سنجش ویتامین D: کاستی‌ها و توانایی‌ها

حسن بیات – دانش‌آموخته‌ی آزمایشگاه
(این نوشته در مجله‌ی تشخیص آبان ۹۰ چاپ شده است)

پس زمینه

تا یک دهه پیش سنجش ویتامین D تنها هنگامی درخواست می‌شد که تراکم استخوان بیمار در دست بررسی بود؛ یعنی برای بررسی بیماری‌های راشیتیسم و استئومالاسی. اما هم‌اکنون، پژوهش‌های بسیاری به نقش این پروهورمون در تعداد زیادی از وضعیت‌های دیگر مانند برخی کنسرها، دیابت نوع ۱، مالتیپل اسکلروز، توبرکلوز، بیماری آلزایمر، پسوریازیس، و مرگ و میر هرعلتی[1] پرداخته‌اند و نیز نشان داده‌اند که کمبود ویتامین D شایع است. همچنین نقش ویتامین D به عنوان یکی از مکانیسم‌های بسیار مهم برای تبدیل پیام در چند ارگان مانند مغز، پروستات، سنیه، بافت کولون و سلول‌های ایمنی روز بروز بیشتر آشکار می‌شود. این اندام‌ها گیرنده‌ی ویتامین D دارند و به 1,25-OH D پاسخ می‌دهند.

همزمان با وجود پیشرفت‌های چشمگیر تکنولوژیک در سنجش ویتامین D، اختلاف نظر پیرامون برخی روش‌ها و نیز سردرگمی قابل ملاحظه در باره‌ی هردوی ملاحظه‌های سنجشی و تفسیر بالینی نتیجه‌های ویتامین D، سبب شده است که آزمایشگاهیان و پزشکان نسبت به کیفیت اجرا یا تفسیر درست این آزمایش نامطمئن باشند. در زیر به جنبه‌های گوناگون سنجش ویتامین D پرداخته می‌شود.

رشد درخواست

اگرچه مکانیسم کار ویتامین D در پیشگیری از یا پیشبرد بیماری‌های گوناگون به طور قطعی شناسایی نشده است، اما انتشار پژوهش‌ها به وسیله‌ی رسانه‌های گروهی سبب شده است که درخواست آزمایش ویتامین D رشد فزاینده‌ای داشته باشد. در یک بررسی که در سال ۲۰۰۹ در امریکا به وسیله مجله‌ی CLN[2] انجام شد، دیده شد که در بیش از ۵۰% از آزمایشگاه‌های بررسی شده رشد درخواست آزمایش 25-OHDدست کم سالانه ۵۰% بوده است و در ۲۷% آزمایشگاه‌ها بیش از ۱۰۰% بوده است. نکته‌ی دیگری که جای توجه داشت این بود که درخواست 1,25-OHD در یک چهارم آزمایشگاه‌ها حدود ۲۵% و در ۱۳% آزمایشگاه‌ها حدود ۵۰% یا بیشتر رشد داشت؛ چیزی که به نظر می‌رسد با اندیکاسیون محدود این آزمایش برای ارزیابی بیماری پاراتیروئید و اختلال‌های متابولیسم کلسیم همخوانی ندارد.

به باور Ravinder Singh (PhD، آزمایشگاه اندوکرینولوژی، درمانگاه مایو) "ما از گواه[3]ها جلوتر هستیم. برای این شمار آزمایش ویتامین D که اکنون انجام می‌دهیم، دلیل‌ها و داوری‌های درست وجود ندارد. سالانه میلیون‌ها آزمایش انجام می‌شود و حالا ما داریم به جایی می‌رسیم که پزشکان سردرگم هستند، آزمایشگاهیان سردرگم هستند، و تنها دلیل این سردرگمی آن است که ما این آزمایش را برای جمعیت درست بیماران انجام نمی‌دهیم."

