

Documento congiunto SIBioC, SIOMMMS, ELAS Italia, AME relativo alla nota Aifa 96 sulla prescrivibilità dei farmaci per la carenza di Vitamina D, e raccomandazioni per la refertazione

Ruggero Dittadi^{1,a,b}, Sabrina Corbetta^{2,3,a}, Giuseppe Banfi^{2,4,a}, Francesco Bertoldo^{5,a}, Silvia Migliaccio^{6,a}, Stefano Gonnelli^{7,a}, Maurizio Rossini^{5,c}, Marco Migliardi^{8,b}, Antonio Fortunato^{9,b}, Fabio Vescini^{10,d}, Andrea Palermo^{11,d}, Cristina Vassalle^{12,a}, Silvia Gelsumini^{13,a}, Giovanni Lombardi^{2,14,a,c}

A nome di:

- Gruppo di Studio inter-societario “Marcatori biochimici del turnover del tessuto osseo e del tessuto muscolare”, SIBioC-SIOMMMS (Società Italiana dell’osteoporosi, del metabolismo minerale e delle malattie dello scheletro)
- European Ligand Assay Society-Italia (ELAS Italia)
- Associazione Medici Endocrinologi (AME)

¹UOC Medicina di Laboratorio, Ospedale dell’Angelo, ULSS3 Serenissima, Mestre

²IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi, Milano

³Dipartimento di Scienze Biomediche Chirurgiche e Odontoiatriche, Università degli Studi, Milano

⁴Università Vita Salute San Raffaele, Milano

⁵Dipartimento di Medicina, Università degli Studi, Verona

⁶Dipartimento di Scienze Motorie, Umane e della Salute, Unità di Endocrinologia, Università degli Studi di Roma “Foro Italico”, Roma

⁷Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Neuroscienze, Università di Siena, Policlinico Le Scotte, Siena

⁸UOC Laboratorio Analisi, AO Ordine Mauriziano, Torino

⁹UOC Patologia Clinica, ASUR Marche - Area Vasta 5, Ascoli Piceno

¹⁰SOC Endocrinologia e Malattie del Metabolismo, Azienda Sanitaria-Universitaria Integrata, Santa Maria della Misericordia di Udine

¹¹UO di Endocrinologia e Diabete, Università Campus Bio-Medico, Roma

¹²Fondazione CNR-Regione Toscana “G. Monasterio”, Pisa

¹³UOC SMeL2 Analisi Chimico Cliniche, ASST Papa Giovanni XXIII, Bergamo

¹⁴Poznań University of Physical Education & Sport, Poznań, Polska

^aMembro del Gruppo di Studio inter-societario “Marcatori biochimici del turnover del tessuto osseo e del tessuto muscolare” SIBioC-SIOMMMS;

^bMembro del Consiglio Direttivo ELAS Italia

^cPresidente SIOMMMS

^dMembro del Gruppo di lavoro AME “Metabolismo minerale e osseo”

^eMember of the Working Group “Bone markers” - IFCC

INTRODUZIONE

I vitameri del gruppo D (di seguito globalmente indicati come vitamina D), che includono le classiche 1,25-diidrossi vitamina D2 e D3, (calcitriolo) ma anche la forma 24,25-diidrossi, hanno un ruolo centrale nell’omeostasi del calcio e, pertanto, svolgono un ruolo essenziale nel metabolismo e nella corretta funzionalità virtualmente di tutti i tessuti. La vitamina D riveste indiscussi ruoli nel metabolismo minerale osseo e, probabilmente, anche nell’ambito di infiammazione ed autoimmunità, funzione muscolo-scheletrica e cardiaca e comunicazione neuromuscolare. Pertanto, oltre alla ben nota associazione causale tra deficienza di vitamina D e rachitismo nel bambino, osteomalacia ed aumentato rischio di fratture osteoporotiche nell’adulto [1] è plausibile, ed in parte dimostrato, che uno status vitaminico D subottimale

possa associarsi ad altre condizioni patologiche [2].

