

Особенности лабораторной диагностики статуса витамина D

Расширенный реферат статьи Couchman L., Moniz C.F. Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status // *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2017 Apr; 9 (4): 97–104.

Реферат подготовлен Г.Е. Руновой.

Резюме

Наиболее широко используемым и клинически признанным биохимическим маркером для оценки статуса витамина D является общий 25-гидроксивитамин D (25(OH)D). Несмотря на то что впервые исследование 25(OH)D стало возможным в начале 1970-х гг., современные аналитические методы все еще подвержены значительной вариабельности из-за присутствия различных метаболитов витамина D и различий в оснащении лабораторий. Для клиницистов важно понимать все нюансы и ограничения определения 25(OH)D и при необходимости запрашивать у лаборатории информацию об используемых аналитических методах. Первичные референсные процедуры для определения 25(OH)D, основанные на жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии, не предназначенные для рутинного анализа клинических образцов, должны использоваться для улучшения гармонизации образцов и уменьшения межлабораторной вариабельности. Лаборатории также должны быть готовы к сотрудничеству и оформлению подписки на внешние программы оценки качества и прослеживаемости результата. Помимо обсуждения причин сохраняющейся вариабельности результатов исследования 25(OH)D, в данном кратком обзоре будут затронуты вопросы определения других показателей, связанных с оценкой статуса витамина D, в том числе паратиреоидного гормона, 24,25-дигидроксивитамина D, 1,25-дигидроксивитамина D и витамин D-связывающих белков.

Введение

Под термином «статус витамина D» подразумевается уровень витамина D в организме конкретного индивида (дефицит, адекватное содержание или избыток витамина) [1]. Наиболее широко используемым и клинически достоверным биохимическим маркером для оценки статуса витамина D является концентрация 25-гидроксивитамина D (25(OH)D) в сыворотке крови. Это обусловлено относительно длинным периодом полураспада данного соединения и тем фактом, что 25(OH)D не подвержен жесткому гомеостатическому контролю [3–5].

Тем не менее пороговое значение 25(OH)D в сыворотке крови для определения статуса витамина D является активно обсуждаемой темой. В клинических рекомендациях Института медицины США, разработанных с учетом костных эффектов витамина D, предлагается диагностировать дефицит витамина D при его уровне менее 30 нмоль/л (12 мкг/л), недостаточность 25(OH)D — при концентрации витамина D в диапазоне от 30 до 50 нмоль/л (12–20 мкг/л) и

адекватный уровень 25(OH)D при его значениях более 50 нмоль/л (20 мкг/л) [6].

В клинических рекомендациях Европейского эндокринологического общества, напротив, указывается, что отрезная точка для диагностики дефицита витамина D соответствует 50 нмоль/л, а оптимальный уровень витамина D для обеспечения положительных эффектов в отношении влияния на метаболизм кальция, костной и мышечной ткани должен превышать 75 нмоль/л (30 мкг/л) [7, 8].

Согласно клиническим рекомендациям, опубликованным после международной встречи экспертов в области исследования витамина D, состоявшейся в Варшаве в 2012 г., оптимальный уровень 25(OH)D соответствует 30–50 нг/мл и может достигать до 100 нг/мл [9]. Тем не менее относительно недавно необходимость достижения очень высоких концентраций 25(OH)D была подвергнута сомнению [10].

В некоторых клинических ситуациях исследование уровня 25(OH)D является важным этапом диагностического поиска. Однако

необходимо признать, что лабораторная оценка статуса витамина D является непростой задачей. Вполне вероятно, что вариабельность показателя 25(OH)D является одной из причин различающихся пороговых значений оптимального уровня витамина D по данным различных организаций. Следует помнить, что метаболический путь витамина D представляет собой очень сложную и динамичную систему, включающую множество структурно похожих соединений [11]. В некоторых клинических ситуациях может требоваться исследование других метаболитов, помимо 25(OH)D, для оценки истинного статуса витамина D, а также определение других показателей фосфорно-кальциевого обмена, включая паратиреоидный гормон (ПТГ), транспортные белки, такие как витамин D-связывающий белок (VDBP).

