تشخیص
آزمایشگاهی
Tashkhis
Azmayeshgahi
سال سیزدهم
خرداد - تیر
۱۳۹۰
شماره ۷۲

سنجش ویتامین D: کاستی ها و توانایی ها

حسن 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 راشیتیسم و استئومالاسی آزمایش می شد. اما هم اکنون، پژوهش های بسیاری به نقش این پرو هورمون در وضعیت های گوناگون دیگر همانند برخی ازسرطان ها، دیابت نوع ۱، مالتیپل اسکلروز، سل، بیماری آلزایمر، پسوریازیس، 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 گیرندهی 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 جشمگیری 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

اگرچه هنوزمکانیسم 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 رشدفزاینده 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٪ 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 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.

به‌باوردکتر RavinderSingh،(آزمایشگاه‌اندوکرینولوژی، درمانگاه مایو، PhD) شمار آزمایش ویتامین D که اکنون انجام می شود، چندان برپایه ی دلیل ها و داوری 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."

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 از۸ 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 نیزدر میلی لیترمتغییر 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 کمتراز۱۰ - 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 همرایی 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 RIAی 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 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 نا هماهنگی در نتیجه ها برای یک بیمار می شود.

Rao در مرکز پزشکی UMass Memorial، نتیجه های بیماران را با روش های ایمونواسی و LCMS بررسی کرد. او دریافت که با در نظر گرفتن ng/mL ۳۰ به عنوان برشگاه ناکافی بودن ، ۶۸٪ نتیجه های ایمونواسی 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 ۷۹/۸٪ از نمونه های فرستاده شده به آزمایشگاهی که با روش ایمونواسی کار می کند کمتر از ng/mL ۳۲ (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 ng/mL ۳۲ 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 نیاندازید، 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 پوشش 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

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 اوپسالای سوئد انجام شد، نمونه های ۲۰۴ بیمار با سه روش HPLC- ACI-MS، RIA و CLIA 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 HPLC ، RIA و CLIA) برابر بود با ۸٪، ۲۲٪ و ۴۴٪؛ 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 ویسکانتن 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 RIAی خود را با آنتی بادی های جدید بازکالیبر کرد.
شرکت IDS در سال ۲۰۰۶ روش ایمونواسی خود را بازکالیبر 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 (کلسیدیال)، آنالیتی است که برای ارزیابی کمبود یا مسمومیت ویتامین D سنجیده می شود.
اندازه گیری OH D-25 تام (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

* 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 ویسکانتین، نمونه هایی که در آن ها فقط یکی از ویتامین D2 یا ویتامین D3 وجود داشت با روش های HPLC، RIA و 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 (≤ ۱mL)، 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.

همچنین می توانند OH D-25 و OH D-25 را جداگانه اندازه گیری کنند؛ کاری که می تواند به یافتن سرچشمه ی کمبود کمک کند و نیز در پیگیری درمان و بررسی پیروی بیمار از دستور درمانی کمک کننده باشد. البته همه به MS به چشم یک روش کامل نگاه نمی کنند.

خرده گیران می گویند که اسپکترومتری جرمی معیاری طلایی است برای این که بتوان در باره ی وزن مولکولی یک ترکیب که از دستگاه گذر می کند اطلاعی به دست آورد، اما نه برای به دست آوردن آگاهی در باره ی مقدار آن ترکیب. همچنین بیان می کنند که نتیجه های به دست آمده با این شیوه به روش ها و کالیبراتورهای مرجع هر آزمایشگاه بستگی دارند، که به بی دقتی بین آزمایشگاهی می افزاید.

به گفتهی Bruce Hollis، (پروفسور در بیوشیمی کودکان و بیولوژی مولکولی، دانشگاه پزشکی کالیفرنیای جنوبی PhD،) «این یک نمایش غرب وحشی است. هیچ روش استاندارد شده ای وجود ندارد، FDA هیچ نظارتی ندارد، و هر دوی LCMS و HPLC بسیار وابسته به کاربر و بسیار کاربر- تفسیر هستند.»

پیشرفت های به دست آمده

هم اکنون روش LC-MS/MS که به وسیله ی موسسه ی NIST موسسه ی 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 آزمایشگاه های مرجع است.

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

از پیشرفت های دیگر آن است که NIST برای اندازه گیری OH D-25 ماده های مرجع استاندارد با پایه ی سرم و حلال تولید کرده است (به ترتیب SRM ۹۷۲ و SRM ۹۷۲). مجموعه ی SRM ۹۷۲ برای کالیبراسیون روش های ایمونواسی، و مجموعه ی SRM ۹۷۲ برای کالیبراسیون LCMS ساخته شده است و با بهره گیری از آن ها CVهای بین آزمایشگاهی برای هر یک از روش های کاهش خواهد یافت.

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

گام دیگر در سال ۲۰۰۹ به وسیله ی Stockl و همکارانش با تعیین کیفیت مورد نیاز برای سنجش ویتامین D برداشته شد. این گروه با پیروی از دستورکار «کنفرانس همرایی استکهلم برای مشخصه های کیفیت»، چهار رویکرد گوناگون را برای تعیین بایدهای سنجش ویتامین D به کار بستند.

پس از انجام بررسی ها، 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 آزمایشگاه های معمولی، و حداکثر CV ۵٪ و حداکثر نادرستی ۱/۷٪ برای آزمایشگاه های مرجع است.

برای این که این مرزها رعایت شوند باید بی دقتی و نادرستی پایدار حدود نصف این معیارها باشند؛ به این ترتیب، بی دقتی و نادرستی کوتاه مدت آزمایشگاه های 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 جامعه ی آزمایشگاهی رو به این چالش دارند: «بی گمان، این برای سازمان های اندازه گیری شناسی و آزمایشگاه های 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 آزمایشگاه های مرجع رویکرد مناسبی برای این کار خواهد بود.»

سخن پایانی

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

استن وستگارد برای تعیین کیفیت اجرایی روش های گوناگون سنجش ویتامین D، نتیجه های ارائه شده در مقاله ای در سال ۲۰۰۸ در مجله ی Annals of Clinical Biochemistry در باره ی ۷ روش گوناگون سنجش OH D-25 را بررسی کرد.

روش های 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 کیفت 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 از۲، 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).

دو مورد استثنا یکی روش HPLC بود (معیار سیگمای ۳/۷ در حدود غلظت nmol/L ۷۰و 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 عمکرد 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 ۷٪ و ۶٪ به دست آمد!).

استن وستگارد نتیجه گرفت که «کیفیت اجرایی روش های سنجش 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 حتا 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.»

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.