

## Il dosaggio della Vitamina D con un metodo completamente automatico, validazione analitica e clinica

Margherita Banci, Roberta Splendore  
Corporate Marketing, DiaSorin SpA, Saluggia

### INTRODUZIONE

La determinazione dei livelli circolanti della 25 idrossi vitamina D (25-OHD) è utile per valutare il pool di vitamina D disponibile per le successive trasformazioni metaboliche nei singoli individui. Livelli diminuiti di vitamina D si possono trovare in casi di carenze della dieta alimentare, di malassorbimento o di presenza di una patologia. La terapia di supplementazione è basata sulla somministrazione di vitamina D<sub>2</sub> e/o di vitamina D<sub>3</sub>.

L'azione fisiologica della vitamina D è di agire sinergicamente con il paratormone (PTH) stimolandone la secrezione; il PTH a sua volta stimola l'aumento del livello di calcio serico. In assenza dello stimolo da parte della vitamina D il livello di calcio nel sangue tenderebbe a diminuire<sup>1</sup>.

L'osteoporosi e le malattie osso-correlate costituiscono un problema sanitario globale di impatto enorme destinato ad aumentare negli anni futuri. Un elevato numero di studi clinici ha dimostrato che i livelli di vitamina D misurati nella popolazione 'normale' asintomatica possono essere ben al di sotto dei livelli ottimali<sup>2, 9, 11, 14</sup>. Livelli di vitamina D diminuiti sono legati ad un notevole numero di patologie quali malattie renali, tumori maligni, malattie cardiovascolari, sclerosi multipla, artrite reumatoide e diabete mellito di tipo 1<sup>3,4</sup>.

Nell'articolo verrà descritto il nuovo metodo per il dosaggio della 25-OH vitamina D LIAISON® 25-OH Vitamin D TOTAL. Verranno descritte le correlazioni del nuovo metodo con il metodo della spettrometria di massa (LC-TMS), recentemente diventato metodo di riferimento universalmente riconosciuto e con il metodo RIA di DiaSorin (25-Hydroxyvitamin D) che costituisce il gold standard commercialmente disponibile.

### LA 25-OH VITAMINA D, UTILITÀ CLINICA E METODI DI DOSAGGIO

Dal punto di vista chimico la vitamina D e i suoi metaboliti appartengono alla famiglia dei secosteroidi. Il colecalciferolo (vitamina D<sub>3</sub>) viene sintetizzato prevalentemente dalla pelle esposta alla luce solare. I fotoni della luce ultravioletta B assorbiti dal 7-deidrocolesterolo a livello cutaneo, portano alla sua temporanea trasformazione a pre-vitamina D<sub>3</sub>, rapidamente convertita a vitamina D<sub>3</sub><sup>3</sup>.

Latitudine e variazione stagionali di intensità solare, invecchiamento, utilizzo di creme solari e differente grado di pigmentazione influenzano la produzione di vitamina D<sub>3</sub> a livello cutaneo<sup>3</sup>. Altre fonti di vitamina D<sub>3</sub> sono in generale diete alimentari a base di pesci 'grassi' come salmone, sgombro, merluzzo e sardine. L'ergocalciferolo (vitamina D<sub>2</sub>) è prodotto per irradiazione dell'ergosterolo eseguita da alcuni lieviti<sup>10</sup>. Altre fonti di vitamina D<sub>2</sub> sono le diete alimentari ricche di vegetali (esempio alcuni funghi).

Gli stati di carenza di vitamina D vengono solitamente

trattati somministrando indifferentemente ai pazienti sia la vitamina D<sub>2</sub> che la vitamina D<sub>3</sub>.

Studi recenti indicano che la terapia con vitamina D<sub>3</sub> potrebbe essere più efficace della terapia con vitamina D<sub>2</sub>, in quanto quest'ultima evidenzerebbe una azione farmacologica ridotta nel tempo<sup>7,9</sup>.