При исследовании статуса витамина D клиницистам необходимо помнить как минимум о двух нюансах: во-первых, о значительной вариабельности аналитических методов исследования 25(OH)D, что подчеркивает важность теку-

щей работы по созданию единого стандарта определения 25(OH)D [12]; во-вторых, о возможности исследования дополнительных биомаркеров, что потенциально может сформировать более полную картину статуса витамина D, а также использование современных аналитических методов для исследования некоторых из этих молекул [13, 14].

25-гидрокси-витамин D

При исследовании 25(OH)D важно понимать ограничения лабораторной диагностики и их связь с физиологией метаболизма витамина D. Любая аналитическая платформа, используемая для определения 25(OH)D, имеет свои преимущества и недостатки, которые вносят вклад в вариабельность результатов. Наличие большого количества структурно похожих гидрофобных метаболитов витамина D, а также циркуляция метаболитов витамина D в составе витамин D-связывающего белка, существенно влияет на достоверность конечного результата [15].

Впервые определение 25(OH)D стало доступно в начале 1970-х гг. с использованием наборов, основанных на конкурентном связывании белков [16]. В настоящее время, как правило, используются иммунометрические методы определения витамина D или реже — жидкостная хроматография с ультрафиолетовыми (УФ) или масс-спектрометрическими детекторами.

Методы, основанные на иммуноанализе, по своей сути достаточно чувствительны, требуют небольшого объема образцов по сравнению с хроматографическими методами. Основная привлекательность для высокопроизводительной биохимической лаборатории заключается в том, что эти анализаторы легко интегрируются в полностью автоматизированный цикл, обеспечивая быстрое получение конечного результата. Тем не менее слабым местом иммунологических методов является перекрестное связывание с различными метаболитами витамина D. Это просто продемонстрировать на примере перекрестного опреде-

ления 25-гидрокси-витамина D₂ (25(OH)D₂, кальцидиол, эргокальциферол) и 25-гидрокси-витамина D₃ (25(OH)D₃, кальцитриол) двумя иммунометрическими методами: методом А, который в равной степени способен определять оба соединения; и методом В, который только частично определяет 25(OH)D₂. У пациента, принимающего витамин D₂, исследование уровня витамина D методом В будет приводить к ложному занижению общего уровня 25(OH)D исключительно из-за аналитического артефакта. Данное утверждение справедливо в отношении других метаболитов витамина D, присутствующих в кровотоке в значительно более низких концентрациях, например 24,25-дигидрокси-витамина D (24,25(OH)₂D), неактивного метаболита 25(OH)D₃.

Еще одним слабым местом иммунологических анализаторов является витамин D-связывающий белок (VDBP). При измерении общего 25(OH)D аналит сначала должен быть освобожден от связывающих белков. Методы, используемые для этого в автоматических анализаторах различных производителей, защищены патентом. Таким образом, изменение концентрации VDBP (например, при беременности или у пациентов на диализе) может оказывать влияние на результат 25(OH)D при использовании некоторых автоматических иммуноанализаторов [1].

Жидкостная экстракция и хроматографическое фракционирование стали первыми методами для определения 25(OH)D в 1970-х гг. [16]. Независимое исследование метаболитов витамина D обеспечивает ряд преимуществ. Наиболее очевидным является возможность разделения 25(OH)D₂ и 25(OH)D₃ и, следовательно, независимого их количественного определения.

В первых моделях хроматографов использовалась жидкостная хроматография с УФ-детекторами [18], но в последнее время предпочтение отдается жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS). При жидкостной хроматографии с УФ-детектором селективность метода

достигается за счет хроматографического выделения отдельных метаболитов, поскольку система обнаружения относительно неспецифична. При введении масс-спектрометрии метаболиты витамина D селективно обнаруживаются на основании значений отношения массы к заряду (m/z). Кроме того, что особенно важно для количественного анализа, такого как 25(OH)D, масс-спектрометрия позволяет включить стабильные изотоп-меченные внутренние стандарты.

