

Proposta per la refertazione della determinazione della vitamina D

Documento di consenso intersocietario di Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica-SIBioC, European Ligand Assay-ELAS-Italia, Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro-SIOMMMS, Società Italiana di Endocrinologia -SIE, Gruppo Italiano Bone Interdisciplinary Specialist-GIBIS, Associazione Medici Endocrinologi-AME, Società Italiana di Reumatologia-SIR, Società Italiana di Medicina Interna-SIMI, Società Italiana di Ortopedia, Medicina e delle Malattie Rare dello Scheletro-ORTOMED.

Francesco Bertoldo¹, Luisella Cianferotti², Annamaria Colao³, Ruggero Dittadi⁴, Sandro Giannini⁵, Salvatore Minisola⁶, Maurizio Rossini⁷, Fabio Vescini⁸, Giovanni Lombardi^{9,10}

¹Medicina d'Urgenza, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona, Italia

²Unità di Malattie del Metabolismo Minerale ed Osseo, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche 'Mario Serio', Università degli Studi di Firenze, Italia

³Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Unità di Endocrinologia, Scuola di Medicina, Università Federico II di Napoli, Italia

⁴UOC Medicina di Laboratorio, Ospedale dell'Angelo, ULSS3 Serenissima, Mestre, Italia

⁵Unità di Clinica Medica 1, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Padova, Italia

⁶UOC Medicina Interna A, Malattie Metaboliche dell'Osso Ambulatorio Osteoporosi e Osteopatie Fragilizzanti, Università La Sapienza, Roma, Italia

⁷Unità di Reumatologia, Dipartimento di Medicina, Università degli Studi di Verona, Policlinico GB Rossi, Verona, Italia

⁸Unità di Endocrinologia e Metabolismo, Azienda Sanitaria Universitaria del Friuli Centrale Ospedale Santa Maria della Misericordia, Udine, Italia

⁹Laboratorio di Biochimica Sperimentale e Biologia Molecolare, IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano, Italia

¹⁰Department of Athletics, Strength and Conditioning, Poznań University of Physical Education, Poznań, Polonia

¹Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS)

²Società Italiana di Ortopedia, Medicina e Malattie Rare dello Scheletro (ORTOMED)

³Società Italiana di Endocrinologia (SIE)

⁴European Ligand Assay (ELAS-Italia)

⁵Gruppo Italiano Bone Interdisciplinary Specialist (GIBIS)

⁶Società Italiana Medicina Interna (SIMI)

⁷Società Italiana di Reumatologia (SIR)

⁸Associazione Medici Endocrinologi (AME)

⁹Società Italiana di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica (SIBioC)

ABSTRACT

Apart from the still-discussed extra-skeletal effects, vitamin D plays a key role in calcium and phosphate homeostasis and its deficiency is associated with bone disorders such as rickets, osteomalacia and the increased risk of osteoporotic fractures. 25-hydroxy vitamin D (25-(OH)D) is the circulating metabolite commonly used as a marker of vitamin D status. The aim of this document is to express, on the basis of the available guidelines, an Intersociety consensus on how to report the values of the main marker of vitamin D status: 25-hydroxy vitamin D (25-(OH)D). The main points of this proposal are: to use nmol/L as the measurement units, to measure the analyte at the end of winter/beginning of summer, and to consider an analytical variability of $\pm 10\%$. In addition, the decision levels to be reported in the report are agreed upon.

INTRODUZIONE

I vitameri del gruppo D (genericamente definiti vitamina D), rappresentati da colecalciferolo, calcifediolo, 1,25-diidrossi vitamina D₂ e D₃ (calcitriolo) e dalla forma 24,25-diidrossilata di colecalciferolo ed ergocalciferolo, rivestono un ruolo fondamentale nell'omeostasi di calcio e fosfati, rivelandosi di conseguenza fondamentali per il corretto metabolismo di tutti i tessuti dell'organismo. Classicamente alla vitamina D viene attribuita una funzione essenziale nei processi di mineralizzazione ossea, testimoniata dall'associazione causale tra stati carenziali e condizioni quali rachitismo, osteomalacia e aumento del rischio di fratture osteoporotiche nella popolazione adulta (1). Non possono inoltre essere né confermate né escluse, sulla base delle evidenze discordanti disponibili, possibili azioni positive extra scheletriche della vitamina D a carico, ad esempio, dei sistemi muscolare, immunitario e cardiovascolare e nella mortalità per cancro (2,3).

Il problema della carenza di vitamina D è di notevole rilevanza all'interno della popolazione italiana, in considerazione delle già citate implicazioni patologiche e dell'elevata prevalenza di questa condizione: è stato infatti evidenziato in più studi come almeno metà della popolazione italiana possa presentare valori ematici di 25-(OH)D inferiori a 50 nmol/L (4). Alla luce di questa crescente consapevolezza, negli ultimi anni si è assistito ad un aumento, spesso ingiustificato, non solo della prescrizione di supplementazioni vitaminiche ma anche delle misurazioni dei livelli sierici di 25-(OH)D totale (comprendente le forme 25-idrossilate di vitamina D₂ e D₃). Quest'ultima è attualmente considerata il biomarcatore più affidabile per la valutazione dello status vitaminico D, nonostante un'importante variabilità legata alle differenti metodiche disponibili (con bias fra metodi che possono superare il 20%) e all'intrinseca imprecisione in sé della misura, di cui spesso non si tiene conto nell'interpretazione del referto.

Al fine di rendere più appropriata sulla base delle evidenze disponibili, la prescrizione delle misurazioni di 25-(OH)D e delle supplementazioni con colecalciferolo e calcifediolo, la Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS) ha pubblicato nel 2022 le raccomandazioni sulla gestione della carenza di vitamina D. Per la popolazione generale sana, si considerano carenziali valori di 25-(OH)D <25 nmol/L, insufficienti valori tra 25-50 nmol/L e ottimali valori tra 50 e 125 nmol/L. Si distingue poi una categoria di pazienti a rischio di ipovitaminosi D (l'elenco è presente nella Tabella 1) o che necessita di terapia per l'osteoporosi, in cui si definiscono carenziali valori di 25-(OH)D <25 nmol/L, insufficienti valori compresi tra 25 e 75 nmol/L e ottimali valori tra 75 e 125 nmol/L. In questa seconda categoria di pazienti non si raccomanda la determinazione basale dei valori di 25-(OH)D, ma si richiede che vengano supplementati a prescindere dal livello di partenza, in considerazione dell'elevato rischio di ipovitaminosi o per garantire l'efficacia della terapia anti-fratturativa e diminuirne le complicanze come l'ipocalcemia (5).