Carenza e deficienza di vitamina D sono comuni nelle popolazioni che vivono alle alte latitudini soprattutto durante la stagione invernale, ma in realtà uno status vitaminico subottimale è ormai di frequentissimo riscontro anche alle nostre latitudini ed è associato all’odierno stile di vita caratterizzato, soprattutto, dalla ridotta attività svolta all’esterno e, pertanto, dall’impossibilità di raggiungere le opportune dosi giornaliere di radiazione UVB [3,4]. Anche nella popolazione italiana si possono riscontrare livelli molto bassi di 25(OH)D, con almeno la metà della popolazione con concentrazioni inferiori a 50 nmol/L (20 ng/mL) [5,6]. L’elevata prevalenza di ipovitaminosi D rende conto del frequente, sebbene a volte ingiustificato, ricorso alla supplementazione [7].

Attualmente, il livello sierico di 25(OH)D totale [somma

di 25(OH)D₂ e 25(OH)D₃ è considerato il miglior biomarcatore per la valutazione dello status vitaminico D [8]. Sebbene sia un metabolita non attivo, 25(OH)D è caratterizzato da un'emivita maggiore rispetto a 1,25-(OH)D ed i suoi livelli circolanti non sono dipendenti dal paratormone (PTH) che, invece, controlla l'idrossilazione enzimatica in C1 [3].

Al fine di regolamentare la prescrizione di vitamina D (nelle forme di colecalciferolo, colecalciferolo/sali di calcio, calcifediolo) nella popolazione adulta e, quindi, di contenere i costi sostenuti dal Sistema Sanitario Nazionale (SSN), l'Agenzia Italiana del farmaco (AIFA) ha prodotto un documento, la nota 96 [9], che identifica categorie di pazienti aventi diritto alla rimborsabilità della terapia con vitamina D, individuate sulla base della determinazione dei livelli sierici di vitamina D. Secondo la nota 96, l'appropriatezza prescrittiva della determinazione chimico clinica dei livelli circolanti di vitamina D viene riconosciuta per i soggetti:

- che presentano sintomi suggestivi di carenza di vitamina D;
- in terapia di lunga durata con farmaci interferenti con il suo metabolismo osseo;
- affetti da condizioni di malassorbimento;
- affetti da patologie ossee accertate;
- con riscontro di valori di PTH elevato e calcemia bassa o normale.

Persone anziane istituzionalizzate, donne in gravidanza o in allattamento e persone affette da osteoporosi o osteopatie accertate non candidate a terapia remineralizzante (vedi Nota 79) sono contraddistinte dal riconoscimento della possibilità di supplementazione diretta con vitamina D, senza necessità della sua preventiva misura. Infine, vale il parere specialistico circa la necessità della determinazione nel caso di pazienti affetti da insufficienza renale, urolitiasi, ipercalcemia, sarcoidosi, neoplasie metastatiche e linfomi.

La prescrivibilità a carico del SSN della supplementazione con vitamina D sarà assicurata con livelli di 25(OH)D al di sotto dei 20 ng/mL, che corrispondono a 50 nmol/L. Il tipo di supplementazione viene differenziato in base alle fasce di concentrazione di 25(OH)D < 12 ng/mL (30 nmol/L) e compreso tra 12 e 20 ng/mL (tra 30 e 50 nmol/L). Concentrazioni sieriche >20 ng/mL (>50 nmol/L) vengono considerate "sufficienti" e, pertanto, non giustificano costi a carico del SSN [9]. La nota AIFA si presta ad alcune considerazioni che vengono di seguito esposte.

CONSIDERAZIONI NELL'AMBITO DEL LABORATORIO

Se la nota 96 raggiungerà, almeno in parte, l'obiettivo del risparmio della spesa farmaceutica relativa alla supplementazione con vitamina D, dal punto di vista del laboratorio si rischia di incrementare la prescrizione della determinazione di 25(OH)D a causa dell'aspecificità dei sintomi indotti dalla carenza prolungata di vitamina D, inducendo un possibile e paradossale aumento dei costi della diagnostica a carico del SSN.