Negli Stati Uniti di America, l'unico farmaco approvato dall'FDA è il Drisdol (Ergocalciferolo, vitamina D<sub>2</sub>), somministrato in dosi da 50,000 IU, mentre, nella maggior parte degli Stati Europei, la terapia viene effettuata prevalentemente con la vitamina D<sub>3</sub>. Tuttavia, la terapia con vitamina D<sub>2</sub> è tuttora presente e utilizzata anche se in forma meno evidente. Risulta quindi fondamentale che i dosaggi utilizzati nella routine del laboratorio analisi, per quantificare il totale della vitamina 25-OHD circolante, misurino in modo preciso sia la 25-OHD<sub>2</sub> che la 25-OHD<sub>3</sub>, al fine di identificare accuratamente stati di carenza o insufficienza e per monitorare le terapie<sup>8</sup>.

La maggior parte della 25-OHD circolante viene sintetizzata a livello cutaneo durante l'esposizione al sole; parecchi fattori possono tuttavia ridurre l'efficacia di tale formazione. Per mantenere il livello plasmatico ottimale si rende perciò necessario considerare anche la quota di vitamina D assunta tramite la dieta alimentare.

Recentemente è stata definita una concentrazione ottimale di 25-OH vitamina D nel sangue attorno ai 30-32 ng/mL (fra 75 e 90 nmoL)<sup>20</sup>.

I notevoli benefici dovuti alla presenza in circolo di livelli più elevati di 25-OHD, la totale mancanza di rischio di intossicazione e l'economicità della terapia rendono l'integrazione dei livelli di vitamina D nella popolazione una priorità per la sanità pubblica.

E' stato dimostrato come livelli di 25-OHD, anche più elevati del limite recentemente definito, siano utili per combattere malattie croniche diffuse quali osteoporosi, ridotta funzionalità degli arti inferiori, dolori muscolari, odontopatie, fratture come esiti di cadute, tumori coloretali, della mammella e della prostata. Tutte le patologie elencate sono estremamente importanti dal punto di vista economico per i Sistemi Sanitari<sup>22</sup> delle diverse nazioni. Come già descritto, paesi come gli Stati Uniti e il Canada sono ampiamente dipendenti da cibi fortificati e da supplementi alimentari allo scopo di mantenere il livello di vitamina D al livello ottimale.

Valutazioni cross-sezionali suggeriscono comunque che la terapia di supplementazione attualmente adottata in questi paesi non è sufficiente per prevenire, nella stagione invernale, l'ipovitaminosi delle classi a rischio quali anziani e bambini<sup>11</sup>. La dose di vitamina D utile è stata fissata nel 1997 dal Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine.

I limiti superiori di assunzione sono stati fissati a 50 microg/d (2000 IU/d) per tutte le età<sup>12</sup>. Studi più recenti indicano che tali dosi non sono adeguate per mantenere

livelli circolanti ottimali di 25-OH vitamina D<sup>15,16,17,18,19,20</sup>. Nella popolazione in età anziana tali livelli si raggiungono con dosi giornaliere attorno a 1300 IU/d<sup>14</sup>. Altri dati hanno indicato un riemergere del rachitismo da carenza di vitamina D e un'allarmante insufficienza di vitamina D sierica nella popolazione generale<sup>13</sup>.

In letteratura vengono suggeriti i seguenti intervalli per la classificazione della concentrazione ottimale di vitamina D:

Carenza:	<10 ng/mL	(0 - 25 nmol/L)
Insufficienza:	10 - 30 ng/mL	(25 - 75 nmol/L)
Sufficienza:	30 - 100 ng/mL	(75 - 250 nmol/L)
Tossicità:	100 ng/mL	(> 250 nmol/L)

### METODI DI DOSAGGIO

La determinazione dei livelli di vitamina D si è evoluta negli ultimi anni attraverso differenti tecniche analitiche. Nel passato, la determinazione della maggior parte dei metaboliti della vitamina D richiedeva, prima di eseguire il vero e proprio dosaggio, un'estrazione con solventi allo scopo di deproteinizzare il campione e dissociare i metaboliti dalle proteine di trasporto (DBP e albumina)<sup>21</sup>. I primi dosaggi con tecniche radioimmunologiche richiedevano una purificazione cromatografica per eliminare le interferenze seriche non specifiche, nonostante questo continuavano ad evidenziare problemi di specificità<sup>8</sup>.

Il metodo RIA, sviluppato e commercializzato da DiaSorin negli anni '90, è basato su una pre-estrazione e successivamente sull'utilizzo di un anticorpo specifico assieme con un tracciante iodinato 25-OHD<sup>4,17,18</sup>.

