

سنجش ویتامین D: کاستی ها و توانایی ها

حسین بیات - دانش آموخته ی آزمایشگاه

پس زمینه

تا یک دهه پیش سنجش ویتامین D تنها هنگام بررسی تراکم استخوان بیمار، و بیشتر برای بررسی بیماری های راشیتیزم و استئومالاسی آزمایش می شد. اما هم اکنون، پژوهش های بسیاری به نقش این پرو هورمون در وضعیت های گوناگون دیگر همانند برخی از سرطان ها، دیابت نوع ۱، مالتیپل اسکلروز، سل، بیماری آلزایمر، پسونیازیس، و در مرگ و میرهای با علت های دیگر، اهمیت می دهند.

همچنین نقش ویتامین D به عنوان یکی از مکانیسم های بسیار مهم تبدیل پیام در چند ارگان مانند مغز، پروستات، سینه، بافت کولون و سلول های ایمنی روز به روز بیشتر آشکار می شود. این اندام ها گیرنده ی ویتامین D دارند و به 1,25-OH D پاسخ می دهند.

هم زمان با وجود پیشرفت های چشمگیر در روش های سنجش ویتامین D، اختلاف نظر پیرامون برخی روش ها، و سردرگمی چشمگیری در زمینه های نتیجه های آن و تفسیر بالینی، سبب شده است که آزمایشگاهیان و پزشکان نسبت به شیوه ی اجرا یا تفسیر درست آزمایش دچار تزلزل شوند. در زیر به جنبه های گوناگون مشکل ها در این زمینه پرداخته می شود.

افزایش درخواست

1,25-OH D در یک چهارم آزمایشگاه ها حدود ۲۵٪ و در ۱۳٪ آزمایشگاه ها ۵۰٪ یا بیشتر رشد داشت، چیزی که به نظر می رسد با اندیکاسیون محدود این آزمایش برای ارزیابی بیماری پاراتیروئید و اختلال های متابولیسم کلسیم همخوانی ندارد.

به باور دکتر Ravinder Singh (آزمایشگاه اندوکرینولوژی، درمانگاه مایو، PhD) شمار آزمایش ویتامین D که اکنون انجام می شود، چندان برپایه ی دلیل ها و دآوری های درستی استواری نیست.

سالانه میلیون ها آزمایش انجام می شود، که بیشتر باعث سردرگمی پزشکان می شود. دلیل این سردرگمی آن است که این آزمایش را برای جمعیت درست بیماران انجام نمی شود.

اگرچه هنوز مکانیسم کار ویتامین D در پیشگیری از یا پیشبرد بیماری های گوناگون به درستی شناخته نیست، اما انتشار پژوهش ها به وسیله ی رسانه های گروهی سبب شده است که درخواست آزمایش ویتامین D رشد فزاینده ای داشته باشد.

در یک بررسی که در سال ۲۰۰۹ در امریکا به وسیله مجله ی CLN برای ارزیابی رشد درخواست آزمایش 25-OH D انجام شد، دیده شد که در بیش از ۵۰٪ از آزمایشگاه های بررسی شده، درخواست این آزمایش دست کم سالانه ۱۰٪ رشد داشته است و در ۲۷٪ آزمایشگاه ها این رشد بیش از ۱۰۰٪ بوده است.

نکته ی دیگری که جای توجه داشت، این بود که درخواست

جدیدتر این روش و نیز روش های پیشرفته تری مانند HPLC و LCMS به بازار آمده اند.

پژوهش های گوناگون نشان داده اند که در روش های سنجش OH D-25 کاستی هایی هست ، گوناگونی در روش های آزمایش در آزمایشگاه های مختلف ، سبب ناهماهنگی در نتیجه ها برای یک بیمار می شود.

Rao در مرکز پزشکی UMass Memorial، نتیجه های بیماران را با روش های ایمنواسی و LCMS بررسی کرد. او دریافت که با در نظر گرفتن 30 ng/mL به عنوان برشگاه ناکافی بودن، ۶۸٪ نتیجه های ایمنواسی ناکافی به شمار می آیند در حالی که تنها ۳۰٪ از نتیجه های LCMS زیر این سطح بودند. بر پایه ی این بررسی، Rao پژوهش دیگری را بر روی نمونه های ۶۰۰ بیمار با دو روش یاد شده انجام داد و دریافت که روش LCMS ۴۰٪ کژی مثبت (False positive) دارد.