1. Affidabilità e riproducibilità dei diversi metodi di determinazione della 25(OH)D

Data l'importanza affidata dalla nota 96 alla determina-

zione dei livelli circolanti di 25(OH)D, è mandatorio considerare l'aspetto più prettamente tecnico della determinazione di vitamina D: i differenti metodi di determinazione disponibili sono tutti caratterizzati da errori sistematici [3] e, inoltre, presentano livelli di discordanza compresi tra il 15 % ed il 30 % rispetto al valore bersaglio, come risulta dagli ultimi rapporti VEQ DEQAS (<http://deqas.kpmd.co.uk>, ultimo accesso 10/01/2020). Come riportato in un'ampia revisione della letteratura recentemente pubblicata, nonostante i grandi sforzi volti a standardizzare i metodi di determinazione e a minimizzarne la variabilità, l'attuale differenza della misura della concentrazione di 25(OH)D tra metodi immunometrici e LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) è maggiore delle differenze accettabili per analiti determinati con questi metodi e, pertanto, la variabilità analitica dovrebbe essere considerata nella definizione e nell'utilizzo dell'intervallo di riferimento [3]. L'assenza di standardizzazione della misura della vitamina D [25(OH)D] ed altri metaboliti, provoca una sostanziale incertezza analitica che è necessario considerare non solo quando si valutano studi epidemiologici, ma anche quando s'interpretano i risultati dei pazienti [10].

Il *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) promuove il *Vitamin D Standardization Program* (VDSP) con lo scopo di valutare la comparabilità delle diverse procedure analitiche verso materiali di riferimento [11]. Sarebbe, quindi, auspicabile che tutti i metodi in commercio aderissero e venissero valutati nell'ambito di questo programma, che può permettere perlomeno un periodico monitoraggio dei bias metodologici.

Va anche ricordato che dal 2019 IFCC ha creato un Comitato unico *Bone metabolism* fondendo tre diversi *Working Groups* già esistenti che, tra gli altri, sia prefigge di standardizzare i metodi per la determinazione della Vitamina D nei laboratori clinici.

Dato il bias intrinseco alla determinazione di vitamina D, è stata suggerita la definizione di intervalli di riferimento differenziati per metodo [10]. Tuttavia, questa soluzione pone notevoli problemi pratici [12], che potrebbero forse essere superati dall'utilizzo di fattori di correzione specifici per metodo che riportino le determinazioni all'interno di un unico intervallo.

Va infine considerato che i metodi di misurazione di 25(OH)D possono risentire dell'effetto di alcuni interferenti. La natura lipofila della vitamina D la rende suscettibile ad interferenze non-specifiche da parte di altri lipidi presenti nel siero o plasma, come le lipoproteine, in termini di capacità dell'agente legante di associarsi alla 25(OH)D del campione e del calibratore nei metodi immunometrici. Per permettere l'accurata determinazione della 25(OH)D, si rende necessario il pretrattamento del campione al fine di separarla dalla proteina di trasporto *Vitamin D-Binding Protein* (VDBP) utilizzando un denaturante in situ nei metodi immunometrici [13]. Data la differenza nelle modalità di estrazione, le differenze nei risultati tra i diversi metodi sono decisamente rilevanti, soprattutto a basse concentrazioni [14]. Anche i metodi in LC-MS/MS non sono immuni da interferenze. Esiste una forma di 25(OH) vitamina D, C3 epimero [3-epi-25(OH)D₃ e 3-epi-25(OH)D₂], con differente orientamento chirale in posizione C3. Questo vitamero, scarsamente attivo ma con uguale massa, è presente prevalentemente in età pediatrica, ma è riscontrabile in quantità non trascurabili e relativamente stabili nell'adulto [15]: ciò

costituisce un possibile interferente per la determinazione in spettrometria di massa, che è una tecnica achirale. Inoltre, con questi metodi la presenza di gel di separazione nelle provette del prelievo può provocare il fenomeno di "soppressione di ioni", cioè un ostacolo al processo di ionizzazione [14].

