

Original article

25-OH-vitamin D3 RIA 시약별 결과값 비교분석 및 유효성 평가

임슬기, 이영지, 이선호
서울아산병원 핵의학과

Comparative Analysis and Validation of Results by 25-OH-vitamin D3 RIA Reagents

Seul Gi Lim, Young Ji Lee, and Sun Ho Lee

Department of Nuclear Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea

Corresponding author: Sun Ho Lee. Department of Nuclear Medicine, Asan Medical Center, Seoul, Korea, 88, Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul, 05505, Republic of Korea. Tel: +82-2-3010-4573, E-mail: sunho@amc.seoul.kr

ABSTRACT

Purpose: When vitamin D3 is deficient in the body, it leads to osteoporosis, fractures at high risk. In addition, vitamin D3 deficiency is also associated with the pathogenesis of certain cancers and other diseases including multiple sclerosis, type 1 diabetes. In fact, the number of prescriptions for vitamin D3 requested to the Department of Nuclear Medicine at Asan Medical Center was increased. As such, the examination of vitamin D3 in the Department of Nuclear Medicine is a test that provides clinically meaningful indicators. However, due to the difficulty of stopping the production of the previously used vitamin D3 RIA reagent (DIA source ImmunoAsays®, Belgium) to measure vitamin D3, a validity assessment experiment was conducted on vitamin D3 RIA reagent (Shinjin, Korea). **Materials and Methods:** For about two months from February 1 to March 31, 2023, the result values of the two reagents were analyzed for various concentrations of vitamin D3 samples (N=45) requested to the our clinic. The effectiveness of the alternative reagent was evaluated using the correlation coefficient between the existing and alternative reagents. We also measured the correlation coefficient between the 25-OH-vitamin D (Total) and the vitamin D3 reagents and the correlation with high performance liquid chromatography/mass spectrometry (HPLC) was analyzed. In addition, we caculated the difference(%) of the target value of the DEQAS(vitamin D External Quality Assessment Scheme, UK). The inter assay, intra assay, analytical sensitivity and recovery were evaluated for alternative reagents. **Results:** The correlation coefficient between the existing and alternative vitamin D3 kits was close to 1 with $R^2=0.7556(p<0.001)$ and there was good correlation between the 25-OH-vitamin D(Total) kit and alternative vitamin D3 kit with $R^2=0.9409(p<0.001)$. The correlation coefficient between the alternative vitamin D3 kit and HPLC measurement was close to 1 with $R^2=0.8384(p<0.001)$. In case of difference(%) assessment with DECAS reagents, the alternative vitamin D3 kits showed 7.17, 10.90, 15.10, 20.63, 20.52 in January 2022 and 1.02, -0.42, -0.04, -13.62, -12.50 in July2022 respectively. As a result of measuring the intra assay, the Coefficient of Variation (CV) value of the alternative vitamin D3 kit were 13.35, 7.73, 9.28 in low, medium, high concentration respectively. In case of the intra assay, CV value were 14.65, 6.10, 7.25 in low, medium, high concentration respectively. Except the CV value of low concentration, they were acceptable. The analytical sensitivity was 0 ng/mL. But the recovery rate(%) performed not good enough at 30~162. **Conclusion:** Alternative reagents showed high correlation with existing reagents ($p<0.001$), 25-OH-vitamin D (Total), and high correlation with HPLC ($p<0.001$) and due to its high consistency with DEQAS materials, it is thought that reagents can be replaced and provide quantitatively reliable results. Considering that the normal level of the reference value of the alternative reagent is 30 to 150 ng/mL, it does not seem to be a major clinical problem, but further experiments need to be checked. Based on this, it is thought that even if the reagent of vitamin D3 is changed, accurate test data can be continuously provided.