در بررسی Richard Garcia-Kennedy در مرکز پزشکی California Pacific دیده شده که در طول یک ماه نتیجه ۷۹٪ از نمونه های فرستاده شده به آزمایشگاهی که با روش ایمنواسی کار می کند کمتر از 32 ng/mL (برشگاه ناکافی بودن) بود، در حالی که تنها ۴۶٪ از نتیجه های نمونه های فرستاده شده به آزمایشگاهی که با روش LCMS کار می کند کمتر از 32 ng/mL بود.

به دنبال این بررسی، Garcia-Kennedy از خیر اندازه گیری ویتامین D در مرکز خود گذشته است و می گوید: «هرگاه مردم از من در باره ی اندازه گیری ویتامین D می پرسند، می گویم، خودتان را به زحمت نیندازید، فقط روزی ۵۰۰ واحد ویتامین D دریافت کنید، در اینجا هنوز یک کمبود بنیانی وجود دارد که این عددها را بی ارزش می کند.»

در گزارش سال ۲۰۰۷، برنامه ی ارزیابی کیفیت ویتامین D DEQAS، بی دقتی بین آزمایشگاهی حدود ۲۰٪ گزارش شده است. (DEQAS یک برنامه ی پایش کیفیت بیرونی مهارت سنجی است، که به وسیله ی یک سازمان بریتانیایی برگزار می شود، و بزرگترین برنامه ی مهارت سنجی ویتامین D است و بیش از ۱۶۰۰ آزمایشگاه را در سراسر جهان زیر پوششش دارد). در گزارش سال ۲۰۰۸ این سازمان آمده است که روش LCMS دارای ۱۰٪ کژی مثبت است.

در سال ۲۰۰۸ آزمایشگاه در امریکا، که یک آزمایشگاه مرجع و ملی است و یک شبکه ی آزمایشگاهی را تشکیل می دهد، دریافت که به مدت ۱۸ ماه، از آغاز ۲۰۰۷ تا میانه ۲۰۰۸، روش LCMS نوین آن آزمایشگاه (Nicolas Institute Diagnostics) نتیجه های اشتباه گزارش می کرده است؛ رخدادی که سبب شد Quest پیشنهاد بدهد آزمایش های انجام شده با این روش

یکی دیگر از سردرگمی های پیرامون سنجش ویتامین D آن است که صاحب نظران در باره ی محدوده های مرجع و برشگاه های (Cut-off) مناسب برای گزارش: کمبود، ناکافی بودن، وضعیت مطلوب و یا مسمومیت ویتامین D هم رای نیستند. پژوهش ها محدوده های گوناگونی را برای کاهش

ویتامین و بیان خطر بیماری تعیین کرده اند، و آزمایشگاه ها نیز از مرزهای گوناگونی استفاده می کنند.

در یک بررسی، اندازه های گزارش شده برای کاهش OH D-25 از ۸ تا ۳۰ نانو گرم در میلی لیتر در نوسان است. این ناهمخوانی در محدوده های ناکافی نیز از ۲۰-۸ حتی تا ۳۲ نانو گرم نیز در میلی لیتر متغیر بود.

برای کافی بودن یا مطلوب بودن نیز برشگاه های گوناگون گزارش شده بود (۸۰-۲۵، یا ۱۵۰-۳۱، یا ۱۰۰-۳۲ و ۸۰-۵۰ نانوگرم در میلی گرم). به همین منوال در باره ی اندازه های باعث مسمومیت احتمالی نیز توافق چندانی در گزارش ها دیده نمی شود (از ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ نانوگرم در ملی لیتر). گرچه هم اکنون پژوهشگران اندازه های ویتامین D را بدین ترتیب پذیرفته اند: که کمبود را کمتر از ۱۰ - ناکافی را از ۱۰ تا ۳۰ - کافی بودن را از ۳۰ تا ۱۰۰ و سرانجام برای مسمومیت احتمالی بیش از ۱۰۰ نانو گرم در میلی لیتر به شمار بیاورند. ولی بررسی ها و هم چنان ادامه دارد تا به یک همربایی فراگیر برسند.