2. Uniformità della refertazione: l'unità di misura

La refertazione della Vitamina D presenta molte criticità: *in primis*, il Sistema Internazionale prevede come unità di misura nmol/L ma, di contro, l'unità ng/mL è sicuramente più utilizzata e, pertanto, più familiare (la stessa nota 96, purtroppo, utilizza come unità di misura esclusivamente ng/mL). L'armonizzazione dell'uso dell'unità di misura è fondamentale e deve essere accompagnata da opportuna formazione dei clinici al fine di evitare fraintendimenti.

3. Uniformità della refertazione: la definizione della soglia diagnostica/soglia terapeutica dei livelli circolanti di 25(OH)D

In relazione ai valori di riferimento per la determinazione dei livelli di 25(OH)D, la nota AIFA riporta come soglia di sufficienza 50 nmol/L (20 ng/mL) facendo proprie, le indicazioni dello *U.S. Institute of Medicine* (IOM) del 2011 [16]. È opportuno sottolineare che i limiti definiti da IOM non hanno trovato un accordo universale [12,17,18], e la *Endocrine Society* definisce come minimo 75 nmol/L (30 ng/mL) [1,16]. Ad oggi, solo Australia e Nuova Zelanda utilizzano intervalli di riferimento che considerano le variazioni stagionali [19]. È evidente, pertanto, che si possano creare differenze di trattamento fra i pazienti che eseguono il dosaggio della vitamina D in periodi diversi dell'anno (p.es. all'inizio dell'autunno rispetto alla fine dell'inverno, con più risultati "normali" nel primo caso ed un maggior numero di "patologici" nel secondo). Le linee guida di SIOMMMS (Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro) indicano l'adeguatezza del cut-off di 50 nmol/L (20 ng/mL) per la popolazione generale, mentre per la popolazione a rischio di ipovitaminosi D e per i soggetti osteoporotici sottoposti a terapia come da nota 79 [20] viene consigliata una concentrazione minima di 75 nmol/L (30 ng/mL).

La determinazione dei valori soglia diagnostici di insufficienza di 25(OH)D è stata valutata sulla base dell'ottimizzazione dell'assorbimento intestinale di calcio e/o della normalizzazione dei livelli circolanti di PTH, fornendo purtroppo risultati discordanti. Inizialmente, era stato riscontrato un completo assorbimento intestinale di calcio in presenza di concentrazioni di vitamina D >80 nmol/L (>32 ng/mL) [21]. Successivamente Need et al. [22] hanno dimostrato che l'assorbimento intestinale di calcio raggiunge un plateau già in presenza di concentrazioni di 25(OH)D di 20 nmol/L (8 ng/mL), mentre Aloia et al. [23] hanno trovato solo minimi incrementi di assorbimento di calcio per concentrazioni di 25(OH)D comprese tra 40 nmol/L e 110 nmol/L (tra 16 ng/mL e 44 ng/mL), senza nessuna evidenza circa una soglia determinabile. Analogamente, un altro studio ha dimostrato che la supplementazione di vitamina D tale da mantenere concentrazioni di 25(OH)D >50 nmol/L (>20 ng/mL), induceva un incremento dell'assorbimento di calcio

molto limitato e non associato ad incrementi della densità minerale ossea [24]. La valutazione dei livelli di 25(OH)D associati alla normalizzazione delle concentrazioni di PTH ha fornito risultati variabili a seconda del modello di studio utilizzato (da 32 nmol/L ad oltre 78 nmol/L, ossia da 12,8 ng/mL ad oltre 31,2 ng/mL) [25-27], anche a causa della complessa interazione dei diversi fattori coinvolti nel rapporto vitamina D/PTH.