Alle Linee guida SIOMMMS ha fatto seguito, a febbraio 2023, l'aggiornamento da parte dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) della Nota 96, relativa alla rimborsabilità con il SSN dei supplementi a base di vitamina D e introdotta per la prima volta nel 2019 con il dichiarato fine di migliorare l'appropriatezza prescrittiva e ottimizzare la spesa sanitaria pubblica in quest'ambito. Sulla Nota 96 società scientifiche come SIBioC, SIOMMMS, ELAS Italia e AME si erano espresse con un documento inter-societario nel 2020 sottolineando criticità riscontrate nella pratica clinica relative alle indicazioni alla determinazione della 25-(OH)D e ai valori soglia da considerare per la rimborsabilità della supplementazione vitaminica (6). Nella nuova versione della Nota 96 si è mantenuta la distinzione tra pazienti per i quali è garantita la rimborsabilità della supplementazione con vitamina D indipendentemente dalla determinazione dei livelli di 25-(OH)D (persone istituzionalizzate, con gravi deficit motori o allettate al domicilio, donne in gravidanza o allattamento, persone affette da osteoporosi da qualsiasi causa non candidate a terapia remineralizzante) e soggetti che hanno diritto alla rimborsabilità solo in relazione ai livelli ematici di 25-(OH)D. In quest'ultima categoria si individuano diversi valori soglia di intervento terapeutico:

- <30 nmol/L per persone sintomatiche o asintomatiche per carenza di vitamina D;
- <50 nmol/L in pazienti in terapia di lunga durata con farmaci interferenti con il metabolismo della vitamina D o persone adulte affette da malassorbimento;
- <75 nmol/L per pazienti con diagnosi di iperparatiroidismo primitivo o secondario e in pazienti affetti da osteoporosi da qualsiasi causa o altre osteopatie candidate a terapia remineralizzante. Viene suggerito 112 nmol/L quale valore soglia da non superare per il rischio di tossicità da vitamina D (7).

A parte il mantenere importanti divergenze con quanto raccomandato nelle linee guida SIOMMMS 2022, la Nota 96 condiziona, in molte circostanze, la rimborsabilità della supplementazione vitaminica alla misura dei livelli di 25-(OH)D, spingendo ad aumentare il già elevato numero di determinazioni oggi effettuate ed a considerare livelli decisionali discutibili alla luce appunto delle evidenze scientifiche disponibili che hanno portato alle recenti raccomandazioni SIOMMMS in merito.

CONSIDERAZIONI TECNICHE INERENTI LE METODICHE DI MISURA DELLA 25-(OH) VITAMINA D

Sia le Linee Guida SIOMMMS 2022 che la Nota AIFA 96 indicano quale biomarcatore per la valutazione dello stato vitaminico D i livelli ematici di 25-(OH) vitamina D totale, comprendente le forme 25-idrossilate di colecalciferolo (D₃) ed ergocalciferolo (D₂). Per la determinazione sono disponibili metodi immunometrici, prevalentemente automatizzati e maggiormente diffusi nei laboratori, e metodi in spettrometria di massa (LC-MS). Entrambi sono gravati da una significativa variabilità analitica che dovrebbe essere considerata in fase di interpretazione del referto. La variabilità analitica si riferisce sia alle

variabilità, intra ed inter-saggio, proprie di uno specifico metodo, ma soprattutto fra metodi diversi. Quest'ultimo punto è di assoluta rilevanza per la comparabilità inter-metodo ed inter-laboratorio dei risultati. Va inoltre tenuta presente l'esistenza di una fisiologica variazione delle concentrazioni di vitamina D nel tempo, legata anche alla stagionalità. Tale variabilità può, nell'arco di alcuni mesi, superare il 30% (8). Per limitare la variabilità intra-individuale, si ribadisce la raccomandazione, contenuta anche nelle linee guida SIOMMMS 2022, di effettuare la determinazione nel periodo di fine inverno-inizio estate (5,9).

Nei saggi immunometrici il coefficiente di variazione si attesta attorno al 4-7%. Il pretrattamento del campione, necessario per separare la vitamina D dalla principale proteina di legame (Vitamin D Binding Protein, VDBP), è uno dei fattori limitanti la precisione e l'accuratezza di questi saggi, in considerazione sia delle diverse modalità di estrazione tra metodi, che dei livelli variabili di VDBP (ad esempio in gravidanza). I saggi immunometrici possono inoltre avere difficoltà a distinguere in modo equimolare tra vitamina D₂ e D₃ o la forma 24,25-idrossilata della vitamina D (10,11).

Per i saggi in spettrometria di massa il coefficiente di variazione è di almeno 3-4%. Tra i principali fattori che limitano la precisione e l'accuratezza di queste metodiche vi è l'esistenza di stereoisomeri della 25-(OH) vitamina D, tra cui il principale è l'epimero in C3, 3-epi-25-(OH)D, presente soprattutto in età pediatrica e dotato di scarsa attività biologica. Va inoltre considerato che il gel separatore presente all'interno delle provette di prelievo può ostacolare il processo di ionizzazione delle molecole, fondamentale per questa tipologia di saggi (11,12).

Allo scopo di valutare il grado di armonizzazione dei diversi metodi disponibili e di certificare quelli dotati di determinati livelli di accuratezza e precisione, il Center for Disease Control and Prevention (CDC) ha istituito il Vitamin D Standardization Program. Dai dati relativi al 2022, si evidenzia come, pur avendo assistito a un progressivo miglioramento nel corso degli anni, dal 30 al 60% delle misure raccolte presentino ancora bias superiori a quelli previsti dal programma, con valori mediamente compresi tra il 15 e il 20% e una migliore prestazione analitica da parte dei saggi di spettrometria di massa. Le imprecisioni, espresse come coefficiente di variazione, oscillano invece tra il 4 e il 10%, senza differenze significative tra i diversi metodi.