محدوده‌ی مرجع

[1] All-cause mortality
[2] Clinical Laboratory News
[3] Evidence

یکی دیگر از سردرگمی‌های پیرامون سنجش ویتامین D آن است که صاحبنظران در باره‌ی محدوده‌های مرجع و برشگاه[4]های مناسب برای کمبود، ناکافی بودن، وضعیت‌های مطلوب و مسمومیت ویتامین Dهمرای نیستند. پژوهش‌های گوناگونمحدوده‌های گوناگونی را برای کاهش خطر بیماری تعیین کرده‌اند، و آزمایشگاه‌ها نیز محدوده‌های گوناگونی را به کار می‌برند. در یک بررسی،سطح‌های گزارش شده برای کاهش 25-OH D از ۸ng/mL≥ تا ۳۰ng/mL≤ را در برمی‌گرفت. همین ناهمخوانی در محدوده‌های ناکافی بودن دیده می‌شد و از ۸-۲۰ng/mL تا ۳۲ng/mL< بود. برای کافی بودن یا مطلوب بودن نیز برشگاه‌های گوناگون گزارش شده بود از ۲۵-۸۰ng/mL تا ۳۱-۱۵۰ng/mL تا ۳۲-۱۰۰ng/mL و ۵۰-۸۰ng/mL. به همین شکل، سطح‌های مسمومیت احتمالی گزارش شده عبارت بودند از ۸۰ng/mL<، ۱۰۰ng/mL<، ۱۵۰ng/mL< و ۲۰۰ng/mL<.این دگرگونی بیشتر از آنجا سرچشمه می‌گیرد که محدوده‌های مرجع بیشتر بر پایه‌ی سطح‌های پیشنهاد شده در پژوهش‌ها بنا شده‌اند تا آنالیز واقعی سرم. به گفته‌ی Reinhold Vieth (PhD)، مدیر آزمایشگاه استخوان و مواد معدنی در بیمارستان Mt Sinai در تورنتو) "مشکل در تعیین محدوده‌ی مرجع به روش کلاسیک برای ویتامین D آن است که محدوده‌ی تعیین شده به عامل‌هایی مانند شهر محل بررسیT و اینکه تابستان است یا زمستان بستگی دارد. سطح ویتامین D تا حدودی مانند سطح کلسترول است، از این نظر که ما به دنبال این نیستیم که چه چیزی طبیعی است، بلکه به دنبال این هستیم که چه چیزی مطلوب یا دلخواه است."

اگرچه پژوهشگرانویتامین D در باره‌ی ۱۰ng/mL< به عنوان نشانگر کمبود، ۱۰-۳۰ng/mL برای ناکافی بودن، ۳۰-۱۰۰ng/mL برای کافی بودن، و ۱۰۰ng/mL< برای مسمومیت احتمالی همنظر هستند، با وجود این، هنوز جا برای گواه[5]های بیشتر و همرایی‌های بیشتر وجود دارد.

چالش‌های سنجشی

روش RIAی شرکت Diasorin روش معیار FDA است، و نیز روشی است که در بیشتر پژوهش‌ها برای تعیین محدوده‌های مرجع ویتامین D به کار گرفته شده است. از زمان معرفی این روش در سال‌های نخستین دهه‌ی ۱۹۹۰ تاکنون، نسل‌های جدیدتر این روش و نیز روش‌های پیشرفته‌تری مانند HPLC و LCMS پدید آمده‌اند.

پژوهش‌های گوناگون نشان داده‌اند که روش‌های سنجش 25-OH D دارای کاستی‌هایی هستند و وجود روش‌های گوناگون سنجش سبب شده است که نتیجه‌های یک بیمار از آزمایشگاه‌های گوناگون با هم فرق داشته باشد.Rao در مرکز پزشکی UMass Memorial، نتیجه‌های بیماران را با روش‌های ایمونواسی و LCMS بررسی کرد و دریافت که با در نظر گرفتن ۳۰ng/mL به عنوان برشگاه ناکافی بودن، ۶۸% نتیجه‌های ایمونواسی ناکافی به شمار می‌آیند در حالی که تنها ۳۰% از نتیجه‌های LCMS زیر این سطح بودند. بر پایه‌ی این بررسی، Rao پژوهش دیگری را بر روی نمونه‌های ۶۰۰ بیمار با دو روش یاد شده انجام داد و دریافت که روش LCMS ۴۰% کژی مثبت[6] دارد.