Una revisione del 2009 sui livelli necessari a prevenire osteomalacia e rachitismo [28], ha mostrato che una soglia oltre la quale non sussiste rischio di malattia ossea è difficilmente individuabile. La concentrazione mediana in bambini con rachitismo risultava inferiore a 27 nmol/L (10,8 ng/mL) in 6 studi su 13, ma venivano riportati anche livelli di 30-50 nmol/L (12-20 ng/mL), in funzione del livello di assunzione di calcio nelle diverse popolazioni studiate. In uno studio [29] su 675 persone morte per incidenti o altre cause non naturali, nel quale sono stati determinati i livelli di vitamina D in relazione alla eventuale presenza di osteomalacia diagnosticata mediante biopsia della cresta iliaca, è stato evidenziato che livelli di 25(OH)D >75 nmol/L (>30 ng/mL) non fossero mai associati a segni di osteomalacia. È anche vero che solo nel 3% delle persone con tracce di osteomalacia furono riscontrati livelli di 25(OH)D compresi tra 50 nmol/L e 75 nmol/L (tra 20 ng/mL e 30 ng/mL).

L'associazione fra la concentrazione di vitamina D ed il rischio di fratture mostra sempre una relazione inversa tra i due parametri, ma le concentrazioni al di sopra delle quali non si osserva più alcun miglioramento sono comprese da 40 nmol/L a 70 nmol/L (da 16 ng/mL a 28 ng/mL) [30-33].

Per quanto riguarda le patologie extra-ossee, diversi studi osservazionali hanno riportato l'associazione fra bassi livelli di 25(OH)D ed un gran numero di malattie, comprese malattie cardiovascolari, cancro, diabete, malattie infettive, autoimmuni e neurodegenerative [34]. Negli ultimi anni sono state pubblicate un ampio numero di meta-analisi che valutano queste associazioni, tuttavia gli effetti della supplementazione con 25(OH)D sono spesso discordanti e poco convincenti [35], in particolare per le malattie croniche, come le cardiovascolari ed il cancro [36,37].

Nonostante la numerosa quantità di dati disponibili, ad oggi non sembra possibile inoltre ricavare un consenso sui possibili valori di riferimento in specifiche patologie extraossee, così come sui livelli ottimali di assunzione della vitamina D. Gli effetti benefici extra-scheletrici attribuiti alla vitamina D sono, comunque, riferiti a livelli di concentrazione generalmente più elevati rispetto a quelli sul metabolismo del calcio.

CONSIDERAZIONI CLINICHE

La nota 96 non prende in considerazione il problema dell'ormai epidemica carenza di vitamina D [38], la quale richiede un approccio preventivo adeguato.

La nota indica le condizioni cliniche per le quali è ammissibile (o consigliabile) la determinazione della vitamina D ma, sebbene la motivazione clinica sia decisamente corretta, la evidente aspecificità della condizione di ipovitaminosi D lascia ampi margini di discrezionalità al medico prescrittore. Se da un lato questo tipo di indicazione esula dalla missione di AIFA, che è limitata alla regolamentazione di uso e prescrizione di un farmaco, dall'altro la praticità applicativa

che dovrebbe essere propria di una nota AIFA viene a mancare. Come riferimento vengono, poi, prese le indicazioni NICE (*National Institute for Health and Care Excellence*) organismo britannico, extra UE, che è stato spesso in contrasto con le indicazioni delle società scientifiche internazionali, soprattutto in ambito di osteoporosi.