این دگرگونی بیشتر از آنجا سرچشمه می گیرد که محدوده های مرجع، بیشتر بر پایه ی اندازه های پیشنهاد شده در پژوهش ها بنا شده اند تا آنالیز واقعی سرم توده های مردم. به گفته ی Reinhold Vieth (مدیر آزمایشگاه استخوان و مواد معدنی در بیمارستان Mt Sinai در تورنتو، PhD):

«مشکل در تعیین محدوده ی مرجع به روش کلاسیک برای ویتامین D آن است که مرزهای تعیین شده به عامل هایی مانند شهر محل بررسی و فصل (این که تابستان است یا زمستان) بستگی دارد. برخورد با ویتامین D کم و بیش مانند برخورد با کلسترول است، زیرا بیشتر ما به دنبال این که چه اندازه طبیعی است نیستیم، بلکه به دنبال این هستیم که چه چیزی برای فرد بهینه یا دلخواه است.»

چالش ها در سنجش

روش RIA شرکت Diasorin، روش معیار FDA، و نیز روشی است که در بیشتر پژوهش ها برای تعیین محدوده های مرجع ویتامین D به کار رفته است. از زمان معرفی این روش، در سال های نخستین ده هی ۱۹۹۰ تاکنون، نسل های

* پروتئین های چسبان: RIA, EIA, CLIA, ECL

* ایمونواسی

- سنجش های شیمیایی

* HPLC-UV

* GC-MS

* GC-MS/MS

* LC-MS/MS

روش های چسبان به دلیل چسبیدن سخت ویتامین D به پروتئین باند کننده ی ویتامین D Vitamin D binding protein، در معرض اثر زمینه ای هستند. این روش ها به بهترین شکل در محیط آبی کار می کنند در حالی که ویتامین D بسیار کم در آب حل می شود.

البته با استخراج دستی می توان مشکل نامحلولی را برطرف کرد اما این کار به بیدقتی سنجش می افزاید.

چند پژوهش نشان داده است که روش های سنجش، به ویژه روش های چسبندگی رقابتی، National Institute of Standard and Traceability

به طرف سنجش یکی از دو نوع ویتامین D انحراف دارند و آن را بیشتر از دیگری شناسایی می کنند.

این یافته ها هنگامی بسیار با اهمیت هستند که تلاش کنیم درمان با ویتامین D2 (شکل دارویی مورد تایید FDA) را به وسیله ی روشی که به سوی ویتامین D3 انحراف دارد اندازه گیری کنیم.

در پژوهش دانشگاه ویسکانسین، نمونه هایی که در آن ها فقط یکی از ویتامین D2 یا ویتامین D3 وجود داشت با روش های RIA, HPLC, ECLIA و نیز روش LC-MS/MS (به عنوان روش مرجع مقایسه) سنجیده شدند. نتیجه آن بود که دیده شد برخی روش ها به طرف یکی از این دو آنالیت و برخی به طرف دیگری انحراف دارند؛ به عنوان نمونه یکی از روش های ECLIA (دستگاه NICOLAS ADVANTAGE) نمونه های ویتامین D3 را بیش برآورد می کند در حالی که نمونه های ویتامین D2 را کم برآورد می کند.

روش HPLC بسیاری از مشکل های روش های چسبان را ندارد و پیشتر روش مرجع بود. البته از اشکال های این روش حجم بالای نمونه ($\leq 1\text{ mL}$)، سختی اجرا و زمان بری آن است.

روش های MS روش های کامل تری هستند. نسبت به HPLC سریع تر هستند و حجم نمونه ی آن ها کمتر است.

انجام شده با این روش را رایگان تکرار کند. در یکی از مقاله های نیویورک تایمز، این مشکل به اشکال در کالیبراتور ها نسبت داده شد.