در بررسی Richard Garcia-Kennedy در مرکز پزشکی California Pacific، دیده شده که در طول یک ماه نتیجه ۷۹/۸% از نمونه‌های فرستاده شده به آزمایشگاهی که با روش ایمونواسی کار می‌کرد کمتر از ۳۲ ng/mL (برشگاه ناکافی بودن) بود در حالیکه تنها ۴۶% از نتیجه‌های نمونه‌های فرستاده شده به آزمایشگاهی که با روش LCMSکار می‌کرد کمتر از ۳۲ ng/mL بود. به دنبال این بررسی، Garcia-Kennedy از خیر اندازه‌گیری ویتامین D در مرکز خود گذشته است و می‌گوید: " هرگاه مردم از من در باره‌ی اندازه‌گیری ویتامین D می‌پرسند، می‌گویم «خودتان را به زحمت نیندازید، فقط روزی ۵۰۰ واحد ویتامین D دریافت کنید». در باره‌ی سنجش ویتامین D، هنوز یک کمبود بنیانی وجود دارد که این عددها را بی‌ارزش می‌کند."

---

[4] Cut-off
[5] Evidence
[6] Positive bias

در گزارش سال ۲۰۰۷ برنامه‌ی ارزیابی کیفیت ویتامین D(DEQAS)، بیدقتی بین آزمایشگاهی حدود ۲۰% گزارش شده است (DEQAS یک برنامه‌ی پایش کیفیت بیرونی [مهارت سنجی] است که به وسیله‌ی یک سازمان بریتانیایی برگزار می‌شود و بزرگترین برنامه‌ی 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 Quest در امریکا، که یک آزمایشگاه مرجع و ملی است و یک شبکه‌ی آزمایشگاهی را تشکیل می‌دهد، دریافت که به مدت ۱۸ ماه، از آغاز ۲۰۰۷ تا میانه ۲۰۰۸، روش LCMSجدید آن آزمایشگاه (Nicolas Institute Diagnostics) نتیجه‌های اشتباه گزارش می‌کرده است؛ رخدادی که سبب شد Quest پیشنهاد بدهد آزمایش‌های انجام شده با این روش را رایگان تکرار کند. در یکی از مقاله‌های نیویورک‌تایمز، این مشکل به اشکال در کالیبراتورها نسبت داده شد.

در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۰ در یک بیمارستان دانشگاهی در اوپسالای سوئد انجام شد نمونه‌های ۲۰۴ بیمار با سه روش HPLC-ACI-MS، RIA و CLIA سنجیده شد. در این بررسی دیده شد که با در نظر گرفتن ۲۰ng/mL به عنوان برشگاهکمبود ویتامین D، نسبت بیماران دارای کمبود بسته به روش سنجش (به ترتیب HPLC، RIA و CLIA) برابر بود با۸%، ۲۲% و ۴۴%؛ این یعنی: تشخیص اینکه یک شخص کمبود ویتامین D دارد یا نه، بستگی به این دارد که نمونه‌ی او در کدام آزمایشگاه سنجیده می‌شود!

در پژوهش دانشگاه ویسکانتین در سال ۲۰۱۱، نمونه‌های داوطلبان به ۶ آزمایشگاه فرستاده شد و با ۳ روش HPLC، RIA و ECLIA سنجیده شد. با در نظر گرفتن ۳۲ng/mL به عنوان برشگاه کمبود، دیده شد بین جواب‌های آزمایشگاه‌های گوناگون سازگاری وجود ندارد به طوریکه بسته به آزمایشگاه، نتیجه‌ی یک فرد ممکن است پایین یا بالای برشگاه باشد؛ باز هم یعنی بسته به روش بکار گرفته شده برای یک شخص ممکن است تشخیص کمبود گذاشته شود یا نشود.