È importante però dare atto che la nota 96, finalmente, pone il problema della prescrizione indiscriminata di vitamina D e, nello specifico, riporta che:

- lo screening dell'ipovitaminosi D non deve essere proposto indiscriminatamente a tutta la popolazione generale. Si deve riconoscere il merito alla nota 96 di aver tentato di identificare delle categorie di intervento. A questo proposito si ritiene che lo screening della 25(OH)D non sia consigliabile anche in un ampio elenco di condizioni notoriamente a rischio di ipovitaminosi, e dove la supplementazione è comunque obbligatoria; una determinazione potrà essere eventualmente eseguita dopo 2-3 mesi dall'inizio della supplementazione per valutare il raggiungimento dell'obiettivo. In accordo con la nota 96, si sconsiglia il continuo monitoraggio dei valori di 25(OH)D, una volta iniziata la supplementazione.
- la prevenzione del rischio autoimmunitario, cardiovascolare, neoplastico, e così via non è al momento oggetto di pratica clinica corrente.
- ribadisce la necessità di supplementare con vitamina D i pazienti candidati a terapia remineralizzante, in accordo con la nota 79.

POSSIBILI RACCOMANDAZIONI

1. Aspetti analitici: se le precisioni intra-metodo sono mediamente buone, i bias fra metodi sono ancora elevati, tanto che in realtà sarebbe da sconsigliare l'individuazione di soglie predeterminate, perché l'uso di uno stesso valore soglia per metodi diversi può provocare una errata classificazione clinica dei pazienti e andrebbero perciò utilizzati intervalli di riferimento metodo-specifici [10]. Il problema si ripropone ogni volta che si cercano di individuare obiettivi terapeutici precisi per molecole i cui metodi di misura sono complessi e/o difficilmente standardizzabili. È pur vero che le esigenze prescrittive impongono di stabilire dei limiti decisionali, ma è altrettanto importante che i clinici siano consci della criticità del problema: a questo scopo, è opportuno che il referto di laboratorio riporti perlomeno l'indicazione esplicita del metodo utilizzato per la determinazione della Vitamina D. Una ulteriore informazione potrebbe essere l'indicazione del *bias* medio del metodo utilizzato rispetto a metodologie di riferimento, ma, oltre al fatto che questo dato può non essere facilmente reperibile (fra l'altro non tutte le ditte produttrici partecipano al programma VDSP), gli stessi limiti decisionali sono tratti da studi effettuati con metodologie non "di riferimento". L'inserimento di questo dato nel referto, allo stato attuale delle conoscenze, non sembra quindi essere ancora raccomandabile.

2. Unità di misura: è necessario attuare un processo di armonizzazione che renda facilmente confrontabili i referti generati da diversi laboratori. Una opzione può essere quella di riportare sia l'unità di misura tradizionale (ng/mL) che quella voluta dal SI (nmol/L) almeno per un periodo di transizione, temporalmente definito, che porti, in ultima istanza, all'adozione dell'unità SI.

3. Valori soglia: come si è detto, la nota AIFA 96 stabilisce un unico cut-off, di 20 ng/mL (50 nmol/L), legato alla rimborsabilità del farmaco. Il citato disaccordo sulle linee guida che hanno portato a questa indicazione è dimostrato dal fatto che al momento vengono generalmente usate dai laboratori le definizioni di "insufficienza" al di sotto di 75 nmol/L (30 ng/mL), con ulteriori limiti di "carenza" sotto i 50 o 25 nmol/L (20 o 10 ng/mL), più vicine alle posizioni di *Endocrine Society* (1,39). Questa situazione può generare disorientamento e risultati contraddittori, con casi che risulterebbero identificati nel referto come ancora "insufficienti", ma senza la possibilità di rimborso della supplementazione di vitamina D.

Una recente revisione delle linee guida sull'argomento ha rilevato che su 12 linee guida esaminate, 4 si esprimono a favore di una soglia di 50 nmol/L (20 ng/mL) e 8 consigliano il valore di 75 nmol/L (30 ng/mL) [40].

Per quanto riguarda i valori di tossicità, si ritiene che non ci siano prove di nessun tipo tali da indicare un vero valore soglia, ma nella necessità di individuare un qualche limite si suggerisce la concentrazione di almeno di 250 nmol/L (100 ng/mL), come indicato da *Endocrine Society* [1], contrariamente alla soglia di 100 nmol/L (40 ng/mL), riportata in nota 96 ma non sostenuta da alcuna evidenza.