Несмотря на очевидные преимущества, LC-MS/MS не лишена ошибок в определении 25(OH)D. За последние несколько лет намечился значительный прогресс в автоматизации технологии LC-MS/MS [19], но до полной автоматизации «от образца к результату», свойственной иммунологическим методам, LC-MS/MS еще далеко. Сложность оборудования для LC-MS/MS обуславливает вариабельность ряда технических параметров и, соответственно, межлабораторную вариабельность [20].

Результат, полученный методом LC-MS/MS, не гарантирует абсолютную точность, хотя гибкость аналитической платформы LC-MS/MS делает такой подход текущим «золотым стандартом» в определении витамина D. Например, 3-эпимер 25-гидрокси-витамина D₃ (3-эпи-25(OH)D₃), впервые описанный как основной метаболит в крови новорожденных [21], также способен присутствовать в образцах крови, полученных от взрослых [22], чаще в относительно низких концентрациях или низкой пропорции по отношению к 25(OH)D [23]. Источник 3-эпимера и его биологическая роль остаются в значительной степени невыясненными [24], тем не менее он может являться аналитическим артефактом при использовании LC-MS/MS. Данный метаболит отличается от 25(OH)D₃ лишь пространственным расположением гидроксильной группы в положении 3. Иммунологические методы не определяют данный метаболит [15], но так как масс-спектрометрия не учитывает хиральность молекул, она не поз-

воляет дифференцировать эти два метаболита до тех пор, пока они не разделены хроматографически. С помощью современного оборудования последнее легко достигается без значительного увеличения времени анализа [25]. Кроме того, после хроматографического разделения (с подходящими аналитическими стандартами для калибровки анализа) можно проспективно оценить количество 3-эпимеров в образцах крови разных групп пациентов. Это позволит исследовать возможное влияние эпимеров на статус витамина D и получить ответы на вопрос об их биологической роли. В ряде работ, выполненных по данной тематике, получены низкие, но различные концентрации 3-эпимеров относительно 25(OH)D [24].

Стандартные референсные процедуры и материалы

Гармонизация метода исследования 25(OH)D представляла проблему в течение многих лет. В 1989 г. была организована международная программа стандартизации определения витамина D (The Vitamin D External Quality Assessment Scheme, DEQAS) в ответ на опасения по поводу низкой воспроизводимости и большой вариабельности между различными наборами для определения 25(OH)D [26, 27]. Внедрение данной программы привело к резкому сокращению вариабельности между участвующими лабораториями.

Внедрение стандартных референсных материалов (SRMs) и разработка стандартной референсной процедуры (RMPs) позволили существенно продвинуться в гармонизации исследования 25(OH)D. Последний вариант SRM (SRM 972a), разработанный Национальным институтом стандартов и технологий США (NIST) в сотрудничестве с Национальным институтом здравоохранения и пищевых добавок, включает четыре образца сыворотки крови человека, содержащие разную концентрацию метаболитов витамина D, включая 25(OH)D₂, 25(OH)D₃, 3-эпи-25(OH)D₃ и 24,25(OH)₂D₃. SRMs коммерчес-

ки доступны и предназначены для использования в клинических лабораториях для валидации метода. Каждый SRM сопровождается сертифицированными референсными значениями, присвоенными с помощью NIST RMP [28, 29]. Последующие методики, разработанные Университетом Гента и Центром по контролю заболеваемости (CDC), были валидизированы и аккредитованы в соответствии со стандартами ISO 15193 и JCTLM [30, 31]. Все три метода основаны на LC-MS/MS с изотопным разведением и участвуют в гармонизации исследования 25(OH)D в соответствии с программой стандартизации оценки витамина D. Однако RMP являются дорогостоящими и трудоемкими и, следовательно, не подходят для использования в лабораториях с высокой пропускной способностью для исследования 25(OH)D.

Тем не менее RMPs бесценны для лабораторий в отношении определения референсных диапазонов для оценки индивидуальной эффективности анализа. Всем образцам DEQAS приписаны концентрации с использованием NIST RMP. Всем образцам внешнего контроля качества Коллегии американских патофизиологов (EQA) приписаны концентрации с использованием CDC RMP. CDC также предлагает программу стандартизации, на которую могут подписаться лаборатории [32]. Лаборатории должны обеспечить для клиницистов доступность информации об их участии в программах DEQAS и отслеживания методов для SRM и/или RMP. Клиницисты, в свою очередь, в случае малейших сомнений могут запрашивать у лаборатории постановление о прослеживаемости анализа. В идеале лаборатории должны предоставлять обоснование для указанных в отчете референсных значений.