Al netto dei miglioramenti, esistono ancora differenze significative tra le due tipologie di saggi disponibili per la determinazione della 25-(OH)D. La spettrometria di massa ha prestazioni superiori dal punto di vista della esattezza della misura, mentre in quanto ad imprecisione non sembra migliore degli altri metodi. Alla semplicità d'uso, velocità e grande capacità di lavoro dei saggi immunometrici automatizzati si contrappone una migliore esattezza di misura dei metodi in LC-MS/MS, perlomeno quando non applicata su larga scala. Per le misure di routine si può quindi optare per l'immunometria, mentre per specifiche necessità diagnostiche (ad esempio rachitismo, osteomalacia, sospetta tossicità) sarebbe preferibile optare per la spettrometria di massa.

All'inesattezza del rilevamento va ad aggiungersi, quale ulteriore criticità relativa alla refertazione della 25-(OH)D, l'esistenza di due distinte unità di misura: nmol/L, prevista dal Sistema Internazionale, e ng/mL, storicamente diffusa nel nostro Paese. Le due unità di misura sono spesso coesistenti all'interno del referto, esponendo al rischio di errore nell'interpretazione del dato. L'espressione della misura in nmol/L appare comunque preferibile, sia per concordanza con quanto espresso a livello internazionale, sia per una maggior precisione della misura con i metodi immunometrici, che possono misurare in modo non equimolare le forme D₂ e D₃, aventi pesi molecolari differenti. Va comunque ricordata l'equazione per la conversione:

$$\text{nmol/L} = \text{ng/mL} \times 2,5$$

CONSIDERAZIONI RIGUARDO LE INDICAZIONI ALLA DETERMINAZIONE DELLA 25-(OH) VITAMINA D

Negli ultimi 15 anni si è osservato un aumento generalizzato in Italia, come nel resto del mondo, del numero di determinazioni della 25-(OH)D, con alla base prescrizioni spesso inappropriate, soprattutto legate a ripetizioni evitabili della misura, e svincolate da valutazioni dello stato di salute ossea (13). Dall'introduzione della Nota 96, volta a regolamentare la rimborsabilità e, di fatto, la prescrizione della supplementazione vitaminica ma contenente anche indicazioni riguardo l'appropriatezza della misura della vitamina D, non si hanno dati relativi all'andamento delle prescrizioni delle determinazioni per la 25-(OH)D in Italia.

La Nota AIFA 96 non raccomanda lo screening dei livelli di 25-(OH)D nella popolazione generale, fornendo però indicazioni sulla supplementazione in caso di riscontro occasionale di carenza di vitamina D in soggetti asintomatici.

Con l'aggiornamento del febbraio 2023, AIFA ha incluso i soggetti con gravi deficit motori e allettati al domicilio nella categoria di pazienti a rischio di ipovitaminosi e, pertanto, con indicazione alla supplementazione a prescindere dai livelli ematici di vitamina D; i restanti soggetti appartenenti a questa categoria sono le persone istituzionalizzate, le donne in gravidanza o allattamento, i pazienti affetti da osteoporosi da qualsiasi causa non candidati a terapia remineralizzante. La rimborsabilità della supplementazione vitaminica viene invece subordinata al riscontro di valori di 25-(OH)D inferiori ad una determinata soglia negli individui in terapia con farmaci interferenti con il metabolismo della vitamina D o affetti da malassorbimento [25-(OH)D <50 nmol/L], nei soggetti con diagnosi di iperparatiroidismo primitivo o secondario e nei pazienti affetti da osteoporosi da qualsiasi causa o altre osteopatie candidati a terapia remineralizzante [25-(OH)D <75 nmol/L].

Le linee guida SIOMMMS 2022 concordano con la Nota 96 nel non raccomandare lo screening dei livelli di 25-(OH)D nella popolazione generale, in considerazione della mancanza di evidenze di un rapporto costo/beneficio favorevole (14,15).

A differenza della Nota 96, nelle linee guida SIOMMMS sono considerati soggetti a rischio di ipovitaminosi D anche soggetti obesi, anziani, persone con condizioni associate a ridotta esposizione solare, individui in dieta vegana, pazienti affetti da anoressia nervosa, insufficienza renale cronica, diabete mellito tipo 2, cancro, fibrosi cistica. In questa categoria di soggetti (Tabella 1) la misura basale dei livelli di 25-(OH)D non viene raccomandata poiché la supplementazione con vitamina D è ritenuta mandatoria.

Le linee guida suggeriscono piuttosto di misurare i livelli ematici di vitamina D quando indispensabile per la gestione clinica del paziente, ad esempio per la diagnosi differenziale o dopo aver iniziato la supplementazione per accertare il raggiungimento di valori ematici ottimali a distanza di 3-6 mesi. Le raccomandazioni espresse dalle linee guida SIOMMMS derivano da revisioni sistematiche in cui si evidenzia come la determinazione dei livelli basali di 25-(OH)D nei soggetti a rischio di ipovitaminosi non ha determinato alcun vantaggio né si è dimostrato utile per la scelta della dose da supplementare o per ridurre il rischio di tossicità da vitamina D, mostrando quindi un rapporto costo/beneficio incerto (16-18). Studi recenti hanno inoltre dimostrato la capacità di alcuni algoritmi basati su dati clinico-anamnestici di predire con buona sensibilità (78%) la presenza di severa ipovitaminosi D [25-(OH)D <25nmol/L], fornendo ulteriori evidenze a sostegno dell'inappropriatezza della misura basale dei livelli di 25-(OH)D nei soggetti con fattori di rischio per ipovitaminosi (19).