Vista questa situazione e tutti gli aspetti precedentemente descritti, il gruppo di studio è orientato a consigliare una posizione prudente, proponendo questa possibile tipologia di refertazione, con i valori indicati nel riquadro sottostante:

SINOSI DELLE RACCOMANDAZIONI

- indicare esplicitamente nel referto il metodo utilizzato per la determinazione
- utilizzare le unità di misura SI (nmol/L), eventualmente accompagnate per un congruo periodo di tempo dalla espressione del risultato nelle unità di misura tradizionali (ng/mL)
- identificare i valori atti ad orientare la valutazione dello status del soggetto

• <50 nmol/L (<20 ng/mL)	<i>valori insufficienti</i>
• 50-75 nmol/L (20-30 ng/mL)	<i>valori non ottimali, in relazione a possibili comorbidità associate</i>
• >75 nmol/L (>30 ng/mL)	<i>valori ottimali</i>

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, 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. Grant WB. Vitamin d and health in the mediterranean countries. *Hormones* 2019;18:23-35.

3. **Ferrari D, Lombardi G, Banfi G.** Concerning the vitamin d reference range: Pre-analytical and analytical variability of vitamin d measurement. *Biochemia Med* 2017;27:030501
4. **Ferrari D, Lombardi G, Strollo M, et al.** Association between solar ultraviolet doses and vitamin d clinical routine data in European mid-latitude population between 2006 and 2018. *Photochem Photobiol Sci* 2019;18:2696-706
5. **Bianchi S, Maffei S, Prontera C, et al.** Preanalytical, analytical (DiaSorin LIAISON) and clinical variables potentially affecting the 25-OH vitamin D estimation. *Clin Biochem* 2012;45:1652-7
6. **Adami S, Bertoldo F, Braga V, et al.** 25-hydroxy vitamin D levels in healthy premenopausal women: association with bone turnover markers and bone mineral density. *Bone* 2009;45:423-6
7. **Hilger J, Friedel A, Herr R, et al.** A systematic review of vitamin d status in populations worldwide. *Br J Nutr* 2014;111:23-45.
8. **Jones G.** Interpreting vitamin d assay results: Proceed with caution. *Clin J Am Soc Nephrol* 2015;10:331-4
9. **Istituzione della nota AIFA 96.** Determinazione n. 1533/2019. Roma, 2019
10. **Herrmann M, Farrell CL, Pusceddu I, et al.** Assessment of vitamin d status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* 2017;55:3-26
11. **Centers for Disease Control and Prevention.** Laboratory quality assurance and standardization programs: Hormone standardization program. (<https://www.cdc.gov/labstandards/hs.html>)
12. **Dittadi R.** Vitamina D e recepimento della nota AIFA 96. Implicazioni per il laboratorio. *LigandAssay* 2019;24
13. **Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, et al.** Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin d assays: Influence of vitamin d binding protein concentration. *Clin Chem* 2012;58:543-8
14. **Carter GD.** Accuracy of 25-hydroxyvitamin d assays: Confronting the issues. *Cur Drug Targets* 2011;12:19-28
15. **Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, et al.** The c-3 epimer of 25-hydroxyvitamin d(3) is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:163-8
16. **Ross AC, Manson JE, Abrams SA, 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
17. **Fuleihan GH, Bouillon R, Clarke B, et al.** Serum 25-hydroxyvitamin d levels: Variability, knowledge gaps, and the concept of a desirable range. *J Bone Miner Res* 2015;30:1119-33
18. **Bates B, Lennox A, Prentice A, et al.** National diet and nutrition survey: Headline results from years 1, 2 and 3 (combined) of the rolling programme (2008/2009-2010/11). In: Agency DoHaTFS, London, 2012
19. **Nowson CA, McGrath JJ, Ebeling, et al.** Vitamin D and health in adults in australia and new zealand: A position statement. *Med J Australia* 2012;196:686-7