Влияние на результат витамина D других показателей фосфорно-кальциевого обмена

24R,25-дигидрокси-витамин D
Клиническая значимость исследования 24,25(OH)₂D в оценке статус-

са витамина D остается открытым вопросом. 24,25(OH)₂D является наиболее распространенным продуктом катаболизма 25(OH)D под действием 24-гидроксилазы (CYP24A1). Концентрация 24,25(OH)₂D составляет приблизительно 10 % от содержания 25(OH)D [33]. Тем не менее данная пропорция подвержена значительной вариабельности (от 2 до 20 %), особенно при низком уровне 25(OH)D [34]. В ряде работ показано, что при определяемых сывороточных концентрациях 24,25(OH)₂D наблюдается четкая корреляция между уровнем 24,25(OH)₂D и 25(OH)D. Однако при низких значениях 25(OH)D (менее 25 нмоль/л, 10 мкг/л) 24,25(OH)₂D находится за аналитическими пределами обнаружения метода [25].

Увеличение соотношения 25(OH)D к 24,25(OH)₂D имеет клиническое значение в диагностике очень редкого варианта гиперкальциемии из-за мутации с потерей функции CYP24A1 [25, 35]. Соотношение 25(OH)D и 24,25(OH)₂D также может нести дополнительную информацию при оценке дефицита витамина D, хотя это предположение требует дальнейшего подтверждения. Более того, его исследование проблематично при неопределяемой концентрации 24,25(OH)₂D (т.е. при низких концентрациях 25(OH)D). В двух работах было продемонстрировано, что в связи с увеличением соотношения 25(OH)D/24,25(OH)₂D уровень 25(OH)D₃ в ответ на дополнительный прием витамина D₃ уменьшается [33, 36]. У пациентов с хронической болезнью почек (ХБП) клиническую значимость исследования соотношения также можно поставить под сомнение, так как показано, что сывороточная концентрация 24,25(OH)₂D традиционно низкая у таких пациентов независимо от уровня 25(OH)D [34].

С аналитической точки зрения показатель 24,25(OH)₂D в настоящее время является узкопрофильным тестом, доступным в некоторых специализированных лабораториях и, как правило, выполняющийся при помощи LC-MS/MS. Часто для повышения аналитической чувствительности соединения

подвергаются химической дериватизации до выделения [25], хотя это не всегда требуется с более современным и чувствительным оборудованием для LC-MS/MS [29]. Допуская возможность того, что 24,25(OH)₂D может оказаться ценным дополнительным биомаркером и, удовлетворяя интерес к его исследованию со стороны ряда исследователей, NIST разработан кандидат RMP для 24,25(OH)₂D [29]. Существуют также данные, свидетельствующие о том, что 24,25(OH)₂D перекрестно определяется в иммунологических наборах для определения 25(OH)D, что может создавать проблемы при исследовании 25(OH)D у пациентов с повышенным уровнем 24,25(OH)₂D [33].

1,25-дигидрокси-витамина D

Ошибочно предполагать, что раз 1,25-дигидрокси-витамин D (1,25(OH)₂D) является активной формой витамина D, он должен быть оптимальным маркером для оценки статуса витамина D. Концентрация 1,25(OH)₂D в сыворотке крови в 1000 раз меньше, чем таковая у 25(OH)D (типичный референсный диапазон составляет ~6–30 пмоль/л/~15–75 пг/мл), и она находится под жестким гомеостатическим контролем. У пациентов с дефицитом витамина D концентрация 1,25(OH)₂D, как правило, находится в пределах референсного диапазона или даже повышена в связи с развитием вторичного гиперпаратиреоза [7, 37]. Только при очень низких концентрациях 25(OH)D (менее ~10 нмоль/л (4 мкг/л)) наблюдается снижение уровня 1,25(OH)₂D — вероятнее всего, в связи с отсутствием субстрата для его синтеза [38]. Прием витамина D в таких клинических случаях сопровождается повышением уровня 25(OH)D и 1,25(OH)₂D [39].

