Determinazione e supplementazione della vitamina D: come, a chi e perché

Mario Plebani[1,2], Martina Zaninotto[2], Sandro Giannini[3], Stefania Sella[3], Maria Fusaro[4], Giovanni Tripepi[5], Maurizio Gallieni[6], Markus Herrmann[7], Mario Cozzolino[8]

[1]Università di Padova
[2] QI.LAB.MED, Spin-off dell'Università di Padova
[3]Clinica Medica 1, Dipartimento di Medicina-DIMED, Università di Padova
[4]Istituto di Fisiologia Clinica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IFC-CNR), Pisa
[5]Istituto di Fisiologia Clinica del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IFC-CNR), Reggio Calabria
[6]Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche, Università di Milano
[7]Clinical Institute of Medical and Chemical Laboratory Diagnostics, Medical University of Graz, Austria
[8]Dipartimento di Scienze della Salute, Università di Milano

ABSTRACT

Vitamin D assay and supplementation

In the last decades, in addition to improvements in the understanding of pathophysiology, mechanisms of action and role of vitamin D in bone metabolism, significant advancements in analytical methods and assay standardization have been reported. Advances in biochemical assessment, therapeutic goals for vitamin D nutrition for optimal bone health, and the association of vitamin D deficiency with non-skeletal disease have revived interest in this hormone. In addition, many papers, meta-analyses and recommendations on the clinical value of this vitamin and its supplementation to correct severe vitamin D deficiency have been published. However, particularly after the release of the "Determina" AIFA, it seems to be useful to clarify some essential variables of the vitamin D measurement (regarding both analytical and post-analytical issues), as well as current evidence on its supplementation. In addition, taking into consideration the interconnection between vitamin D, Parathyroid hormone (PTH) and fibroblast growth factor 23 (FGF23), a discussion on both analytical issues and clinical usefulness of their measurement will be discussed.

Parole chiave: *25-OH vitamina D, paratormone, FGF23*

INTRODUZIONE

Il ruolo della vitamina D nella mineralizzazione dell'osso e nella prevenzione del rachitismo fu scoperto 100 anni fa. Circa 50 anni fa, fu sviluppato il primo metodo per la determinazione della 25-idrossivitamina D [(25(OH)D] nel sangue, il parametro che, ancora oggi, viene utilizzato per valutare lo status vitaminico, dato che il deficit di vitamina D è tuttora una condizione ad elevata prevalenza nei Paesi sviluppati che compromette la mineralizzazione ossea (1,2). In aggiunta al suo ruolo fondamentale nella regolazione dell'omeostasi di calcio e fosforo, nelle ultime decadi numerosi lavori hanno dimostrato che la vitamina D ha funzioni pleiotropiche che interessano virtualmente tutti gli organi e tessuti. Ad esempio, la vitamina D modula la crescita e differenziazione cellulare, la regolazione dell'immunità, l'omeostasi del glucosio, le funzioni cognitive e l'attività di molti ormoni con conseguenti ricadute sull'associazione fra deficit vitaminico e varie condizioni patologiche, incluse le malattie cardiovascolari (3-5).

In queste decadi, oltre al miglioramento delle conoscenze fisiopatologiche, si è registrato un progressivo avanzamento nelle tecnologie analitiche per la sua determinazione, come pure nella standardizzazione metodologica, e sono stati pubblicati un numero significativo di lavori scientifici, meta-analisi e linee-guida sull'importanza della vitamina stessa e sulla necessità di supplementazione negli individui carenti.

Tuttavia, particolarmente dopo la diffusione della recente Determina AIFA (6), vi è sicura percezione della mancanza di chiarezza su elementi fondamentali relativi alla determinazione della vitamina D (sia a livello strettamente analitico che post-analitico, particolarmente correlato all'espressione delle concentrazioni con differenti unità di misura), come pure sulle evidenze scientifiche connesse all'efficacia/sicurezza della supplementazione.

Corrispondenza a: Mario Plebani, Università di Padova, QI.LAB.MED, Spin-off dell'Università di Padova, Email: mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 22.05.2024 Revisionato: 11.06.2024 Accettato: 12.06.2024

Pubblicato on-line: 02.07.2024 DOI: 10.19186/BC_2024.034

Questa rassegna pertanto, nasce dalla volontà di fare chiarezza sugli aspetti fondamentali citati in precedenza perché siano portati all'attenzione sia del mondo dei clinici che di quello dei professionisti della medicina di laboratorio, oltre che di altri portatori di interesse quali la rappresentanza dei pazienti, ed ovviamente di amministratori e decisori politici. In aggiunta, il contributo si propone di produrre evidenze sull'uso di esami integrativi e complementari alla determinazione del vitamero 25(OH)D per un utilizzo razionale e sostenibile degli esami di laboratorio, particolarmente nella malattia renale cronica come paradigma di situazioni patologiche di significativo interesse clinico.