در سال‌های اخیر، چند روش تجاری به دلیلی نادرستی در سنجش ویتامین D2 به دقت بازبینی شده‌اند. در سال‌های پایانی دهه‌ی ۱۹۹۰ شرکت دیاسورین روش RIAی خود را با آنتی‌بادی‌های جدید بازکالیبر کرد. شرکت IDS در سال ۲۰۰۶ روش ایمونواسی خود را بازکالیبر کرد. این دگرگونی‌ها به انحراف‌های متدولوژیک و نتیجه‌های دگرگون شده‌ی روش‌های ایمونواسی در طول زمان انجامیده است. در سال ۲۰۰۴، CDC ۱۵۰ تا از نمونه‌های ذخیره شده مربوط به برنامه‌ی NHANES III[7] (۱۹۹۴-۱۹۹۸) را،که در آن برنامه با کیت پیشین دیاسورین سنجیده شده بود، دوباره با کیت جدید این شرکت اندازه‌گیری کرد. این بررسی نشان داد که نتیجه‌های به دست آمده از روش جدید به طور میانگین ۱۱/۷% کمتر از نتیجه‌های روش پیشین بود.

علت چندگونگی نتیجه‌های به دستآمده از سنجش‌های گوناگون

این دگرگونی از آنجا سرچشمه می‌گیرد که آنچه را که ما ویتامین D می‌خوانیم به راستی گروهی است از مولکول‌های دارای ساختار همانند که از بین آن‌ها، ویتامین D2 (ارگوکلسیفرول) و ویتامین D3 (کوله‌کلسیفرول) دو تا از شکل‌های فیزیولوژیک مهم هستند. یکی از متابولیت‌های ویتامین D، یعنی 25-OH D (کلسی‌دی‌اُل)، آنالیتی است که برای ارزیابی کمبود یا مسمومیت ویتامین D سنجیده می‌شود. اندازه‌گیری 25-OH D تام (یعنی جمع 25-OH D2 و 25-OH D3) نمایانگر درست ذخیره‌ی ویتامین D بدن است.

روش‌های سنجش 25-OH D به دو گروه سنجش‌های چسبان[8] و شیمیایی تقسیم می‌شود:

- سنجش‌های چسبان

[7] National Health and Nutrition Examination Survey III
[8] Binding assays

- پروتئین‌های چسبان: RIA، EIA، CLIA، ECL
- ایمونواسی

❖ سنجش‌های شیمیایی

- HPLC-UV
- GC-MS
- GC-MS/MS
- LC-MS/MS

روش‌های چسبان به دلیل چسبیدن سخت ویتامین D به پروتئین ویتامین Dچسب[9]، در معرض اثر زمینه‌ای هستند. این روش‌ها به بهترین شکل در محیط آبی کار می‌کنند در حالی که ویتامین D بسیار کم در آب حل می‌شود. البته با استخراج دستی می‌توان مشکل نامحلولی را برطرف کرد اما این کار به بیدقتی سنجش می‌افزاید.

چند پژوهش نشان داده است که روش‌های سنجش، به ویژه روش‌های چسبندگی رقابتی[10]، به طرف سنجش یکی از دو نوع ویتامین D انحراف دارند و آن را بیشتر از دیگری شناسایی می‌کنند. این یافته‌ها هنگامی بسیار با اهمیت هستند که تلاش کنیم درمان با ویتامین D2 (شکل دارویی مورد تایید FDA) را به وسیله‌ی روشی که به سوی به سوی ویتامین D3 انحراف دارد اندازه‌گیری کنیم. در پژوهش دانشگاه ویسکانتین، نمونه‌هایی که در آن‌ها فقط یکی از ویتامین D2 یا ویتامین D3 وجود داشت با روش‌های HPLC، RIA و ECLIAو نیز روش LC-MS/MS (به عنوان روش مرجع مقایسه) سنجیده شدند. نتیجه آن شد که دیده شد برخی روش‌ها به طرف یکی از این دو آنالیت و برخی به طرف دیگری انحراف دارند؛ به عنوان نمونه یکی از روش‌های ECLIA (دستگاه NICOLAS ADVANTAGE) نمونه‌های ویتامین D3 را بیش‌برآورد می‌کند در حالی که نمونه‌های ویتامین D2 را کم‌برآورد می‌کند.