Received November 13, 2024

Revised December 26, 2024

Accepted January 02, 2025

 This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY 4.0 license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Keywords: 25-OH-vitamin D3, RIA reagents, Correlation coefficient

서론

비타민(vitamin) D는 비타민 D2(ergocalciferol)와 비타민 D3(cholecalciferol)의 대표적인 2가지 형태로 이루어진다. 비타민 D2 농도는 비타민 D3의 1/1000정도에 불과하며, 체내 칼슘과 인의 농도 변화에 따라 주로 변동하므로 체내 비타민 D저장량을 판단하기 위한 목적으로 비타민 D3를 주로 측정한다[1]. 비타민 D3의 결핍은 암과 다발성 경화증, 제1형 당뇨병, 루푸스 홍반, 결핵을 포함한 다른 질병의 발병기전에도 관련이 있다[2]. 체내에 비타민 D3가 과다할 경우 체내 인의 결핍으로 저인산혈증과 고칼슘혈증을 일으킬 위험이 있으며, 특히 신생아 고칼슘혈증을 야기하여 성장부진 및 고혈압이 나타날 수 있다고 보고되어 있다[3]. 이렇게 비타민 D3가 인체에 주요한 영향을 미침에 따라 실제로 본원 핵의학과에 의뢰된 비타민 D3의 처방 건수는 2022년에 비해 24%가 증가하였고 내분비내과, 유방외과, 의학유전학센터, 정형외과 등 다양한 과에서 처방하여 유의미한 지표로 활용되고 있다. 그러나 비타민 D3를 측정하기 위해 기존에 사용하던 25-하이드록시비타민 D3(25-OH-vitamin D3-RIA (Radioimmunoassay) 시약(DIASource ImmunoAssays®, Belgium)의 생산이 중단되는 어려움이 있어 유일하게 대체로 사용가능 한 비타민 D3 RIA 시약(Shinjin, Korea)에 대한 유효성 평가를 실시하였다. 비타민 D3의 유일한 대체 시약에 대해 유효성을 평가 후 적용함으로써 지속적으로 정확한 결과를 보고하여 환자들에게 질 높은 진료 서비스를 제공하고자 한다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2023년 2월 1일부터 3월 31일까지 약 2개월 동안 본원에 의뢰된 검체 중 전체 농도 영역을 반영하는 비타민 D3 검체 45개를 대상으로 두 시약의 결과값을 분석하였고, 대체 시약의 유효성을 평가하였다.

2. 유효성 평가 방법

검사는 각 제조사별로 제시된 표준 실험 방법에 따라 실시하였다. 비타민 D3 기존 시약과 대체 시약과의 상관성을 평가하기 위해 45개의 동일한 검체를 대체시약으로 3회 측정하여 3회 각각의 상관계수와 3회 평균의 상관계수를 구하였다. 상관계수는 1에 가까우면 이상적이라 하였다. 그리고 위와 동일한 검체로 비타민 D3 시약과 25-하이드록시비타민 D(25-OH-vitamin D) 시약(DIASource ImmunoAssays®, Belgium)의 결과값을 비교하여 상관계수를 구하였고, 비타민 D3 시약과 정량 분석이 가능한 고성능 액체크로마토그래피/질량분석기(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)(Thermo Fisher Scientific Inc, USA)와의 상관성을 분석하여 두 시약의 정량 값에 대한 신뢰도를 평가하였다. 뿐만 아니라 DEQAS (Vitamin D External Quality Assessment Scheme, UK) 에서 판매하는 정도관리 물질을 사용하여 DEQAS 정도관리 물질의 비타민 D3 타겟 값과 기존 및 대체 시약의 비타민 D3 측정값의 Difference(%)을 분석하였다. 또한 대체 시약의 측정간 및 측정내 정밀도와 분석적 민감도 측정을 통해 유효성을 평가하였다. 비타민 D3 기존 시약 및 대체 시약은 방사면역측정법(Radioimmunoassay, RIA)을 사용하였고, 분석 시 사용한 자동 분주기는 Freedom evo(Tecan, Switzerland)이고, 감마선 계측기는 Dream Gamma10(Shinjin, Korea)를 이용하여 측정하였다. 통계 분석에는 Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA)과 SPSS(IBM Corporation, USA) 프로그램을 사용하여 paired t test 및 상관계수 분석을 시행하였다.