در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۰ در یک بیمارستان دانشگاهی در اوپسلائی سوئد انجام شد، نمونه های ۲۰۴ بیمار با سه روش HPLC-RIA, ACI-MS, CLIA و سنجیده شد. در این بررسی دیده شد که با در نظر گرفتن ۲۰ ng/ml به عنوان برشگاه، نسبت بیماران با کمبود ویتامین D بسته به روش سنجش (به ترتیب RIA, HPLC و CLIA) برابر بود با ۰.۸٪، ۲.۲٪ و ۴.۴٪؛ این یعنی تشخیص این که یک شخص کمبود ویتامین D دارد یا نه، بستگی به این دارد که نمونه ی او در کدام آزمایشگاه آزمایش می شود!

در پژوهش دانشگاه ویسکانسین در سال ۲۰۱۱، نمونه های گروهی داوطلب به ۶ آزمایشگاه فرستاده شد و با ۳ روش، RIA و ECLIA سنجیده شد. با در نظر گرفتن ۳۲ ng/mL به عنوان برشگاه کمبود ویتامین D، دیده شد بین جواب های آزمایشگاه های گوناگون سازگاری وجود ندارد به طوری که بسته به آزمایشگاه، نتیجه ی یک فرد ممکن است پایین یا بالای برشگاه باشد؛ باز هم یعنی بسته به روش به کار گرفته شده برای یک شخص ممکن است تشخیص کمبود گذاشته شود یا نشود.

در سال های اخیر، چند روش تجاری به دلیل نادرستی در سنجش ویتامین D2 به دقت بازبینی شده اند. در سال های پایانی دهه ی ۱۹۹۰ شرکت دیاسورین روش RIA خود را با آنتی های جدید باز کالیبر کرد.

شرکت IDS در سال ۲۰۰۶ روش ایمونواسی خود را باز کالیبر کرد. این دگرگونی ها به انحراف های متدولوژیک و نتیجه های دگرگون شده ی روش های ایمونواسی در طول زمان انجامیده است.

در سال ۲۰۰۴، CDC ۱۵۰ تا از نمونه های ذخیره شده مربوط به برنامه ی NHANES III (۱۹۹۴-۱۹۹۸) را، که در آن برنامه با کیت پیشین دیاسورین سنجیده شده بود، با کیت جدید دوباره اندازه گیری کرد. این بررسی نشان داد که نتیجه های به دست آمده از روش جدید به طور میانگین ۱۱/۷٪ کمتر از نتیجه های روش پیشین بود.

علت چندگونگی نتیجه های به دست آمده از سنجش های گوناگون

این دگرگونی از آنجا سرچشمه می گیرد که آنچه را که ما ویتامین D می خوانیم به راستی گروهی است از مولکول های دارای ساختار همانند که از بین آن ها، ویتامین D2 (ارگوکلسیفرول) و ویتامین D3 (کولهکلسیفرول) دو تا از شکل های فیزیولوژیک مهم هستند. یکی از متابولیت های ویتامین D، یعنی OH D-25 (کلسیدیل)، آنالیتی است که برای ارزیابی کمبود یا مسمومیت ویتامین D سنجیده می شود. اندازه گیری OH D-25 (یعنی جمع OH D2-25 و OH D3-25) نمایانگر درست ذخیره ی ویتامین D بدن است.

روش های سنجش OH D-25 به دو گروه سنجش های چسبان و شیمیایی تقسیم می شود:

- سنجش های چسبان

همچنین می‌توانند OH D-25 و OH D-25 را جداگانه اندازه‌گیری کنند؛ کاری که می‌تواند به یافتن سرچشمه‌ی کمبود کمک کند و نیز در پیگیری درمان و بررسی پیروی بیمار از دستور درمانی کمک‌کننده باشد. البته همه به MS به چشم یک روش کامل نگاه نمی‌کنند.