Тем не менее в ряде клинических ситуаций может потребоваться дополнительное исследование уровня 1,25(OH)₂D. При ХБП, если пациент не получает активные метаболиты витамина D, наблюдается прогрессирующее снижение концентрации 1,25(OH)₂D параллельно снижению скорости клу-

бочковой фильтрации из-за нарушения работы 1α-гидроксилазы (CYP27B1), однако это не является прямым показанием для определения уровня 1,25(OH)₂D [39]. Более редкой причиной низкого сывороточного уровня 1,25(OH)₂D является витамин D-зависимый рахит типа 1A (ВДЗР 1), при котором наблюдается дефицит 1α-гидроксилазы, вызванный редкой аутосомно-рецессивной мутацией в гене CYP27B1. Увеличение уровня 1,25(OH)₂D наблюдается при повышении активности экстракrenalной 1α-гидроксилазы (например, при саркоидозе или гранулематозных заболеваниях) [40] или вследствие мутаций в гене рецептора витамина D, приводящих к развитию витамин D-зависимого рахита типа 2A (ВДЗР 2).

При передозировке витамина D уровень 1,25(OH)₂D, как правило, сохраняется в пределах референсных значений. На моделях грызунов было продемонстрировано, что токсичность витамина D не связана с избытком 1,25(OH)₂D [3]. Низкий уровень 1,25(OH)₂D при передозировке витамина D отражает подавление секреции ПТГ в ответ на гиперкальциемию [41]. Данное наблюдение вызывает интерес с точки зрения лабораторной диагностики 1,25(OH)₂D. Измерение уровня 1,25(OH)₂D сопровождается рядом аналитических сложностей из-за очень низких концентраций исследуемого вещества и присутствия потенциально более высоких концентраций других метаболитов. При помощи метода добавок (с имитацией передозировки витамина D и достижением токсичных концентраций) было продемонстрировано, что сывороточный уровень 1,25(OH)₂D искусственно завышается в связи с присутствием большого количества 25(OH)D [41]. Именно это является причиной увеличения 1,25(OH)₂D в большинстве случаев, а не редкие генетические мутации (например, в CYP24A1). Любопытен тот факт, что подобная интерференция наблюдалась как в широко используемых наборах для радиоиммуноанализа, так и в

LC-MS/MS. Необходимо признать, что перекрестные реакции значительно реже наблюдались при использовании LC-MS/MS. Как и в случае с 24,25(OH)₂D, при использовании LC-MS/MS аналитическая чувствительность метода может быть улучшена путем химической дериватизации. Но при этом необходимо учитывать, что этот метод является высокоспециализированным и доступен только в нескольких лабораториях. Международная программа стандартизации определения витамина D (DEQAS) предлагает схему тестирования 1,25(OH)₂D, которая должна использоваться в любой лаборатории для обеспечения точности результатов. При необходимости исследования уровня 1,25(OH)₂D для уточнения диагноза предпочтительным методом исследования является LC-MS/MS, несмотря на неплохую точность и меньший объем материала, необходимый для иммунологических методов. Это особенно важно в случае подозрения на передозировку витамина D, когда могут наблюдаться перекрестные реакции.

Витамин D-связывающие белки VDBP принадлежат к семейству генов альбумина [42]. Существуют три основные генетические изоформы VDBP у людей: Gc2, Gc1f и Gc1s [43] как результат полиморфизма гена GC. В последнее время большое внимание уделяется значению полиморфизма VDBP в статусе витамина D. Частота встречаемости аллелей трех основных изоформ VDBP тесно связана с географическим местоположением. Частота аллели Gc-1f заметно реже наблюдается в белой популяции, чем в популяции черных американцев и черных африканцев. У белых людей значительно чаще присутствует аллель Gc-2 [44].