La determinazione basale dei livelli di 25-(OH)D è invece raccomandata dalle linee guida SIOMMMS nei pazienti con sospetto clinico di osteomalacia, ai fini della conferma diagnostica e della diagnosi differenziale, ed è raccomandata anche una successiva ripetizione ad almeno 3-6 mesi dall'avvio della supplementazione per valutare la correzione del deficit vitaminico, interrompendo il monitoraggio ematochimico una volta raggiunti livelli di 25-(OH)D >75 nmol/L. La valutazione, basale e con controlli periodici successivi, dei livelli ematici di vitamina D è anche indicata nei pazienti con diagnosi o sospetto di iperparatiroidismo primitivo, sia ai fini della diagnosi differenziale che per valutare l'opportunità e l'adeguatezza della supplementazione vitaminica (20).

Tabella 1

Popolazioni/condizioni a rischio di ipovitaminosi D (linee guida SIOMMMS 2022)

- Anziani (età ≥75 anni)
- Soggetti istituzionalizzati o condizioni associate ad un'esposizione solare inadeguata
- Obesità
- Gravidanza e allattamento
- Malattie metaboliche delle ossa e altri disturbi dello scheletro
- Dieta vegana
- Anoressia nervosa
- Insufficienza renale cronica
- Cancro (in particolare mammella, prostata, colon)
- Diabete mellito di tipo 2
- Malassorbimento intestinale e chirurgia bariatrica
- Farmaci che interferiscono con l'assorbimento p il metabolismo epatico della vitamina D (antiepilettici, glucocorticoidi, farmaci antiretrovirali per AIDS, agenti antimicotici, colestiramina)
- Fibrosi cistica

Nei soggetti che devono iniziare terapie con farmaci per la prevenzione primaria o secondaria delle fratture osteoporotiche e nei pazienti con altre malattie del metabolismo minerale e scheletrico, le linee guida SIOMMMS 2022 non raccomandano la valutazione basale dei livelli di 25-(OH)D, essendo anche in questo caso la supplementazione con vitamina D mandatoria. Per qualsiasi farmaco utilizzato per la terapia anti-fratturativa, l'efficacia all'interno dei trials clinici è stata valutata prevedendone l'associazione con la supplementazione di vitamina D; nella pratica clinica, per garantire ai pazienti un'efficacia terapeutica almeno analoga a quella ottenuta nei trial clinici, è quindi indispensabile affiancare alla terapia anti-fratturativa un'adeguata supplementazione vitaminica, a prescindere dai valori di 25-(OH)D basali (21,22). Anche in questo caso, coerentemente con quanto suggerito nei pazienti con condizioni a rischio di ipovitaminosi D, le linee guida suggeriscono piuttosto una determinazione successiva all'avvio della supplementazione per verificare il raggiungimento di livelli ottimali di 25-(OH)D.

Come già espresso nel documento congiunto SIBioC-SIOMMMS-ELAS-AME pubblicato nel 2020 (6), bisogna considerare come l'aspecificità e l'elevata prevalenza nella popolazione adulta dei sintomi attribuibili a ipovitaminosi D riportati nella Nota 96 potrebbero comportare, in linea con le indicazioni fornite da AIFA, uno sproporzionato e inappropriato aumento delle misurazioni della 25-(OH)D nella popolazione generale.

Appare inoltre evidente come la Nota AIFA 96, oltre a non includere ancora numerose categorie di pazienti a rischio di ipovitaminosi D, suggerisca la valutazione dei livelli di 25-(OH)D in soggetti o in circostanze (ad esempio livelli basali nei pazienti a rischio di ipovitaminosi D) in cui questa risulta quantomeno di dubbia utilità clinica, trattandosi di pazienti che dovrebbero avere indicazione alla supplementazione vitaminica a prescindere dai valori ematici di vitamina D. Paradigmatico in questo senso è il caso dei pazienti candidati a terapia antifratturativa, in cui la Nota 96, vincolando la supplementazione vitaminica alla presenza di livelli di 25-(OH)D <75 nmol/L, si pone in contrasto con i contenuti della Nota AIFA 79, in cui si specifica che prima di avviare qualsiasi terapia anti-fratturativa è raccomandato un adeguato apporto di

calcio e vitamina D, ricorrendo alle supplementazioni ove dieta ed esposizione solare fossero inadeguati, senza menzione di determinazione ematica (23). Le indicazioni sulla misura della 25-(OH)D contenute nella Nota AIFA 96 si traducono quindi da un lato nel rischio di un incremento di prescrizioni inappropriate di determinazioni della 25-(OH)D sia per la valutazione iniziale che per il monitoraggio, con conseguente aumento della spesa sanitaria pubblica, dall'altro nella riduzione dell'opportuna e raccomandata prescrizione della supplementazione vitaminica in soggetti in cui essa andrebbe invece garantita, esponendo i pazienti al rischio di inappropriate sospensioni del farmaco (24).

CONSIDERAZIONI IN MERITO AGLI INTERVALLI DI RIFERIMENTO DELLA 25-(OH) VITAMINA D

L'aggiornamento di febbraio 2023 della Nota AIFA 96 ha portato ad un cambiamento dei livelli decisionali per la rimborsabilità della supplementazione con vitamina D rispetto alla prima versione del 2019, suddividendoli in 3 livelli (<30 nmol/L, <50 nmol/L e <75 nmol/L, come descritto sopra) (7).

Andando ad analizzare i contenuti delle linee guida sulla carenza di vitamina D delle principali società scientifiche internazionali, si evidenzia un generale consenso nel ritenere valori di 25-(OH)D <30 nmol/L indicativi di osteomalacia e quindi della necessità di una supplementazione vitaminica. Un discreto consenso è anche rilevabile nel ritenere ottimali valori di 25-(OH)D >75 nmol/L, mentre vi sono divergenze sull'interpretazione e gestione dei pazienti con livelli di 25-(OH)D compresi tra 30 e 75 nmol/L, all'interno dei quali in Italia è compresa una frazione importante della popolazione adulta (35%) e anziana (36%) (4,25).

Le evidenze a sostegno della definizione di livelli ematici di vitamina D al di sotto dei quali avviare la supplementazione vitaminica derivano principalmente da studi che hanno correlato i valori di 25-(OH)D a diversi esiti legati alla presenza di fragilità scheletrica o di iperparatiroidismo secondario.