3. 검사 방법

비타민 D3 기존 시약의 검사 방법은 시험관에 검체 100 μ L, 표준액 100 μ L를 분주하고 샘플 처리액(acetonitrile) 500 μ L를 분주 후 충분히 섞는다. 그 후 실온에서 800-1,500 G의 속도로 5분간 원심분리를 하여 상층액을 추출한다. 추출한 상층액 100 μ L와 incubation buffer 400 μ L와 표지자 50 μ L를 항체가 피복된 시험관에 분주 후 실온에서 300-700 rpm으로 120분 동안 반응한다. 반응이 끝난 후 시약 내 세척액으로 2회 세척 후 감마선 계측기로 계측한다(Table 1).

비타민 D3 대체 시약의 검사방법은 항체가 피복된 시험관에 검체 50 μ L, 표준액 50 μ L, 샘플 처리액(acetonitrile) 200 μ L를 분주 후 실온에서 300 rpm으로 90분 동안 반응한다. 반응 후 상층액을 흡입하고 표지자를 모든 tube에 100 μ L 분주 후 실온에서 300 rpm으로 60분 동안 반응한다. 반응이 끝난 후 증류수로 2회 세척 후 감마선 계측기로 계측한다(Table 1).

Table 1. Overview of 25-OH-비타민 D3 RIA kits method.

	Vit D3 RIA Kit(DIASource ImmunoAssays®, Belgium)	Vit D3 RIA Kit(Shinjin, Korea)
Calibrator, Control, Sample	100 μ L	50 μ L
Acetonitrile	500 μ L	200 μ L
Centrifugation	R.T* 800-1,500 G, 5 min	R.T 300 rpm 90 min
Supernatant	100 μ L	Aspiration
Incubation Buffer	400 μ L	-
Tracer	50 μ L	100 μ L
Incubation	R.T 300 rpm, 120 min	R.T 300 rpm, 60 min
Washing	W.S** 2 mL twice	D.W 2 mL twice
Gamma counting	1 min	1 min

R.T*: Room temperature

W.S**: Washing solution

결과

1. 시약 간 측정 상관관계수 검정

비타민 D3 검체를 대체 시약으로 3회 반복 실험한 결과 기존 시약과 대체 시약의 상관관계수는 각 0.80, 0.66, 0.76이며 3회 반복 실험한 평균과의 상관관계수는 0.77로 모두 양의 상관관계이며 두 집단 간 유의 수준 내 차이가 없다($p > 0.05$)(Fig.1).

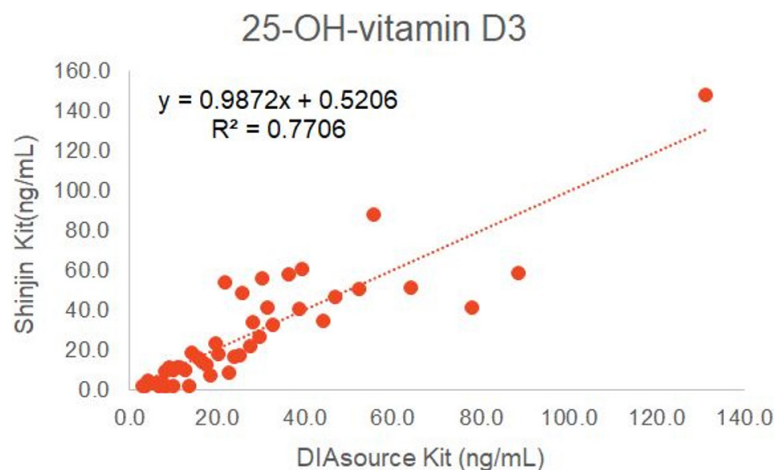


Fig. 1. This is the correlation between Vit D3 RIA Kit(DIASource ImmunoAssays®, Belgium) and Vit D3 RIA Kit(Shinjin, Korea).