В 2013 г. Powe и соавт. представили данные большой когорты черных и белых взрослых американцев. В этой когорте было выполнено исследование VDBP методом иммуноанализа и рассчитан уровень витамина D (как «биодоступный витамин D») [45]. Ключевая находка этого исследования

заклучалась в том, что концентрация 25(OH)D у черных американцев оказалась меньше, чем у белых американцев, но так как чернокожие американцы также имели более низкий уровень VDBP, рассчитанный биодоступный витамин D оказался лучшим маркером статуса витамина D, чем измеренный лабораторно 25(OH)D. Тем не менее совсем недавно было продемонстрировано, что моноклональные методы иммунного анализа, в том числе использовавшиеся в работе Rowe, подвержены изоформ-специфическим перекрестным связываниям. При использовании LC-MS/MS для определения концентрации VDBP раса/генотип VDBP не влияют на конечный результат [46]. Таким образом, результаты, полученные Rowe, могли быть недостоверными. В связи с этим для понимания роли различных изоформ VDBP и концентрации VDBP в статусе витамина D необходимо проведение иммунологических исследований с использованием поликлональных антител или LC-MS/MS [47].

Относительно недавно появился коммерчески доступный иммуноферментный анализ для прямого измерения свободного 25(OH)D. На сегодняшний день продемонстрирована сильная корреляция между свободным 25(OH)D и общим 25(OH)D независимо от расы и GC генотипа [48].

Паратиреоидный гормон

В то время как изолированное измерение 25(OH)D наиболее часто используется для оценки статуса витамина D, концентрация ПТГ в сыворотке обратно пропорциональна содержанию 25(OH)D, и именно это соотношение ПТГ/25(OH)D лежит в основе пороговых точек для принятия клинических решений. Как правило, уровень ПТГ крови повышается при дефиците витамина D. Достижение концентрации 25(OH)D, при которой наблюдается плато ПТГ в сыворотке крови, используется для определения адекватного уровня витамина D. Однако проблема заключается в том, что не у

всех пациентов с дефицитом витамина D будет развиваться вторичный гиперпаратиреоз [49].

С точки зрения аналитического этапа получения лабораторного результата измерение кальция в качестве дополнительного маркера интерпретации показателя ПТГ является относительно простым, анализ ПТГ (интактного ПТГ, содержащего 84-аминокислотных остатка) является технически сложным. Это особенно касается пациентов с ХБП, у которых молекулы ПТГ могут накапливаться и приводить к перекрестным реакциям [50] даже при использовании LC-MS/MS [51]. Как и в случае с 25(OH)D, существует потребность в гармонизации исследования ПТГ [52], но это требует референсного метода, который, к сожалению, в настоящее время не доступен. До этого времени клиницисты должны помнить об ограничениях исследования ПТГ у пациентов с ХБП.

Заключение

Оценка статуса витамина D имеет большое клиническое значение и непосредственно влияет на принятие решения о тактике лечения. На данный момент сывороточный уровень 25(OH)D остается наиболее приемлемым маркером статуса витамина D — либо изолированно, либо в сочетании с другими хорошо зарекомендовавшими себя показателями, такими как ПТГ. Однако необходимо признать тот факт, что исследование 25(OH)D является аналитически сложным. Сохраняется проблема отсутствия гармонизации исследования между лабораториями. Лабораториям настоятельно рекомендуется участие в программах стандартизации, таких как DEQAS. «Золотым стандартом» исследования 25(OH)D в настоящее время является LC-MS/MS, но эта стандартная референсная процедура часто сильно отличается от тех, которые выполняются в обычных, высокопроизводительных лабораториях. Для увеличения пропускной способности крупных лабораторий методы исследования витамина D при помо-

щи жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии в настоящее время полуавтоматизированы. Исследование дополнительных маркеров может быть необходимо в ряде редких клинических ситуаций, например при тяжелом дефиците витамина D и в случае подозрения на передозировку витамина D (при высокой концентрации 25(OH)D). Подобные исследования доступны в ряде специализированных центров. Как и в случае с 25(OH)D, жидкостная хроматография/танDEMная масс-спектрометрия является методом выбора для определения этих метаболитов. Недавние разработки, касающиеся определения изоформ VDBP и свободного 25(OH)D, несмотря на то что смогли предоставить ценную информацию о межпопуляционных различиях уровня витамина D, требуют дальнейших исследований.