In uno studio trasversale *post-mortem* coinvolgente 675 soggetti in cui erano state escluse cause di osteoporosi secondaria, si è evidenziato come solo per valori di 25-(OH)D >75 nmol/L non vi sia alcun paziente con aspetti istologici compatibili con osteomalacia alla biopsia ossea della cresta iliaca. Viene tuttavia segnalato come già per valori di 25-(OH)D >50 nmol/L solamente il 3% dei pazienti presenti caratteristiche istologiche di osteomalacia (26).

Alcuni lavori hanno invece cercato di valutare l'andamento dei valori di PTH circolante in relazione ai livelli di 25-(OH)D, rilevando la comparsa di iperparatiroidismo secondario per valori di 25-(OH)D <75-87 nmol/L suggerendo tale livello come limite di normalità (27,28). Come dimostrato dagli studi di Adami e Valcour, la curva dei livelli di PTH in relazione alla 25-(OH)D è tuttavia dipendente dall'apporto di calcio e dall'età del paziente, che influenza l'efficienza dei processi di assorbimento intestinale e la funzione renale, per cui diventa difficile stabilire un valore soglia universale

di 25-(OH)D in base all'elevazione del PTH (28,29).

Da un punto di vista decisionale si ritiene più attendibile valutare l'associazione tra livelli di vitamina D ed esiti scheletrici come ad esempio l'aumento del rischio di fratture.

Studi prospettici hanno riscontrato un aumento significativo del rischio di fratture per valori di 25-(OH)D <50 nmol/L nelle pazienti in menopausa e anziane (30,31). Coerentemente con questi risultati, una meta-analisi del 2017 comprendente solo studi prospettici ha dimostrato un incremento del rischio di frattura di femore per valori di 25-(OH)D <60 nmol/L (32). Sempre per valori di 25-(OH)D <50-62 nmol/L sono stati riscontrati anche un aumento nel rischio di caduta e un peggioramento in alcuni parametri di funzionalità degli arti inferiori (33,34). Controintuitivamente, numerosi studi non hanno osservato un miglioramento degli esiti di fragilità scheletrica con l'aumentare dei livelli di 25-(OH)D al di sopra dei 50-62 nmol/L (35-37).

Vi sono poi categorie di pazienti in cui la supplementazione con vitamina D ha evidenziato effetti benefici a prescindere dai valori basali di 25-(OH)D. In una recente revisione delle metanalisi si è evidenziato come la supplementazione di calcio e vitamina D nei pazienti istituzionalizzati sia in grado di ridurre il rischio globale di fratture e il rischio per fratture di femore, fornendo un razionale per la supplementazione a prescindere dai valori basali e quindi dalla determinazione laboratoristica della 25-(OH)D in questa categoria di soggetti (38).

Nei pazienti affetti da osteoporosi da qualsiasi causa in terapia anti-fratturativa la supplementazione con vitamina D è necessaria poiché tutti gli studi clinici registrativi (RCT) hanno previsto l'associazione con supplementazione vitaminica. Nella maggioranza di questi RCT la valutazione di laboratorio basale della 25-(OH)D non veniva fatta (22). Inoltre, per coloro che sono in trattamento con farmaci per la riduzione del rischio di frattura, alcuni lavori hanno riscontrato come valori di 25-(OH)D, <75 nmol/L, possano rappresentare un importante determinante dell'insuccesso della terapia stessa con comparsa di fratture (21,39). La mancata supplementazione con vitamina D e calcio nei pazienti con fratture da fragilità in terapia remineralizzante è stata associata non solo con un aumentato rischio di rifrattura ma anche ad un incremento della mortalità per tutte le cause (40).

CONSIDERAZIONI IN MERITO AI LIVELLI DI SICUREZZA PER LA 25-(OH)D

Nella Nota AIFA 96 si fa riferimento a due studi secondo i quali esisterebbe un andamento "a U" nella curva che mette in rapporto i livelli di 25-(OH)D e l'incidenza di eventi avversi (compresa la mortalità), con valori di 25-(OH)D >112 nmol/L associati a un aumentato rischio di tali eventi (41). Studi più recenti hanno invece documentato una progressiva riduzione della mortalità al crescere dei livelli di 25-(OH)D fino a circa 50 nmol/L, con un successivo appiattimento della curva fino a valori ematici di 125 nmol/L, senza individuare all'interno di questo intervallo un valore soglia associato

ad un progressivo incremento del rischio di morte, anche valutando la mortalità per diverse cause (42-44). La gran parte degli studi di valutazione degli effetti avversi della vitamina D è stata fatta ponendo in relazione tali risultati con la dose di supplementazione anziché con i livelli di 25-(OH)D, per cui risulta difficile stabilire in maniera univoca un limite di sicurezza per la 25-(OH)D. In un recente studio prospettico per valutare gli effetti di diversi regimi per la supplementazione di vitamina D, non è stato riscontrato alcun aumento nel rischio di cadute, eventi avversi, ipercalcemia o alterazioni dei parametri di turn-over osseo per valori ematici di vitamina D fino a 150 nmol/L (45). In uno studio longitudinale per valutare gli effetti di diverse dosi di vitamina D in pazienti ospedalizzati, sono stati segnalati nella maggior parte della popolazione in studio livelli di 25-(OH)D compresi tra 100 e 200 nmol/L senza rilevare alterazioni della calcemia (46).

La Nota AIFA 96 segnala inoltre una presunta associazione tra elevati livelli di vitamina D (>100 nmol/L) e aumentato rischio di carcinoma prostatico e pancreatico (7). I dati del recente studio VITAL mostrano invece una riduzione del rischio di incidenza di neoplasia metastatica o di mortalità per neoplasia di qualsiasi origine per valori di 25-(OH)D >100 nmol/L (47). Altri studi hanno inoltre segnalato come alcuni esiti extra-scheletrici favorevoli (tra cui riduzione del rischio cardiovascolare, riduzione della mortalità per tutte le cause, riduzione del rischio di patologie auto-immuni) siano associati a livelli di 25-(OH)D >100 nmol/L, anche se le evidenze in questo ambito non sono definitive (2). Si ritiene pertanto, in base alle evidenze, che i livelli "accettabili" e anzi in alcune condizioni "auspicabili", siano decisamente superiori a quelli suggeriti dalla attuale versione della Nota 96, e si possa considerare clinicamente sicuro, oltre che utile, un valore di 25-(OH)D fino a circa 125 nmol/L, oltre il quale non vi sono sicure evidenze di un vantaggio clinico.