그리고, 동일한 검체로 비타민 D3 기준 시약과 비타민 D(Total) 시약 간의 상관관계를 분석한 결과 양의 유의한 상관관계가 나타났으며($r=0.72, p>0.05$), 비타민 D3 대체 시약과 비타민 D(Total)양의 유의한 상관관계가 나타나서($r=0.94, p>0.05$), 비타민 D3 대체 시약과 비타민 D(Total) 시약간의 상관성이 높은 것으로 확인되었다(Fig.2).

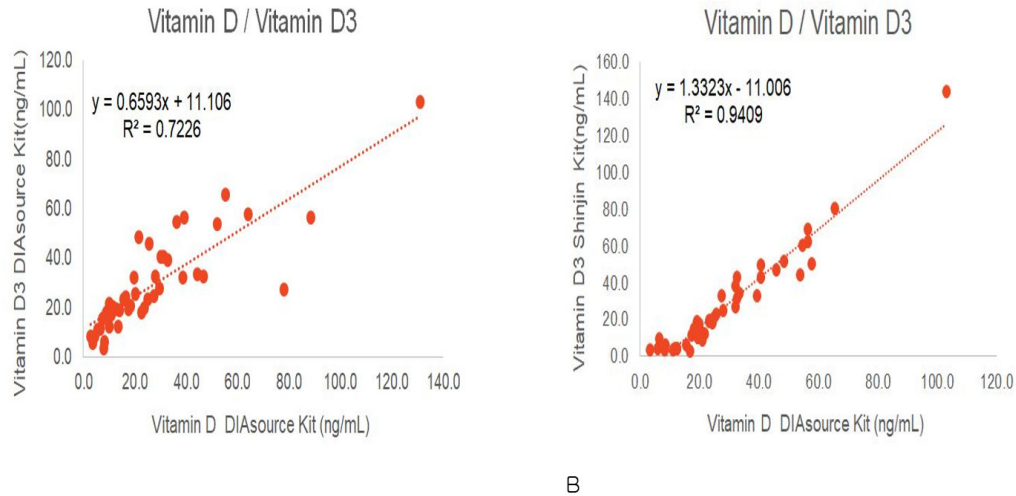


Fig. 2. This is the correlation between Vit D3 RIA Kit and and Total Vit D RIA Kit(Diasource ImmunoAssays®, Belgium).

마지막으로 동일한 검체로 비타민 D3 기준시약과 HPLC 간의 상관성은 양의 유의한 상관관계가 나타났으며($r=0.62, p>0.05$), 대체 시약과 HPLC 간의 상관성도 양의 유의한 상관관계가 나타났다($r=0.84, p>0.05$), 비타민 D3 대체 시약과 HPLC 간의 상관계수가 0.84으로 기준 시약 보다 상관성이 높은 것으로 확인되었다(Fig.3).