Литература

- Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation and clinical application // *AnnEpidemiol* 2009; 19: 73–78.
- Holick MF. Vitamin D deficiency // *N Eng J Med* 2007; 357: 266–281.
- DeLuca HF, Prael JM and Plum LA. 1,25-Dihydroxyvitamin D is not responsible for toxicity caused by vitamin D or 25-hydroxyvitamin D // *Arch Biochem Biophys* 2011; 505: 226–230.
- Norman AW. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health // *Am J Clin Nutr* 2008; 88: 491S–499S.
- Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D // *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 26–34.
- Institute of Medicine (IOM). Dietary reference intakes for calcium and vitamin D. Washington, DC: The National Academies Press, 2011.
- Holick MF, Binkley NC, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline // *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1911–1930.
- Heaney RP. Health is better at serum 25(OH) D above 30 ng/ml // *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; 136: 224–228.
- Pludowski P, Karczmarewicz E, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in central Europe — recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency // *Endokrynol Pol* 2013; 64: 319–327.
- Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, et al. Monthly high-dose vitamin D treatment for the prevention

- of functional decline: a randomized clinical trial // *JAMA Intern Med* 2016; 176: 175–183.
11. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status // *Am J Clin Nutr* 2008; 87: 1087S–1091S.
 12. Sempos CT, Vesper HW, et al. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization // *Scan J Clin Lab Invest Suppl* 2012; 242: 32–40.
 13. Vogeser M, Bacher S and Seger C. Challenges in describing vitamin D status and activity // *LaboratoriumsMedizin* 2014; 38: 1–10.
 14. Carter GD and Phinney KW. Assessing vitamin D status: time for a rethink? // *Clin Chem* 2014; 60: 809–811.
 15. Carter GD. 25-Hydroxyvitamin D: a difficult analyte // *Clin Chem* 2012; 58: 486–488.
 16. Haddad JC and Chyu KJ. Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol // *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 33: 992–995.
 17. Heijboer AC, Blankenstein MA, et al. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration // *Clin Chem* 2012; 58: 543–548.
 18. Jones G. Assay of vitamins D2 and D3, and 25-hydroxyvitamins D2 and D3 in human plasma by high-performance liquid chromatography // *Clin Chem* 1978; 24: 287–298.
 19. Vogeser M and Kirchhoff F. Progress in automation of LC-MS in laboratory medicine // *Clin Biochem* 2011; 44: 4–13.
 20. Couchman L, Benton CM and Moniz CF. Variability in the analysis of 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: the devil is in the detail // *Clin Chim Acta* 2012; 413: 1239–1243.
 21. Singh RJ, Taylor RJ, 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 // *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 3055–3061.
 22. Shah I, James R, et al. Misleading measures in vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars // *Nutr J* 2011; 10: 46–55.
 23. Keevil BG. Does the presence of 3-epi-25OHD3 affect routine measurement of vitamin D using liquid chromatography tandem mass spectrometry? // *Clin Chem Lab Med* 2011; 50:181–183.
 24. Bailey D, Veljkovic K, et al. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer // *Clin Biochem* 2013; 46: 190–196.
 25. Kaufmann M, Gallagher JC and Peacock M. Clinical utility of simultaneous quantitation of 25-hydroxyvitamin D and 24,25-dihydroxyvitamin D by LC-MS/MS involving derivatization with DMEQ-TAD // *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 2567–2574.
 26. Binkley N, Krueger D, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization // *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3152–3157.
 27. Carter GD, Carter R, et al. How accurate are assays for 25-hydroxyvitamin D? Data from the international vitamin D external quality assessment scheme // *Clin Chem* 2004; 50: 2195–2197.
 28. Tai SS-C, Bedner M and Phinney K. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin-D3 and 25-hydroxyvitamin-D2 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-mass spectrometry // *Anal Chem* 2010; 82: 1942–1948.
