitamin D status is the concentration of the 25-hydroxyvitamin D (25(OH)D₃) in the blood circulation. While providing an accurate estimate of vitamin D status at the point in time of sampling, it cannot account for the high variability of 25(OH)D₃ concentration. In this proof of concept study we set out to provide evidence that 25(OH)D₃ can be extracted from hair samples in a similar fashion to steroid hormones. Two of the authors (L.Z. and M.H.) provided hair samples harvested from the crown area of the scalp and the third author (E.L.) provided beard samples. These samples, cut into 1 cm lengths, were weighed, washed and dried. 25(OH)D was extracted using a previously published steroid hormones extraction procedure. Blood samples were taken from the subjects at the same time as tissue samples were analysed using liquid-chromatography mass spectrometry. Hair samples showed presence of quantifiable 25(OH)D₃ with concentrations ranging from 11.9–911 pg/mg. The beard sample had a concentration of 231 pg/mg. Serum levels of 25(OH)D₃ ranged from 72–78 nmol/L. The results presented here confirm the feasibility of measuring 25(OH)D₃ in hair samples. The findings warrant further validation and development and have the potential to yield valuable information relating to temporal trends in vitamin D physiology.



TAKE HOME MESSAGE....



Importante che:

il metodo misuri ambedue le forme, sia 25(OH)D₂ che 25(OH)D₃, espresse come **25(OH)D totale**; i risultati siano espressi in **ng/ml** e non nmol/l (fattore di conversione 0,4).

MP. **consapevolezza** circa la possibilità, l'incidenza e le possibili **interferenze** che si possono presentare nel dosaggio della vitamina D – ma soprattutto **il dialogo tra il clinico e il laboratorista.**



THANK YOU

Don't Ask



**Coffe
break**