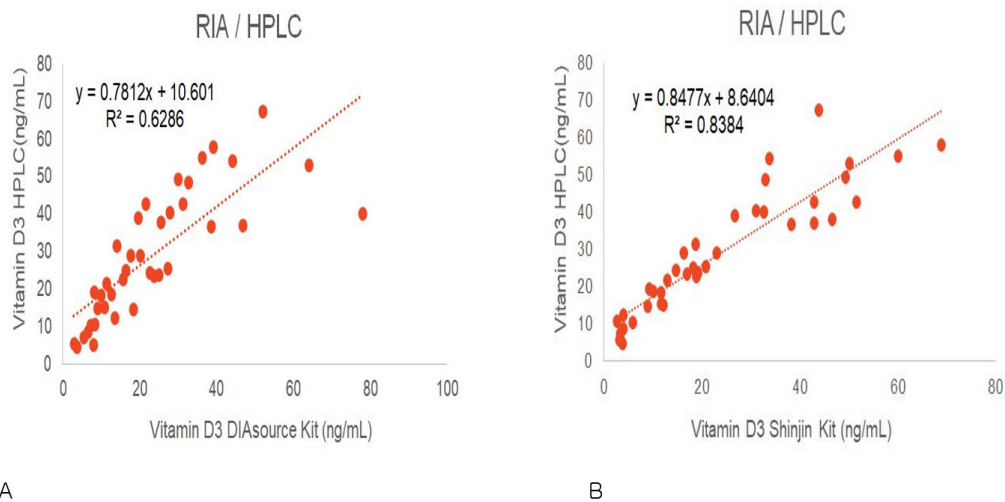


Fig. 3. This is the correlation between Vit D3 RIA Kit and Vit D3 using HPLC.

2. DEQAS(비타민 D External Quality Assessment Scheme, UK) 물질 측정

DEQAS는 비타민 D 측정값의 분석적 신뢰성을 얻기 위해 설립된 기관으로, CLSI 37-A를 기준으로 정도관리물질을 만들어 결과값을 제공한다. DEQAS 정도관리물질 중 January 2022의 606, 607, 608, 609, 610과 July 2022의 616, 617, 618, 619, 620로 총 10개의 물질을 RIA 기준 및 대체시약으로 검사하였다. DEQAS 정도관리물질과의 difference(%) 값은 비타민 D3 RIA 기준 시약이 January 2022에서 각각 -69.22, -74.02, -48.86, -10.05, -54.07이고 July 2022에서 각각 -52.03, -20.30, -8.75, -40.41, -15.90로 측정되었다. 비타민 D3 대체 시약은 January 2022에서 각각 7.17, 10.90, 15.10, 20.63, 20.52 이고 July 2022에서 각각 1.02, -0.42, -0.04, -13.62, -12.50로 측정되었다. 병행검사(parallel test)시 difference(%)의 허용기준은 저농도는 20%이내, 중고농도는 10%이내로 정하고 있다. 이러한 기준으로 판단할 때에는 정도관리물질과의 difference(%) 값은 대체 시약이 기준 시약보다 더 유의한 값을 나타내었다(Table 2).

Table 2. The comparison of difference(%) between DEQAS 25-OH-VitD3 and two kit values.

	Sample No.	DEQAS Target (ng/mL)	Vit D3 RIA Kit(DIAsource)	Difference(%)	Vit D3 RIA Kit(Shinjin)	Difference(%)
January 2022	606	40.99	24.22	-69.22	44.15	7.17
	607	34.46	19.80	-74.02	38.67	10.90
	608	21.67	14.56	-48.86	25.53	15.10
	609	11.70	10.63	-10.05	14.74	20.63
	610	22.76	14.77	-54.07	28.63	20.52
July 2022	616	24.28	15.97	-52.03	24.53	1.02
	617	23.40	19.45	-20.30	23.30	-0.42
	618	16.87	15.51	-8.75	16.86	-0.04
	619	15.30	10.90	-40.41	13.47	-13.62
	620	11.14	9.61	-15.90	9.90	-12.50

3. 정밀도 측정

비타민 D3 대체 시약의 측정간 및 측정내 정밀도를 검사하여 평균값, 표준편차(Standard Deviation, SD), 변이계수(Coefficient of variation, CV)(%)를 구하였다. 측정간 정밀도는 저, 중, 고농도에서 측정 batch를 달리하여 3회 측정하였고 각각 13.35, 7.73, 9.28의 변이계수를 나타내었다(Table 3). 측정내 정밀도는 저, 중, 고농도에서 한 batch에 5회 측정하였고 각각 14.65, 6.10, 7.25의 변이계수를 나타내었다. 본원에서는 정밀도의 허용범위를 10%이내(저농도의 경우 15%이내)로 정하고 있다. 이러한 기준으로 정밀도는 유의한 값을 나타내었다(Table 3).