Attualmente la spettrometria di massa (LC-TMS) viene considerata il metodo di riferimento per la determinazione quantitativa e accurata della 25-OHD ed ha quasi completamente sostituito la tecnica di dosaggio in HPLC. La spettrometria di massa richiede una costosa strumentazione ad elevata tecnologia, tecnici con elevata manualità e conoscenza tecnica e richiede tempi analitici prolungati scarsamente adatti all'esecuzione di routine con elevate numerosità di campioni.

Quattro anni fa DiaSorin ha sviluppato un differente sistema analitico per il dosaggio della 25-OHD, utilizzando per la sua identificazione lo stesso anticorpo specifico utilizzato nel metodo RIA. Il metodo si esegue, in completa automazione, sull'analizzatore LIAISON<sup>®</sup> 2,3,7. Il sistema LIAISON<sup>®</sup> per il dosaggio della 25-OH vitamina D non richiede l'estrazione manuale separata del campione, è estremamente facile da utilizzare, è rapido e non è influenzato dalla manualità del personale tecnico.

Durante il 2007 DiaSorin ha ottimizzato il dosaggio sviluppando il kit LIAISON<sup>®</sup> 25 OH Vitamin D TOTAL (codice 310600). Questo kit è in grado di dosare entrambi i metaboliti della vitamina D (25-OHD<sub>2</sub> e 25-OHD<sub>3</sub>) con specificità, accuratezza, sensibilità e precisione ancora superiori al vecchio metodo LIAISON<sup>®</sup>.

Lo studio qui descritto dimostra che i risultati che si ottengono utilizzando il kit LIAISON<sup>®</sup> 25 OH Vitamin D TOTAL sono confrontabili con quelli ottenuti con il metodo RIA di DiaSorin, ma anche e soprattutto con il riferimento assoluto (LC-TMS).

### METODI ANALITICI UTILIZZATI PER LO STUDIO

#### Spettrometria di massa (LC-TMS)

Un isotopo stabile marcato con Deuterio (<sup>3</sup>D-25-hydroxyvitamin D) viene aggiunto a 0,2 mL di campione di plasma come standard interno.

La 25-OHD<sub>2</sub>, la 25-OHD<sub>3</sub> e lo standard interno vengono estratti utilizzando una precipitazione con acetonitrile. Gli estratti vengono poi purificati e analizzati direttamente con la LC-TMS. I livelli di 25-OHD<sub>2</sub> e di 25-OHD<sub>3</sub> sono determinati singolarmente. La somma delle due misurazioni è stata utilizzata per determinare il contenuto totale di 25-OHD negli studi di correlazione qui descritti.

#### RIA

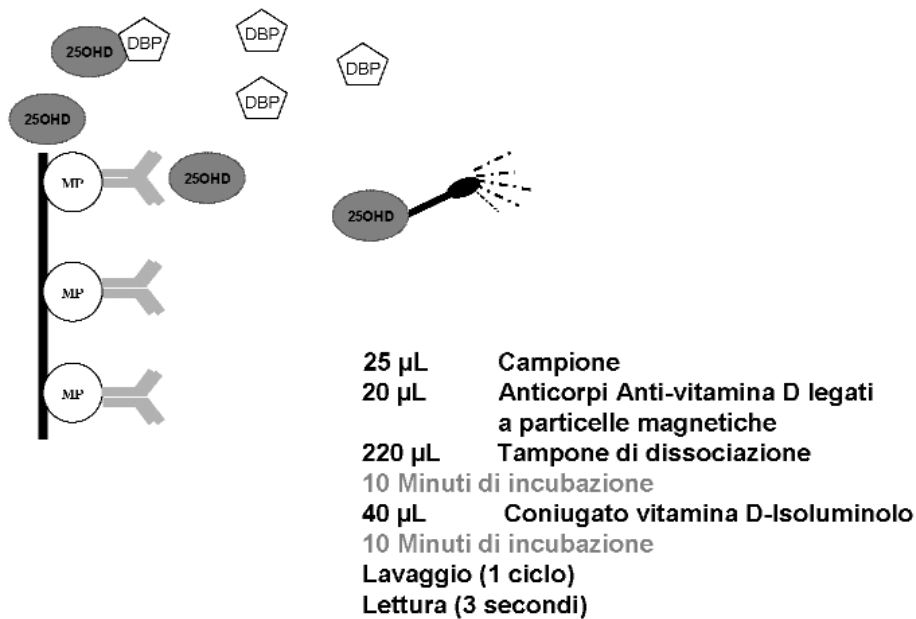
Il metodo RIA per la determinazione della 25-OHD utilizza un anticorpo diretto contro la molecola della 25-OHD. Lo stesso anticorpo è utilizzato nel dosaggio LIAISON<sup>®</sup><sup>4,17</sup>. La 25-OHD viene separata dalle proteine leganti ed estratta dal plasma o dal siero utilizzando un protocollo di precipitazione ed estrazione con acetonitrile. Dopo l'estrazione il dosaggio viene effettuato direttamente sul sovratanante. L'estratto che contiene la 25-OHD endogena, l'anticorpo e la 25-OHD marcata con <sup>125</sup>I, vengono incubati in presenza di un secondo anticorpo precipitante. In seguito la centrifugazione separa il complesso tracciante-25-OHD-anticorpo dalla 25-OHD marcata non legata.