È comunque importante ricordare che la tossicità della vitamina D è associata ai livelli di $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ di cui la concentrazione misurata di 25-(OH)D è un indice. Pertanto, allo stato attuale delle conoscenze, il limite superiore del range di riferimento non è indicazione di un rischio diretto di tossicità ma, piuttosto, un livello di ragionevole sicurezza che se superato, in talune situazioni, può associarsi ad un potenziale rischio di tossicità.

DEFINIZIONE DELLO STATO VITAMINICO D IN BASE ALLE LINEE GUIDA SIOMMMS 2022

Alla luce delle evidenze sopra esposte, le linee guida SIOMMMS 2022 vanno a definire lo stato vitaminico in relazione ai livelli di 25-(OH)D distinguendo due categorie di pazienti (19):

- nella popolazione generale sana si considerano carenti livelli di 25-(OH)D <30 nmol/L, insufficienti valori <50 nmol/L, mentre viene definita come ottimale la fascia compresa tra 50 e 125 nmol/L;
- nella popolazione a rischio di ipovitaminosi D (Tabella 1) o che necessita di terapia per osteoporosi si considerano carenti livelli di 25-(OH)D <30 nmol/L,

insufficienti valori <75 nmol/L, mentre è ritenuta ottimale la fascia compresa tra 75 e 125 nmol/L;

- vengono, cautelativamente, ritenuti sicuri valori di 25-(OH)D fino a 125 nmol/L.

Sebbene sia evidente e apprezzabile l'avvicinamento di AIFA che le rende per alcuni aspetti più in linea con le linee guida SIOMMMS 2022, le divergenze che permangono riguardo le soglie di supplementazione e i valori di tossicità determinano nella pratica clinica problemi di inappropriata sospensione della supplementazione vitaminica, in considerazione anche dell'attuale modalità di refertazione dei livelli di 25-(OH)D, che nella maggior parte dei laboratori prevede l'indicazione di valori ≥ 50 nmol/L quali "normali" senza distinzione tra categorie di pazienti. Questo si verifica soprattutto per i pazienti in terapia remineralizzante secondo Nota 79, in cui spesso si assiste alla erronea sospensione della supplementazione con vitamina D in presenza di valori ottimali di 25-(OH)D, che è necessario garantire per almeno tutta la durata del trattamento anti-fratturativo. Va inoltre segnalato come AIFA attribuisca ad alcune categorie di pazienti evidentemente a rischio di ipovitaminosi, quali coloro in trattamento con farmaci interferenti con il metabolismo della vitamina D e pazienti affetti da malassorbimento, livelli ottimali di 25-(OH)D inferiori rispetto a quanto raccomandato dalle linee guida. Come già segnalato nel 2022, il calo osservato da AIFA nei consumi di supplementazioni con vitamina D dopo l'introduzione della Nota 96 potrebbe non coincidere con un miglioramento dell'appropriatezza prescrittiva ma con un suo peggioramento, e i contenuti dell'aggiornamento di febbraio 2023 non appaiono in grado di invertire questa tendenza (24).

PROPOSTE RELATIVE ALLA REFERTAZIONE DI LABORATORIO

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, il board ha discusso la possibilità di adattare la refertazione del laboratorio in merito ai livelli di 25-(OH)D, già definite nel documento congiunto del 2020 (6), anche al fine di armonizzarlo con quanto espresso nelle recenti linee guida SIOMMMS 2022 (19). Si è cercato inoltre di suggerire una refertazione che fosse allo stesso tempo di facile interpretazione da parte del clinico e del paziente.

- Un primo elemento di *consensus* è quello di unificare le unità di misura con cui viene espresso il livello di vitamina D circolante. Spesso l'espressione in ng/mL e/o nmol/L (talvolta presenti entrambi nello stesso referto) espone ad una erronea interpretazione del dato. Il board concordemente suggerisce quale modalità di refertazione ottimale l'espressione del valore di 25-(OH)D in "nmol/L", in quanto ritenuta l'unità di misura più corretta metrologicamente e in concordanza con quanto espresso a livello internazionale. Si ricorda che la conversione da ng/ml a nmol/L si ottiene moltiplicando il valore in ng/mL x 2,5;
- il board conferma che, in considerazione delle oscillazioni fisiologiche dei valori di vitamina D legati alla stagionalità, in un soggetto con uno stile di vita normale il momento migliore per la valutazione dello

stato vitaminico D è la fine dell'inverno/inizio dell'estate.

- il board sottolinea a questo riguardo come vi sia una discreta variabilità intra e inter-metodo legato alle metodiche utilizzate, soprattutto per le determinazioni effettuate in laboratori utilizzando sistemi differenti. Da un punto di vista pratico si suggerisce di considerare una variazione analitica di almeno il 10% nell'interpretazione delle determinazioni di 25-(OH)D, con la raccomandazione però di utilizzare lo stesso metodo nei successivi eventuali controlli;
- per quanto riguarda la modalità di refertazione, si conferma l'indicazione di esprimere nel referto non un intervallo di normalità, al di sopra del quale è possibile si verifichino inappropriate sospensioni terapeutiche, ma valori decisionali. A modifica delle indicazioni del Documento inter-societario 2020, i livelli decisionali concordati sono i seguenti:
 - viene proposto un valore di 25-(OH)D ≤ 30 nmol/L (12 ng/mL) come indicativo di "carenza", per permettere di identificare una classe di soggetti con alta probabilità di essere affetti da osteomalacia in caso di valori protratti nel tempo. Questo valore è universalmente definito come corrispondente ad una grave carenza di vitamina D e dotato di un elevato valore predittivo per la diagnosi di osteomalacia;
 - per la popolazione generale, ovvero non affetta dalle condizioni presenti nella Tabella 1, viene definito un intervallo di valori di 25-(OH)D tra 30 e 50 nmol/L (12-20 ng/mL) per identificare quei soggetti che andrebbero supplementati, in quanto valori in questo intervallo sono associati a un aumentato rischio di fratture, di incidenza di patologie infettive, neoplasie e mortalità cardiovascolare. Questi soggetti andrebbero supplementati fino ad un livello di almeno 50 nmol/L (20 ng/mL);
 - viene definita per la popolazione generale una condizione di adeguatezza per valori di 25-(OH)D ≥ 50 nmol/L (20 ng/mL), che non dà quindi indicazione ad una supplementazione;
 - per i soggetti affetti da osteoporosi o che sono in condizioni che tipicamente si associano ad ipovitaminosi D con possibile alterazione della mineralizzazione (Tabella 1) viene definito come ottimale un intervallo di valori di 25-(OH)D compreso tra 75 e 125 nmol/L (30-50 ng/mL), in quanto all'interno di questo intervallo ci si attende il massimo livello di efficacia delle terapia per la riduzione del rischio di fratture da fragilità o alterazioni del metabolismo minerale;
 - il limite di 125 nmol/L (50 ng/ml) viene segnalato non come valore di sicurezza o tossicità ma in quanto gran parte degli effetti benefici scheletrici e forse extra scheletrici non sembrano migliorare ulteriormente in maniera significativa oltre a questo valore. Viene considerato invece in eccesso e quindi non fisiologico un valore di 25-(OH)D >250 nmol/L (100 ng/mL) (1,48,49).