20. **Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, et al.** Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin d. *J Am Coll Nutr* 2003;22:142-6
21. **Need AG, O'Loughlin PD, Morris HA, et al.** Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *J Bone Miner Res* 2008;23:1859-63
22. **Aloia JF, Dhaliwal R, Shieh A, et al.** Vitamin d supplementation increases calcium absorption without a threshold effect. *Am J Clin Nutr* 2014;99:624-31
23. **Hansen KE, Johnson RE, Chambers KR, et al.** Treatment of vitamin d insufficiency in postmenopausal women: A randomized clinical trial. *JAMA Int Med* 2015;175:1612-21
24. **Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, et al.** Prevalence of vitamin d insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997;7:439-43
25. **Durazo-Arvizu RA, Dawson-Hughes B, Sempos CT, et al.** Three-phase model harmonizes estimates of the maximal suppression of parathyroid hormone by 25-hydroxyvitamin d in persons 65 years of age and older. *J Nutr* 2010;140:595-9
26. **Saliba W, Barnett O, Rennert HS, et al.** The relationship between serum 25(oh)d and parathyroid hormone levels. *Am J Med* 2011;124:1165-70.
27. **Chung M, Balk EM, Brendel M, et al.** Vitamin D and calcium: A systematic review of health outcomes. *Evid Rep Technol Assess* 2009;1:420
28. **Priemel M, von Domarus C, Klatte TO, 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
29. **Melhus H, Snellman G, Gedeberg R, et al.** Plasma 25-hydroxyvitamin d levels and fracture risk in a community-based cohort of elderly men in sweden. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2637-45
30. **Lips P, Obrant KJ.** The pathogenesis and treatment of hip fractures. *Osteoporos Int* 1991;1:218-31.
31. **Cauley JA, Parimi N, Ensrud KE, 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
32. **van Schoor NM, Visser M, Pluijm SM, et al.** Vitamin D deficiency as a risk factor for osteoporotic fractures. *Bone* 2008;42:260-6
33. **Bischoff-Ferrari HA.** "Vitamin D – why does it matter?" – Defining Vitamin D deficiency and its prevalence. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;72S:3-6
34. **Theodoratou E, Tzoulaki I, Zgaga L, et al.** Vitamin D and multiple health outcomes: Umbrella review of systematic reviews and meta-analyses of observational studies and randomised trials. *BMJ* 2014;348:g2035
35. **Autier P, Mullie P, Macacu A, et al.** Effect of vitamin D supplementation on non-skeletal disorders: a systematic review of meta-analyses and randomised trials. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017; 5: 986-1004
36. **Barbarawi M, Kheiri B, Zayed Y, et al.** Vitamin D Supplementation and Cardiovascular Disease Risks in More Than 83 000 Individuals in 21 Randomized Clinical

Trials: A Meta-analysis. JAMA Cardiol 2019;4:765-75

37. **Cesareo R, Attanasio R, Caputo M, et al.** Italian association of clinical endocrinologists (AME) and Italian chapter of the American Association of Clinical Endocrinologists (AACE) position statement: Clinical management of vitamin d deficiency in adults. Nutrients 2018;10
38. **Determinazione n. 446/2017.** Aggiornamento della Nota 79. Roma, 2017
39. **Souberbielle JC, Body JJ, Lappe JM, et al.** Vitamin D and musculoskeletal health, cardiovascular disease, autoimmunity and cancer: Recommendations for clinical practice. Autoimmun Rev 2010;9:709-15
40. **Pludowski P, Holick MF, Grant WB, et al.** Vitamin D supplementation guidelines. J Steroid Biochem Mol Biol 2018;175:125-35

Per corrispondenza:

Prof. Giovanni Lombardi
Laboratorio di Biochimica Sperimentale e
Biologia Molecolare
IRCCS Istituto Ortopedico Galeazzi
Via Riccardo Galeazzi, 4
20161 – Milano
Tel.: 041/9656033 - 041/9657553
E-mail: giovanni.lombardi@grupposandonato.it