#### LIAISON<sup>®</sup>

La metodica LIAISON<sup>®</sup> 25 OH Vitamin D TOTAL utilizza un metodo diretto per la misurazione dei livelli della 25-OHD attraverso un dosaggio competitivo chemiluminescente (CLIA) a due passaggi analitici. La fase solida è costituita da un anticorpo specifico per la 25-OHD (lo stesso utilizzato nel metodo RIA) legato a particelle magnetiche. Il tracciante è formato da un complesso che lega la 25-OHD ad un derivato dell'isoluminolo.

Durante la prima incubazione, la 25-OHD endogena viene dissociata dalle proteine leganti e lega l'anticorpo specifico adeso alle particelle magnetiche. Nella seconda incubazione la vitamina D marcata con isoluminolo lega i siti liberi dell'anticorpo. Dopo l'incubazione i reagenti non legati vengono eliminati tramite un ciclo di lavaggio. La reazione chemiluminescente di tipo "flash" viene stimolata dall'aggiunta automatica, da parte dello strumento LIAISON<sup>®</sup>, dei reagenti starter. Il segnale luminoso viene misurato dal fotomoltiplicatore come Relative Light Units (RLU) ed è inversamente proporzionale alla concentrazione di 25-OHD presente in calibratori, controlli o campioni (Fig. 1).

La produttività analitica del dosaggio su LIAISON<sup>®</sup> è di 100 dosaggi per ora, l'intervallo per ottenere il primo risultato è di 35 minuti.



**Figura 1**  
Schema analitico ed operativo del metodo LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL

**CAMPIONI UTILIZZATI PER IL CONFRONTO DELLE METODICHE**

I dosaggi con i metodi RIA e LIAISON® (DiaSorin, Inc, Stillwater, MN) sono stati eseguiti su campioni di pazienti per i quali era stata richiesta la determinazione della 25-OH vitamina D. I dosaggi effettuati con la tecnica LC-TMS sono stati eseguiti presso la Mayo Clinic and Foundation, (Rochester, MN, USA).

**RISULTATI E DISCUSSIONE**

**Efficienza di estrazione e correlazione verso LC-TMS**

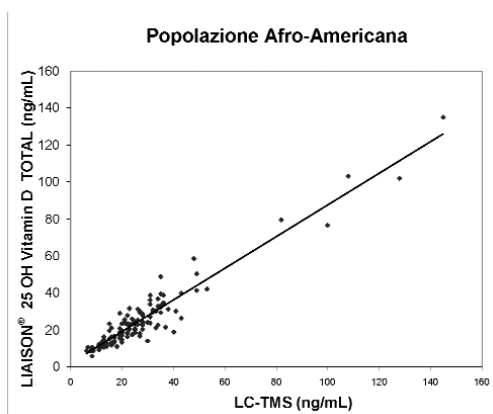
In letteratura è stato riportato come la forma di proteina

legante la vitamina D (DBP) più comune negli afro-americani mostri un'affinità più elevata nei confronti dei metaboliti della vitamina D<sup>23</sup>, rispetto all'affinità trovata nella razza caucasica; altri riferimenti concludono che non ci sia differenza di affinità tra le isoforme della proteina legante<sup>24</sup>.