In conclusione, si suggerisce di predisporre il referto sui livelli decisionali di vitamina D come segue:

Valore di 25-(OH)D (nmol/L)	Livelli decisionali da riportare nel referto
<30	Carenza
30-50	Insufficienza
>50	Adeguatezza (è opportuno non superare 250 nmol/L)
75-125	Valore ottimale in pazienti affetti da osteoporosi o condizioni a rischio di ipovitaminosi D

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: An endocrine society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:1911-30.
2. Wimalawansa SJ. Associations of vitamin D with insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. J Steroid Biochem Mol Biol 2018;175:177-89.
3. Chandler PD, Chen WY, Ajala ON, Hazra A, Cook N, Bubes V, et al. Effect of vitamin D3 supplements on development of advanced cancer: a secondary analysis of the VITAL randomized clinical trial. JAMA Net Open 2020;3:e2025850.
4. Manios Y, Moschonis G, Lambrinou CP, Tsoutsouloupoulou K, Binou P, Karachaliou A, et al. A systematic review of vitamin D status in southern European countries, Eur J Nutr 2018;57:2001-36.
5. SIOMMMS. Sintesi delle nuove raccomandazioni 2022 della Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS) per la gestione della carenza di vitamina D. <https://www.siommmms.it/wp-content/uploads/2023/03/Sintesi-nuove-raccomandazioni-SIOMMMS-2022-carenza-vitamina-D.pdf> (last access: june 2024)
6. Dittadi R, Corbetta S, Banfi G, Bertoldo F, Migliaccio S, Gonnelli S, et al. Documento congiunto SIBIOC, SIOMMMS, ELAS, AME relativo alla nota AIFA 96 sulla prescrivibilità dei farmaci per la carenza di vitamina D, e raccomandazioni per la refertazione. Biochim Clin 2020;44:400-6.
7. Agenzia Italiana del Farmaco. Nota 96 per la prescrizione di farmaci a base di vitamina D. Allegato 1, 2023. <https://www.aifa.gov.it/Nota-96> (last access: june 2024)
8. Cavalier E, Fraser CG, Bhattoa HP, Heijboer AC, Makris K, Ulmer KZ, et al. Analytical performance specifications for 25-hydroxyvitamin d examinations. Nutrients 2021;13:431.
9. Cui A, Zhang T, Xiao P, Fan Z, Wang H, Zhuang Y. Global and regional prevalence of vitamin D deficiency in population-based studies from 2000 to 2022: a pooled analysis of 7.9 million participants. Front Nutr 2023;10:1070808.
10. Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. Clin Chem