خرده‌گیران می‌گویند که اسپکترومتری جرمی معیاری طلایی است برای این که بتوان در باره‌ی وزن مولکولی یک ترکیب که از دستگاه گذر می‌کند اطلاعی به دست آورد، اما نه برای به دست آوردن آگاهی در باره‌ی مقدار آن ترکیب. همچنین بیان می‌کنند که نتیجه‌های به دست آمده با این شیوه به روش‌ها و کالیبراتورهای مرجع هر آزمایشگاه بستگی دارند، که به بی‌دقتی بین آزمایشگاهی می‌افزاید. به گفته‌ی Bruce Hollis، (پروفسور در بیوشیمی کودکان و بیولوژی مولکولی، دانشگاه پزشکی کالیفرنیا جنوبی (PhD)) «این یک نمایش غرب وحشی است. هیچ روش استاندارد شده‌ای وجود ندارد، FDA هیچ نظارتی ندارد، و هر دوی LCMS و HPLC بسیار وابسته به کاربر و بسیار کاربر-تفسیر هستند.»

پیشرفت‌های به دست آمده

هم‌اکنون روش LC-MS/MS که به وسیله‌ی موسسه‌ی NIST موسسه‌ی ملی استاندارد و ردگیری امریکا National Institute of Standard and Traceability معرفی شده است یکی از نامزدهای معیار طلایی سنجش ویتامین D است و در حال تبدیل شدن به روش ترجیحی بسیاری از آزمایشگاه‌های مرجع است.

این روش به دلیل بهره‌مندی از استاندارد درونی و نیز متدولوژی فیزیکی-شیمیایی بسیار درست و دقیق است و مشکل Lot-to-lot variation ندارد.

از پیشرفت‌های دیگر آن است که NIST برای اندازه‌گیری OH D-25 ماده‌های مرجع استاندارد با پایه‌ی سرم و حلال تولید کرده است (به ترتیب SRM ۹۷۲ و SRM ۹۷۳). مجموعه‌ی SRM ۹۷۲ برای کالیبراسیون روش‌های ایمونواسی، و مجموعه‌ی SRM ۹۷۳ برای کالیبراسیون LCMS ساخته شده است و با بهره‌گیری از آن‌ها CVهای بین آزمایشگاهی برای هر یک از روش‌های کاهش خواهد یافت.

یک بررسی در سال ۲۰۰۸ نشان داد که هماهنگ‌سازی با یک کالیبراتور، چندگونگی بین آزمایشگاهی را از ۳۰٪ به ۹٪ کاهش داد.

گام دیگر در سال ۲۰۰۹ به وسیله‌ی Stockl و همکارانش با تعیین کیفیت مورد نیاز برای سنجش ویتامین D برداشته شد. این گروه با پیروی از دستورکار «کنفرانس همراهی استکهلم برای مشخصه‌های کیفیت»، چهار رویکرد گوناگون را برای تعیین بایددهای سنجش ویتامین D به کار بستند.

پس از انجام بررسی‌ها، Stockl و همکارانش به کار بستن یک رویکرد بیولوژیک کمتر سختگیرانه (به نام مدل Gowan) را پیشنهاد کردند که حاصل آن حد اکثر CV ۱۰٪ و حداکثر نادرستی ۵٪ برای آزمایشگاه‌های معمولی، و حداکثر CV ۵٪ و حداکثر نادرستی ۷٪ برای آزمایشگاه‌های مرجع است.

برای این که این مرزها رعایت شوند باید بی‌دقتی و نادرستی پایدار حدود نصف این معیارها باشند؛ به این ترتیب، بی‌دقتی و نادرستی کوتاه مدت آزمایشگاه‌های معمولی باید به ترتیب کمتر از ۴٪ و ۲/۶٪ باشد. البته این باید‌ها چالش برانگیز هستند، اما Stockl و همکارانش بر این باور هستند که جامعه‌ی آزمایشگاهی رو به این چالش دارند: «بی‌گمان، این برای سازمان‌های اندازه‌گیری شناسی و آزمایشگاه‌های مرجع چالش برانگیز خواهد بود که توانایی خود را نه تنها برای سازگاری با این باید‌ها، بلکه همچنین برای عرضه کردن چنین کیفیتی به طور پیوسته، نشان دهند. شبکه کردن آزمایشگاه‌های مرجع رویکرد مناسبی برای این کار خواهد بود.»