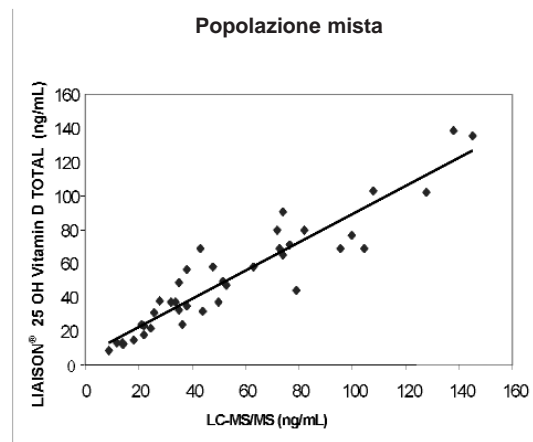
In Figura 2 è riportato il confronto ottenuto determinando la concentrazione della 25-OHD in 125 campioni di sangue provenienti da una popolazione afro-americana. I metodi utilizzati erano: LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL e la spettrometria di massa (LC-TMS).

In Figura 3 è invece riportata la correlazione trovata, dosando 38 campioni proveniente da popolazione mista, tra il metodo LIAISON® e la spettrometria di massa.

Il coefficiente di correlazione ( $R = r^2$ ) è risultato maggiore di 0.94 in tutti i confronti e le correlazioni sono risultate



**Figura 2**  
Regressione lineare ottenuta confrontando i risultati del metodo DiaSorin LIAISON® con il metodo LC-TMS su campioni di popolazione Afro-Americana (n=125)  
DiaSorin LIAISON® = 0,86\*(LC-TMS) +1,7; R = 0,96



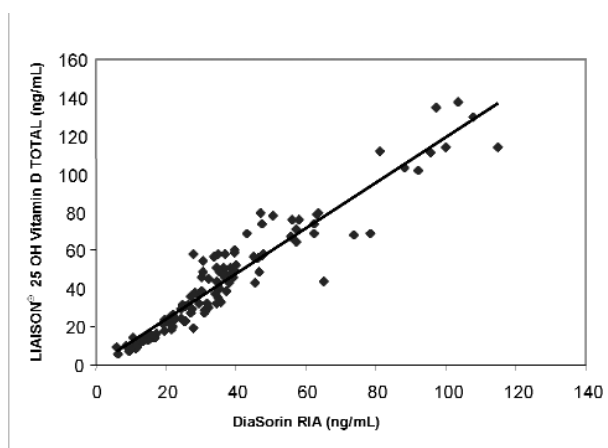
**Figura 3**  
Regressione lineare ottenuta confrontando i risultati del metodo DiaSorin LIAISON® con il metodo LC-TMS su campioni di popolazione mista (n=38).  
DiaSorin LIAISON® = 0,82\*(LC-TMS) +5,6; R = 0,94

simili ed eccellenti sia nello studio della popolazione afro-americana che nello studio sulla popolazione mista afro-americana e caucasica.

Questi risultati dimostrano come l'estrazione utilizzata nel metodo LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL separi efficacemente la 25-OH vitamina D dalle sue proteine leganti sia nei campioni provenienti da popolazione caucasica che nei campioni provenienti da popolazione afro-americana<sup>25</sup>. In condizioni quindi di differente affinità delle proteine leganti nei confronti dell'analita, il metodo LIAISON® si comporta con uguale accuratezza.

### Correlazione tra il nuovo metodo Liaison® e il kit 25-hydroxyvitamin D RIA

La correlazione fra i metodi DiaSorin RIA e LIAISON® è stata eseguita misurando la concentrazione sierica di 25-OHD in 109 campioni di soggetti eterogenei e ha prodotto i seguenti risultati<sup>26</sup> (Fig. 4).