- 2012;58:543-8.
11. Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets* 2011;12:19-28.
12. Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D 3 is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:163-8.
13. Caillet P, Goyer-Joos A, Viprey M, Schott AM. Increase of Vitamin D assays prescriptions and associated factors: a population-based cohort study. *Sci Rep* 2017;7:10361.
14. Minisola S, Colangelo L, Cipriani C, Pepe J, Cook DP, Mathieu C. Screening for hypovitaminosis D: Cost-effective or not? *Eur J Endocrinol* 2019;180:D1-D7.
15. Kahwati LC, LeBlanc E, Weber RP, Giger K, Clark R, Suvada K, et al. Screening for Vitamin D deficiency in adults: updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force. *JAMA* 2021;325:1443-63.
16. Medical Advisory Secretariat. Clinical utility of vitamin D Testing: an evidence-based analysis, Ontario health technology assessment series. 2010; 10-1-95. http://www.health.gov.on.ca/english/providers/program/mas/tech/reviews/pdf/rev_vitamin%20d_201002.pdf (last access: june 2024)
17. Shab-Bidar S, Bours S, Geusens PPMM, Kessel AGH, van den Bergh JPW. Serum 25(OH)D response to vitamin D3 supplementation: A meta-regression analysis. *Nutrition* 2014;30:975-85.
18. Zittermann A, Ernst JB, Gummert JF, Börgermann J. Vitamin D supplementation, body weight and human serum 25-hydroxyvitamin D response: A systematic review. *Eur J Nutr* 2014;53:367-74.
19. Viprey M, Merle B, Riche B, Freyssenge J, Rippert P, Chakir MA, et al. Development and validation of a predictive model of hypovitaminosis d in general adult population: SCOPYD study. *Nutrients* 2021;13:2526.
20. Bertoldo F, Cianferotti L, Di Monaco M, Falchetti A, Fassio A, Gatti D, et al. Definition, assessment, and management of vitamin D inadequacy: suggestions, recommendations, and warnings from the Italian Society for Osteoporosis, Mineral Metabolism and Bone Diseases (SIOMMMS). *Nutrients* 2022;14:4148.
21. Adami S, Giannini S, Bianchi G, Sinigaglia L, Di Munno O, Fiore CE, et al. Vitamin D status and response to treatment in post-menopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* 2009;20:239-44.
22. Harvey NC, Biver E, Kaufman JM, Bauer J, Branco J, Brandi ML, et al. The role of calcium supplementation in healthy musculoskeletal ageing: An expert consensus meeting of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases (ESCEO) and the International Foundation for Osteoporosis. *Osteoporos Int* 2017;28:447-62.
23. Agenzia Italiana del Farmaco. Nota 79. <https://www.aifa.gov.it/nota-79> (last access: june 2024)
24. Degli Esposti L, Perrone V, Sella S, Arcidiacono G, Bertoldo F, Giustina A, et al. The Potential impact of inducing a restriction in reimbursement criteria on vitamin D supplementation in osteoporotic patients with or without fractures. *Nutrients* 2022;14:1877.
25. Bouillon R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat Rev Endocrinol* 2017;13:466-79.
26. Priemel M, Von Demarus C, Klatte TO, Kessler S, Schlie J, Meier S, et al. Bone mineralization defects and vitamin D deficiency: Histomorphometric analysis of iliac crest bone biopsies and circulating 25-Hydroxyvitamin D in 675 patients. *J Bone Miner Res* 2010;25:305-12.
27. Holick MF, Binkley N, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Guidelines for preventing and treating vitamin D deficiency and insufficiency revisited. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1153-8.
28. Valcour A, Blocki F, Hawkins DM, Rao SD. Effects of age and serum 25-OH-vitamin D on serum parathyroid hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:3989-95.
29. Adami S, Viapiana O, Gatti D, Idolazzi L, Rossini M. Relationship between serum parathyroid hormone, vitamin D sufficiency, age, and calcium intake. *Bone* 2008;42:267-70.
30. Cauley JA, Greendale GA, Ruppert K, Lian Y, Randolph JF, Lo JC, et al. Serum 25 hydroxyvitamin D, bone mineral density and fracture risk across the menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:2046-54.
31. Buchebner D, McGuigan F, Gerdhem P, Malm J, Ridderstråle M, Akesson K. Vitamin D insufficiency over 5 years is associated with increased fracture risk—an observational cohort study of elderly women. *Osteoporos Int* 2014;25:2767-75.
32. Lv QB, Gao X, Liu X, Shao ZX, Xu QH, Tang L, et al. The serum 25-hydroxyvitamin D levels and hip fracture risk: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Oncotarget* 2017;8:39849-58.
33. Bischoff-Ferrari HA, Dawson-Hughes B, Staehelin HB, Orav JE, Stuck AE, Theiler R, et al. Fall prevention with supplemental and active forms of vitamin D: a meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 2009;339:b3692.
34. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav JE, Hu FB, Zhang Y, Karlson EW, et al. Higher 25-hydroxyvitamin D concentrations are associated with better lower-extremity function in both active and inactive persons aged ≥60 y. *Am J Clin Nutr* 2004;80:752-8.
35. van Schoor NM, Visser M, Pluijm SMF, Kuchuk N, Smit JH, Lips P. Vitamin D deficiency as a risk factor for osteoporotic fractures. *Bone* 2007;42:260-6.
36. Cauley JA, Parimi N, Ensrud K, Bauer DC, Cawthon PM, Cummings SR, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and the risk of hip and nonspine fractures in older men. *J Bone Miner Res* 2010;25:545-53.
37. Bischoff-Ferrari HA. Vitamin D-why does it matter? Defining vitamin D deficiency and its prevalence. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;243:3-6.
38. Chakhtoura M, Bacha D, Gharos C, Ajjour S, Assaad M, Jabbour Y, et al. Vitamin D supplementation and fractures in adults: a systematic umbrella review of meta-analyses of controlled trials. *J Clin Endocrinol Metab* 2022;107:882-98.
39. Prieto-Alhambra D, Pagès-Castellà A, Wallace G, Javadi MK, Judge A, Nogués X, et al. Predictors of fracture while on treatment with oral bisphosphonates: A population-based cohort study. *J Bone Miner Res* 2014;29:268-74.
40. Degli Esposti L, Girardi A, Saragoni S, Sella S, Andretta M, Rossini M, et al. Use of antiosteoporotic drugs and calcium/vitamin D in patients with fragility fractures: impact on re-fracture and mortality risk. *Endocrine* 2019;64:367-77.
41. Melamed ML, Michos ED, Post W, Asto B. 25-hydroxyvitamin D levels and the risk of mortality in the general population. *Arch Intern Med* 2008;168:1629-37.
42. Michaëlsson K, Baron JA, Snellman G, Gedeberg R, Byberg L, Sundström J, et al. Plasma vitamin D and mortality in older men: A community-based prospective cohort study. *Am J Clin Nutr* 2010;92:841-8.
43. Durazo-Arvizu RA, Dawson-Hughes B, Kramer H, Cao G, Merkel J, Coates PM, et al. The reverse J-shaped association between serum total 25-hydroxyvitamin D concentration and all-cause mortality: The impact of assay standardization. *Am J Epidemiol* 2017;185:720-6.
44. Sutherland JP, Zhou A, Hyppönen E. Vitamin D deficiency increases mortality risk in the UK biobank. A nonlinear mendelian randomization study. *Ann Intern Med* 2022;175:1552-9.

45. Takacs I, Bakos B, Nemeth Z, Toth BE, Szili B, Lakatos P. Controlled randomized open label clinical study comparing the safety and efficacy of loading schedules in vitamin D deficient patients. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2023;231:106330.
46. McCullough PJ, Lehrer DS, Amend J. Daily oral dosing of vitamin D3 using 5000 TO 50,000 international units a day in long-term hospitalized patients: insights from a seven year experience. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018;189:228-39.
47. Leboff MS, Bischoff-Ferrari HA. The effects of vitamin D supplementation on musculoskeletal health: the VITAL and DO-Health Trials. *J Gerontol Biol Sci Med Sci* 2023;78:73-8.
48. Ross AC, Manson JA, Abrams S, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: What clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:53-8.
49. Hossein-Nezhad A, Holick MF. Vitamin D for health: A global perspective. *Mayo Clin Proc* 2013;88:720-55.