روشHPLC بسیاری از مشکل‌های روش‌های چسبان را ندارد و پیشتر روش مرجع بود. البته از اشکال‌های این روش حجم بالای نمونه (≤۱mL)، سختی اجرا و زمانبری آن است.

روش‌های MS روش‌های کاملتری هستند. نسبت به HPLC سریعتر هستند و حجم نمونه‌ی آن‌ها کمتر است. همچنین می‌توانند 25-OH D2 و 25-OH D3 را جداگانه اندازی‌گیری کنند؛ کاری که می‌تواند به یافتن سرچشمه‌ی کمبود کمک کند و نیز در پیگیری درمان و بررسی پیروی بیمار از دستور درمانی کمک کننده باشد. البته همه به MSبه چشم یک روش کامل نگاه نمی‌کنند. خرده‌گیران می‌گویند که اسپکترومتری جرمی، معیاری طلایی است برای اینکه بتوان در باره‌ی وزن مولکولی یک ترکیب که از دستگاه گذر می‌کند اطلاعی به دست آورد، اما نه برای آگاه شدن از مقدار آن ترکیب. همچنین بیان می‌کنند که نتیجه‌های به دست‌آمده با این شیوه به روش‌ها و کالیبراتورهای مرجع هر آزمایشگاه بستگی دارد؛ چیزی که به بیدقتی بین آزمایشگاهی می‌افزاید. به گفته‌ی Bruce Hollis (PhD)، پروفسور در بیوشیمی کودکان و بیولوژی مولکولی، دانشگاه پزشکی کالیفرنیای جنوبی) "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

موسسه‌ی ملی استاندارد و ردگیری امریکا (NIST[11])در سال ۲۰۰۸ یک روش LC-MS/MSمعرفی کرده است.این روش به دلیل بهره‌مندی از استاندارد درونی و نیز متدولوژی فیزیکی-شیمایی، بسیار درست و دقیق است

[9] Vitamin D binding protein
[10] Competitive binding assays
[11] National Institute of Standard and Traceability

و مشکل تغییر گروه به گروه[12] ندارد. هم‌اکنون این روش در حال تبدیل شدن به روش ترجیحی بسیاری از آزمایشگاه‌های مرجع است و یکی از نامزدهای معیار طلایی سنجش ویتامین D است.

از پیشرفت‌های دیگر آن است که NIST برای اندازه‌گیری 25-OH D ماده‌های مرجع استاندارد با پایه‌ی سرم و حلال تولید کرده است (به ترتیب SRM 972 و SRM 972). مجموعه‌ی SRM 972 برای کالیبراسیون روش‌های ایمونواسی، و مجموعه‌ی SRM 972 برای کالیبراسیون LCMS ساخته شده است و با بهره‌گیری از آن‌ها CVهای بین آزمایشگاهی برای هر یک از روش‌ها 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 توافق استکهلم برای مشخصه‌های کیفیت[13]، چهار رویکرد گوناگون را برای تعیین بایدهای سنجش ویتامین Dبه 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[14] ۵% برای آزمایشگاه‌های معمولی، و حد اکثر CV ۵% و حداکثر نادرستی ۱/۷% برای آزمایشگاه‌های مرجع است. برای این که این مرزها در بلند مدت رعایت شوند باید بیدقتی و نادرستیکوتاه مدت (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 چالش‌برانگیز هستند، اما Stockl و همکارانش بر این باور هستند که جامعه‌ی آزمایشگاهی گزیری از این چالش ندارند:

"بی‌گمان، برای سازمان‌های اندازه‌گیری‌شناسی[15] و آزمایشگاه‌های مرجع چالش‌برانگیز 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 Westgardمی‌سپاریم(استن وستگارد دارای مدرک MS، مدیر وبسایت وستگارد در باره‌ی کنترل کیفیت آزمایشگاه‌های پزشکی، و پسر پروفسور وستگارد سرشناس است). استن وستگارد برای تعیین کیفیت اجرایی روش‌های گوناگون سنجش ویتامین D، نتیجه‌های ارائه شده در مقاله‌ای در مجله‌ی Annals of Clinical Biochemistryدر سال ۲۰۰۸ در باره‌ی ۷ روش گوناگون سنجش 25-OH D را بررسی کرد. روش‌های بررسی شده عبارت بودند از یک روش HPLC، یک روش RIA، یک روش EIA، یک روش CPBA[16]، دو روش CLIA و یک روش ECLIA.استن وستگارد با استفاده از معیارهای Stockl و همکارانش و در نظر گرفتن خطای کل مجاز (TE_a) برابر ۲۵%، امتیاز سیگمای[17] هر ۷ روش را تعیین کرد تا کیفت اجرایی هر روش، و نیز امکان پایش کیفیت روش‌ها در طول زمان را مشخص کند. به جز دو مورد، امتیازهای سیگمای محاسبه شده برای ۵ روش دیگر همگی کمتر از۲،برخیکمتر از ۱، و حتا برخی منفی بودند (منفی شدن معیار سیگما به این معنا است که نادرستی روش، از خطای مجاز کل بیشتر است). دو مورد استثنا، یکی روش HPLC بود (امتیاز سیگمای ۳/۷ در حدود غلظت ۷۰nmol/L و ۱۰/۸ در غلظت حدود ۲۵۰nmol/L) و دیگری روش ECLIA بود (امتیاز سیگمای ۲/۵ در حدود غلظت ۵۰nmol/L و ۳/۴ در غلظت حدود ۱۸۰nmol/L). با در نظر گرفتن این که کمترین امتیاز سیگمای پذیرفتنی در صنعت، امتیاز ۳ است و امتیاز سیگمای فرآیندهای دارای عنوان کلاس جهانیبرابر یابالاتر از۶ است، روشن می‌شود که کیفیت بیشتر روش‌های ارزیابی شده تا چه اندازه پایین است. ارزیابی استن وستگارد نشان داد که عمکرد پنجتا از روش‌ها هرگز پذیرفتنی نیست، و پایش کیفیت دوتای دیگر که

[12] Lot-to-lot variation
[13] Strategies to set global quality specifications in laboratory medicine; Stockholm April 24-26, 1999
[14] Bias
[15] Metrological
[16] Competitive Protein Binding Assay
[17] Sigma score

پذیرفتنی هستند بسیار سخت است به طوری که برای پایش آن‌ها باید از از ۶ کنترل در هر سری سنجش (دو سنجش بر روی سه سطح کنترل) و معیارهای چندقانونی[18] با هشدار کاذب[19] بالا و توان خطایابی[20] بسیار پایین استفاده کرد (به عنوان نمونه در مورد یکی از روش‌ها P_{fr} و P_{ed} به ترتیب ۷% و ۶% به دست آمد!). استن وستگارد نتیجه گرفت که "کیفیت اجرایی روش‌های سنجش 25-OH D برای کاربرد بالینی آن کافی نیست، و شرکت‌های سازنده باید بهبودهای چشمگیری در این روش‌ها ایجاد کنند." پیشنهاد استنوستگارد آن است که حال که نمی‌توان به معیارهای بنا شده به وسیله‌ی Stockl و همکاران رسید، برای بهبود کیفیت می‌توان از بیمار چند بار نمونه گرفت و سنجید، یا این که یک 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 روش‌های سنجش ویتامین D برای تعیین برشگاه‌های دقیق و تصمیم‌گیری،آن چنان که بایدکامل نیستند، لازم است که پزشکان از این کاستی‌ها آگاه باشند."

منبع‌ها:

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; GennaRollins; CLN: V. 35 July 2009.

[18] Multi-rule criteria
[19] Probability of false positive (P_{fr})
[20] Probability of error detection (P_{ed})