**Figura 4**  
 Regressione lineare ottenuta confrontando i risultati del metodo DiaSorin LIAISON® con il metodo DiaSorin RIA su campioni di popolazione eterogenea (n=109).  
 $\text{DiaSorin LIAISON}^\circledast = 1,19 (\text{DiaSorin RIA}) + 0,31; R = 0,95.$

### Precisione

La precisione del dosaggio è stata valutata seguendo i protocolli EP15-A2 del CLSI. Sei campioni di riferimento, a diverse concentrazioni di analita, sono stati esaminati in

duplicato, in due sedute per giorno, nell'arco di venti giorni di lavoro, al fine di determinare la ripetibilità e la riproducibilità del saggio (ossia variabilità intra-saggio e intersaggio). I valori ottenuti sono riportati nella Tabella 1.

### Specificità

I dati sulla reattività crociata dell'antisiero utilizzato in questo saggio sono stati ottenuti mediante aggiunta di concentrazioni fino a 100 ng/mL del potenziale reagente crociato prima del dosaggio. La reattività crociata di ciascun componente, normalizzata rispetto alla 25-OH-vitamina D<sub>3</sub>, è riportata nella Tabella 2.

### Specificità *in vivo* verso i metaboliti della 25-OH vitamina D

Per verificare ulteriormente la specificità verso i metaboliti 25-OH vitamina D<sub>2</sub> e 25-OH vitamina D<sub>3</sub>, un recente studio ha confrontato i risultati ottenuti su 110 campioni classificati con il metodo in spettrofotometria di massa, con i risultati ottenuti con il kit LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL.

Il metodo in spettrofotometria di massa dà risultati separati per 25-OHD<sub>2</sub> e 25-OHD<sub>3</sub>, ma è stato dimostrato che non esiste utilità clinica nel refertare separatamente i due metaboliti nel follow-up<sup>29</sup>.

Il metodo LIAISON® fornisce un singolo risultato che rappresenta la somma della concentrazione dei due metaboliti.

Dei 110 campioni, 46 contenenti livelli di 25-OHD<sub>2</sub> dosabili con la spettrometria di massa. I valori ottenuti erano 4-45 ng/mL 25-OHD<sub>2</sub> se dosati con LC-TMS e 6-53 ng/mL se dosati con il metodo LIAISON®. I restanti 64 campioni contenevano sia 25-OHD<sub>2</sub> che 25-OHD<sub>3</sub>.

Le equazioni di regressione erano simili:

$$\begin{aligned} \text{LIAISON}^\circledast &= 0,88(\text{LC-TMS}) + 1,9; R = 0,90 \\ &\text{per i campioni contenenti solo 25-OHD}_3; \\ \text{LIAISON}^\circledast &= 0,80(\text{LC-TMS}) + 3,6; R = 0,78 \\ &\text{per i campioni contenenti 25-OHD}_3 \text{ e } \\ &\text{25-OHD}_2; \\ \text{LIAISON}^\circledast &= 0,83(\text{LC-TMS}) + 2,7; R = 0,87 \\ &\text{per tutti i campioni.} \end{aligned}$$

Non era inoltre evidente alcuna tendenza alla sovra o sottostima per valori crescenti di 25-OHD<sub>2</sub><sup>27</sup>

**Tabella 1**

Ripetibilità (variabilità intra-saggio) e riproducibilità (variabilità inter-saggio) del metodo LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL

Intra-dosaggio	A	B	C	D	E	F
n. determinazioni	80	80	80	80	80	80
Media (ng/mL)	4,5	12,4	15,3	36,2	57,4	87,3
Deviazione Standard (ng/mL)	0,21	0,73	0,81	1,4	2,6	2,8
Coefficiente di variazione (%)	5	6	5	4	5	3
Inter-dosaggio	A	B	C	D	E	F
n. determinazioni	80	80	80	80	80	80
Media (ng/mL)	4,5	12,4	15,3	36,2	57,4	87,3
Deviazione Standard (ng/mL)	0,50	0,94	1,04	2,1	3,3	4,8
Coefficiente di variazione (%)	11	8	7	6	6	6

## Cross-reazione nei confronti del C-3 Epimero

Concentrazioni sieriche elevate di 3-epi-25 OH vitamin D<sub>2/3</sub> si trovano in bambini sotto un anno di età.