 29. Tai SS-C and Nelson MA. Candidate reference measurement procedure for the determination of (24R),25-dihydroxyvitamin D3 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal Chem* 2015; 87: 7964–7970.
 30. Stepmán HC, Vanderroost A, et al. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Clin Chem* 2011; 57: 441–448.
 31. Mineva EM, Schleicher RL, et al. A candidate reference measurement procedure for quantifying serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Anal Bioanal Chem* 2015; 407:2955–2964.
 32. Stockl D, Sluss PM and Thienpont LM. Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis // *Clin Chim Acta* 2009; 408: 8–13.
 33. Cashman KD, Hayes A, et al. Significance of serum 24,25-dihydroxyvitamin D in the assessment of vitamin D status: a double-edged sword? // *Clin Chem* 2015; 61:636–645.
 34. Bosworth CR, Levin G, et al. The serum 24,25-dihydroxyvitamin D concentration, a marker of vitamin D catabolism, is reduced in chronic kidney disease // *Kidney Int* 2012; 82: 693–700.
 35. Ketha H, Kumar R and Singh RJ. LC-MS/MS for identifying patients with CYP24A1 mutations // *Clin Chem* 2016; 62: 236–242.
 36. Wagner D, Hanwell HE, et al. The ratio of serum 24,25-dihydroxyvitamin D3 to 25-hydroxyvitamin D3 is predictive of 25-hydroxyvitamin D3 response to vitamin D3 supplementation // *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 126: 72–77.
 37. Need AG, Horowitz M, et al. Vitamin D status: effects on parathyroid hormone and 1,25-dihydroxyvitamin D in postmenopausal women // *Am J Clin Nutr* 2000;71: 1577–1581.
 38. Need AG, O’Loughlin PD, et al. Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency // *J Bone Miner Res* 2008; 23: 1859–1863.
 39. Lips P. Review — relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)2D measurements // *J Bone Miner Res* 2007; 22: 1668–1671.
 40. Kallas M, Green F, et al. Rare causes of calcitriol-mediated hypercalcemia: a case report and literature review // *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 3111–3117.
 41. Hawkes CP, Schnellbacher S, et al. 25-Hydroxyvitamin D can interfere with a common assay for 1,25-dihydroxyvitamin D in vitamin D intoxication // *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 2883–2889.
 42. Cooke NE and David EV. Serum vitamin D binding protein is a 3rd member of the albumin and alpha-fetoprotein gene family // *J Clin Invest* 1985; 76: 2420–2424.
 43. Svasti J, Kurosky A, et al. Molecular basis for the 3 major forms of human serum vitamin D binding protein (group-specific component) // *Biochemistry* 1979; 18: 1611–1617.
 44. Speckaert M, Huang G, et al. Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc globulin) and its polymorphisms // *Clin Chim Acta* 2006; 372:33–42.
 45. Powe CE, Evans MK, et al. Vitamin D binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans // *N Eng J Med* 2013; 369: 1991–2000.
 46. Henderson CM, Lutsey PL, et al. Measurement by a novel LC-MS/MS methodology reveals similar serum concentrations of vitamin D-binding protein in blacks and whites // *Clin Chem* 2016; 62: 179–187.
 47. Denburg MR, Hoofnagle AN, et al. Comparison of two ELISA methods and mass spectrometry for measurement of vitamin D binding protein: implications for the assessment of bioavailable vitamin D concentrations across genotypes // *J Bone Miner Res* 2016; 31: 1128–1136.
 48. Nielson CM, Jones KS, et al. Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial-genotype associations // *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:2226–2234.
 49. Sahota O, Munday MK, et al. The relationship between vitamin D and parathyroid hormone: calcium homeostasis, bone turnover, and bone mineral density in postmenopausal women with established osteoporosis // *Bone* 2004; 35: 312–319.
 50. Garrett G, Sardial S, et al. PTH — a particularly tricky hormone: why measure it at all in kidney patients? // *Clin J Am Soc Nephrol* 2013; 8: 299–312.
 51. Couchman L, Taylor DR, et al. LC-MS candidate reference methods for the harmonisation of parathyroid hormone (PTH) measurement: a review of recent developments and future considerations // *Clin Chem Lab Med* 2014; 52: 1251–1263.
 52. Sturgeon CM, Sprague SM and Metcalfe W. Variation in parathyroid hormone immunoassay results — a critical governance issue in the management of chronic kidney disease // *Nephrol Dial Transplantat* 2011; 26: 3440–3445.