سخن پایانی

سخن پایانی را به Sten Westgard (مدیر وبسایت وستگارد و پسر پروفسور وستگارد سرشناس) می‌سپاریم.

استن وستگارد برای تعیین کیفیت اجرایی روش‌های گوناگون سنجش ویتامین D، نتیجه‌های ارائه شده در مقاله‌ی در سال ۲۰۰۸ در مجله‌ی Annals of Clinical Biochemistry در باره‌ی ۷ روش گوناگون سنجش OH D-25 را بررسی کرد.

روش‌های بررسی شده عبارت بودند از یک روش HPLC، یک روش RIA، یک روش EIA، یک روش CPBA، دو روش CLIA و یک روش ECLIA. استن وستگارد با استفاده از معیارهای Stockl و همکارانش و در نظر گرفتن خطای کل مجاز (TEa) برابر ۲۵٪، معیار سیگمای هر ۷ روش را تعیین کرد تا تا کیفیت اجرایی هر روش و نیز امکان پایش کیفیت آن در طول زمان را مشخص کند.

به جز دو مورد، معیارهای سیگمای محاسبه شده برای ۵ روش دیگر همگی کمتر از ۲، گاهی کمتر از ۱، و حتا منفی بودند (منفی شدن معیار سیگما به این معنا است که نادرستی روش از خطای مجاز کل بیشتر بوده است).

OH D-25 برای کاربرد بالینی آن کافی نیست، و شرکت های سازنده باید بهبودهای چشمگیری در روش ها ایجاد کنند. «پیشنهاد استن وستگارد آن است که حال که نمی توان به معیارهای بنا شده به وسیله ی Stockl و همکاران رسید، برای بهبود کیفیت می توان از بیمار چند بار نمونه گرفت و سنجید، یا این که هر نمونه را چند بار سنجید و میانگین گرفت، و یا حتی کاربرد بالینی این آزمایش و تفسیر آن را تعدیل کرد. سخن پایانی وستگارد چنین است: «حال که روش های سنجش ویتامین D برای تعیین برشگاه های دقیق و تصمیم گیری، آن چنان که باید کامل نیست، لازم است که پزشکان از این کاستی ها آگاه باشند.»

دو مورد استثنا یکی روش HPLC بود (معیار سیگمای ۳/۷ در حدود غلظت nmol/L ۷۰ و ۱۰/۸ در غلظت حدود nmol/L ۲۵۰) و دیگری روش ECLIA بود (معیار سیگمای ۲/۵ در حدود غلظت nmol/L ۵۰ و ۳/۴ در غلظت حدود nmol/L ۱۸۰).

با در نظر گرفتن این که کمترین معیار سیگمای پذیرفتنی در صنعت ۳ است و فرآیندهای دارای عنوان کلاس جهانی معیار سیگمای ۶ و بالاتر دارند، روشن می شود که کیفیت بیشتر روش های ارزیابی شده تا چه اندازه پایین است.

ارزیابی استن وستگارد نشان داد که عملکرد پنج تا از روش ها هرگز پذیرفتنی نیست، و پایش کیفیت دوتای دیگر که پذیرفتنی هستند بسیار سخت است و نیاز دارد به استفاده از ۶ کنترل در هر سری سنجش، و معیارهای چندقانونی با هشدار کاذب بالا و توان خطایابی بسیار پایین (به عنوان نمونه در مورد یکی از روش ها Pfr و Ped به ترتیب ۰.۷٪ و ۰.۶٪ به دست آمد).

استن وستگارد نتیجه گرفت که «کیفیت اجرایی روش های سنجش

References:

- 1- Vitamin D Assays and What They Really Measure; Veronica I. Luzzi; February 2011; AACC website.
- 2- Seven Vitamin D Methods; Sten Westgard; November 2009; Westgard website.
- 3- What's the Q of D? Vitamin D Performance Requirements; 2009; Westgard website.
- 4- What's the Tea for D? Allowable Error for vitamin D; November 2009; Westgard website.
- 5- Vitamin D Testing - What's the Right Answer? Labs Grapple with Confusing Analytics, Evidence; Genna Rollins; CLN: V. 35 July 2009.