Sebbene non se ne conoscano conseguenze biologiche, nella pratica clinica questo può portare ad una sovrastima della concentrazione di 25-OHD<sup>28</sup> e di conseguenza ad un mancato trattamento terapeutico in casi di carenza vitaminica. L'anticorpo utilizzato nel kit LIAISON® 25-OHD TOTAL non reagisce con la 3-epi-25-OH vitamina D<sub>2/3</sub>, permettendo un'accurata misurazione della concentrazione di 25-OHD nel siero.

**Tabella 2**

Reattività crociata del metodo LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL

Steroidi	Reattività crociata (%)
25-OH vitamina D <sub>3</sub>	100
25-OH vitamina D <sub>2</sub>	100
Vitamina D <sub>2</sub>	<1
Vitamina D <sub>3</sub>	<1
1,25-(OH) <sub>2</sub> vitamina D <sub>2</sub>	40
1,25-(OH) <sub>2</sub> vitamina D <sub>3</sub>	17
3-epi-25 OH vitamina D <sub>3</sub>	<1

## Sensibilità

La sensibilità analitica (limite di rilevazione) è definita come la minima dose rilevabile di analita, che può essere distinta dal punto zero.

Il valore trovato è < 1 ng/mL.

La sensibilità funzionale è definita come la concentrazione della dose alla quale il CV% è superiore al 20%. Sono stati preparati dei campioni a concentrazioni nominali comprese tra 2 e 14 ng/mL che sono stati analizzati in 20 sedute analitiche allo scopo di determinarne la concentrazione media e il coefficiente di variazione (CV%).

Il valore trovato è < 4 ng/mL

## CONCLUSIONI

Gli studi di confronto eseguiti dimostrano che i risultati ottenuti con il metodo RIA e con il metodo LIAISON® sono altamente correlati e mostrano equivalenza clinica nell'intervallo di misurazione dei dosaggi: 4-150 ng/mL.

La valutazione della concentrazione serica di 25-OHD con la metodica LIAISON® in soggetti in cui si sospetta una alterata affinità delle proteine leganti nei confronti della 25-OHD, fornisce risultati strettamente correlati a quelli ottenuti con il metodo LC-TMS, attualmente considerato il metodo di riferimento per la misurazione della 25-OHD.

La validità clinica nel monitoraggio del trattamento di insufficienza o carenza da 25-OH vitamina D è confermata dagli studi di recupero eseguiti con il metodo LIAISON® su campioni di soggetti contenenti solo 25-OHD<sub>3</sub> o 25-OHD<sub>2</sub> e 25-OHD<sub>3</sub>, classificati con la spettrometria di massa.

Il metodo LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL si conferma quindi: accurato, specifico, sensibile e preciso e

assicura una eccellente affidabilità clinica unita alla velocità e praticità di esecuzione.

Le principali caratteristiche del metodo LIAISON® 25-OH Vitamin D TOTAL sono:

- Incubazione a 2 passaggi
- Concentrazione dei calibratori: 2 e 75 ng/mL
- Sensibilità analitica: 1 ng/mL
- Sensibilità funzionale: 4 ng/mL
- Ampiezza del dosaggio: 4 – 150 ng/mL
- Precisione intra-saggio: 3-6%
- Precisione inter-saggi: 6-11%
- Specificità: 100% 25-OHD<sub>3</sub> e 100% 25-OHD<sub>2</sub>
- Produttività analitica: 100 test/ora
- Tempo per il primo risultato: 35'

## BIBLIOGRAFIA

1. **Pagana K.D. and Pagana T.J.** Mosbys Manual of Diagnostic and Laboratory Tests. Second edition. 1998.
2. **MacFarlane G.D., Sackrison J.L., Body J.J., et al.** Hypovitaminosis D in a normal, apparently healthy urban European population. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 89-90:621-2.
3. **Holick MF.** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80: 1678S-88S.
4. **MacFarlane G.D., Sackrison J.L., Ersfeld D.L., et al.** Evaluation of 25 OH Vitamin D in chronic renal failure and end stage renal disease subjects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90:619-20.
5. **Hollis B.W., Kamerud J.Q., Selvaag S.R., et al.** Determination of vitamin D status by radioimmunoassay with an <sup>125</sup>I-labeled tracer. *Clin Chem.* 1993; 39:529-33.
6. **Hollis B.W., Napoli J.L.** Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem.* 1985;31:1815-9.
7. **Armas L.A., Hollis B.W., Heaney R.P.** Vitamin D<sub>2</sub> is much less effective than vitamin D<sub>3</sub> in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 5387-91.
8. **Hollis B.W.** Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89: 3149-51.
9. **Trang H.M., Cole D.E., Rubin L.A., et al.** Evidence that vitamin D<sub>3</sub> increases serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D<sub>2</sub>. *Am J Clin Nutr.* 1998; 68:854-8.