Table 3. Inter assay precision and Intra assay precision of Vit D3 RIA Kit(Shinjin, Korea)

	Low concentration	Medium concentration	High concentration
Inter assay(ng/mL)	13.9	41.0	78.4
	14.1	46.8	73.4
	11.0	41.1	88.0
Mean(ng/mL)	13.0	43.0	79.9
SD *	1.73	3.32	7.42
CV ** (%)	13.35	7.73	9.28
	Low concentration	Medium concentration	High concentration
Intra assay(ng/mL)	11.0	50.5	58.9
	13.8	57.1	57.6
	14.8	55.2	58.5
Mean(ng/mL)	13.3	52.7	61.6
SD *	1.95	3.21	4.46
CV ** (%)	14.54	6.10	7.25

*SD : Standard deviation

**CV : Coefficient of variation

4. 분석적 민감도 측정

비타민 D3 대체 시약 내에 있는 0 표준액을 10회 측정하여 cpm (count per minute)의 평균과 표준편차를 구하고 cpm의 평균값 $\pm$ 2SD에 해당하는 농도를 민감도로 한다. 0 표준액 측정시 해당 실험의 표준액보다 cpm이 높게 측정되어 농도값은 <0 ng/mL이나, 임상적으로 적용할 시에는 2.0 ng/mL를 최저 농도로 하였다.

결론

체내 비타민 D3가 부족하면 골다공증, 암, 당뇨병 등의 다양한 질병이 발병할 가능성이 높아지며, 과할 경우 신생아에서 성장부진과 고혈압을 유발한다. 이러한 비타민 D3는 비타민이자 호르몬이라고 보는 견해가 있을 만큼 핵의학 체외검사에서도 큰 비중을 차지하고 있다[4].

비타민 D3 기존 시약의 생산이 중단될 시 대체로 사용 가능한 시약은 비타민 D3 RIA 시약(Shinjin, Korea)으로 유일하여 대체 시약의 유효성 평가 실험이 중요했다. 대체 시약의 분석적 민감도 및 정밀도는 우수한 결과를 나타내었다. 그리고 대체 시약과 기존 시약의 상관성은 $r=0.87$, 대체 시약과 비타민 D(Total)의 상관성은 $r=0.97$, 대체 시약과 HPLC 결과와의 상관성은 $r=0.92$ 로 우수한 상관성을 보였으며, DEQAS 정도관리물질과의 높은 일치성을 보였다. 대체 시약은 기존 방법과는 달리 복잡한 추출 단계가 없어 검사자의 편의성이 향상되고 검사 과정의 오류 발생이 감소될 수 있을 것으로 보이며, 보고 시간이 단축되어 신속하게 결과를 보고할 수 있을 것으로 판단된다.

그러므로 비타민 D3 기존 시약이 단종되어 대체 시약으로 변경이 되어도, 지속적으로 신뢰성 있는 결과를 보고함으로써 환자들에게 질 높은 진료 서비스를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Kim YS, Kim JN, Kim JT, Kim HS, Park JM, Park JY, et al. Diagnostic nuclear medicine. 1st edition. J Korean Med Sci. 2024:P156
2. Heaney RP, Armas LA, Shary JR, Bell NH, Binkley N, Hollis BW. 25-Hydroxylation of Vitamin D3: relation to circulating Vitamin D3 under various input conditions. Am J Clin Nutr. 2008;87(6):1738-1742
3. Kim HS. Calcium and Phosphorus Metabolism Evaluation and Illness in Newborns. Korean J Pediatr. 2007;50(3):230-235.
4. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An Update on Vitamin D Metabolism. Int J Mol Sci. 2020;21(18):6573