10. **Burtis C.A. and Ashwood E.R.** Tietz Handbook of Clinical Chemistry, 39; 1417, 3rd edition.
11. **Calvo M.S., Whiting S.J., Barton C.N.** Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1710S-6S.
12. **Weaver C.M. and Fleet J.C.** Vitamin D requirements: current and future. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1735S-9S.
13. **Raiten D.J, Picciano M.F.** Vitamin D and health in the 21st century: bone and beyond. Executive summary. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1673S-7S.
14. **Heaney R.P.** Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *Am J Clin Nutr.* 2004; 80:1760S-9S.
15. **Vieth R., Kimball S., Hu A., et al.** Randomized comparison of the effects of the vitamin D<sub>3</sub> adequate intake versus 100 mcg (4000 IU) per day on biochemical response and the well being of patients. *Nutr J.* 2004; 3:8.
16. **Vieth R., Chan P.C., MacFarlane G.D.** Efficacy and safety of vitamin D<sub>3</sub> intake exceeding the lowest observed adverse effect level. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73: 288-94.
17. **Hollis B.W.** Circulating 25-hydroxyvitamin D levels indicative of vitamin D sufficiency: implications for establishing a new effective dietary intake recommendation for Vitamin D. *J Nutr* 2005; 135: 317-22.
18. **Vieth R.** Why the optimal requirement for Vitamin D<sub>3</sub> is probably much higher than what is officially recommended for adults. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 89-90:575-9.
19. **Vieth R.** Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentration and safety. *Am J Clin Nutr.* 1999; 69:842-56.
20. **Dawson-Hughes B., Heaney R.P., Holick M.F., et al.** Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int.* 2005 Mar 18; [Epub ahead of print]
21. **Lippincott, Raven.** Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. M.J. Favus editor. Third Edition. 1996.
22. **Bischoff-Ferrari H.A., Giovannucci E., Willett W.C., et al.** Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84: 18-28.
23. **Braun A., Brandhorfer A., Cleve H.** Interaction of the vitamin D-binding protein (group-specific component) and its ligand 25-hydroxy-vitamin D<sub>3</sub>: binding differences of the various genetic types disclosed by isoelectric focusing. *Electrophoresis* 1990; 11:478-83.
24. **Boutin B., Albraith R.M., Arnaud P.** Comparative affinity of the major genetic variants of human group-specific component (vitamin D-binding protein) for 25-(OH) vitamin D. *J Ster Biochem* 1989; 32:59-63.
25. **Podgorski A.L., Belisle K., Fenske J.S., et al.** Assessment of 25 OH Vitamin D in Samples from African Americans by Different Extraction Methods. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: S221.
26. **Frenzel E.M., Friedberg M.A., Terhaar P.J., et al.** Clinical Validation of the LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL Assay. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: S221.
27. **Schmidt J.A., Frenzel E.M., Friedberg M.A., et al.** Measurement of 25 OH Vitamin D<sub>2</sub> by the LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL Assay. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: S221.
28. **Singh R.J., Taylor R.L., Reddy G.S., et al.** C-3 Epimers Can Account for a Significant Proportion of Total Circulating 25-Hydroxyvitamin D in Infants, Complicating Accurate Measurement and Interpretation of Vitamin D Status. *JCEM* 2006; 91: 3055-61.
29. **Binkley N., Drezner M.K., Hollis B.W.** Laboratory Reporting of 25-Hydroxyvitamin D Results: Potential for Clinical Misinterpretation. *Clin Chem* 2006; 52: 2124-5.

*Per corrispondenza:*

Dott.ssa Margherita Banci  
Corporate Marketing Manager  
DiaSorin SPA  
via per Crescentino SNC, 13040 Saluggia (VC)  
Tel +39 0161/487081 - Fax: +39 0161487625  
e-mail: margherita.banci@diasorin.it