DETERMINAZIONE DELLA VITAMINA D

Vi è ampio consenso ed evidenza che lo studio dello status vitaminico D debba essere effettuato attraverso la determinazione della forma biologica 25 idrossilata 25-(OH)D per tre principali motivi (7-9):

- la sua emivita è sufficientemente lunga da permettere la determinazione della quota stabile nel sangue e quindi di un indicatore affidabile dello status vitaminico;
- la sua concentrazione nel sangue è 1 000 volte maggiore di quella della forma di-idrossilata [1α,25$(OH)_2$] e pertanto consente di disporre di metodi di misura con adeguata sensibilità analitica;
- la sua concentrazione è la sommatoria della produzione endogena e dell'introduzione della vitamina con la dieta, che consente, quindi, una affidabile stima dello status vitaminico globale.

La determinazione della 25(OH)D viene, quindi, effettuata per due principali motivi: determinare lo status nutrizionale della vitamina e monitorare l'efficacia della supplementazione.

Metodi analitici

La determinazione del vitamero 25(OH)D presenta numerose problematiche analitiche dovute al forte legame con la proteina legante (Vitamin D-Binding-Protein, VDBP), alla necessità di determinare in forma equimolare la quota di 25$(OH)D_2$ e 25$(OH)D_3$, alla coesistenza di numerose sostanze a simile composizione chimica che possono provocare cross-reazioni, ed ancora ad effetti matrice quali l'interferenza da anticorpi eterofili o da modifiche della composizione proteica (10).

Le tecniche analitiche per la determinazione della vitamina D possono essere distinte in due grandi gruppi: metodi con rimozione completa, prima della fase analitica, di proteine e lipidi grazie all'utilizzo di solventi organici, e che includono la spettrometria di massa (LC-MS/MS), la cromatografia liquida (HPLC) e metodi radioimmunologici (RIA); metodi immunometrici automatizzati che non prevedono l'utilizzo di solventi organici, ma strategie alternative per liberare la vitamina dalle proteine leganti (10-13).

Il primo metodo di determinazione della 25(OH)D fu pubblicato nel 1971 ed era un metodo di tipo competitivo che utilizzava siero di ratto rachitico come fonte della proteina legante (14). Verso la fine degli anni 70' furono sviluppati alcuni metodi in HPLC e, nel 1984, il primo metodo RIA basato sull'utilizzo di un anticorpo specifico (15).

Successivamente, per superare i problemi legati alla manipolazione dei radioisotopi, furono sviluppati metodi immunometrici a rivelazione enzimatica (EIA, ELISA) ed in chemiluminescenza (CLIA) (16) che, grazie alla progressiva automazione, hanno avuto ampia diffusione nei laboratori clinici.

Questi metodi, peraltro, hanno risentito a lungo di scarsa standardizzazione e pertanto non permettevano la confrontabilità dei risultati ottenuti con metodi diversi e da laboratori diversi.

Per superare queste problematiche, nel 2010, il National Institute of Health (NIH) decise di dare vita al programma di standardizzazione della vitamina D (VDSP) in collaborazione con il National Institute of Standards and Technology (NIST), il Centers for Disease Control and Prevention (CDC), l'Università di Ghent (Belgio), l'American Association for Clinical Chemistry (AACC), l' IFCC, e con programmi di sorveglianza nutrizionale di vari Paesi, inclusi Australia, Canada, Germania, Irlanda, Messico, Corea del Sud, Regno Unito, e USA (17).

Grazie a quest'iniziativa, sono oggi disponibili tre procedure di misura di riferimento (RMP) basate sulla ID-LC-MS/MS e riconosciute dal Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM). Inoltre, è stato sviluppato da parte del NIST, un materiale di riferimento (SRM) 972 e 972a, che rappresenta il secondo elemento fondamentale per la tracciabilità metrologica e la standardizzazione dei metodi di misura.

Le procedure dei metodi di riferimento, peraltro, li rendono non utilizzabili nella pratica clinica per la loro complessità e per i lunghi tempi di risposta ma permettono di ottenere valori di riferimento (target) che, a loro volta, possono essere utilizzati per standardizzare, o meglio ri-standardizzare, i metodi utilizzati nella pratica clinica e rendere i risultati confrontabili.

Il tema della standardizzazione dei metodi ed in particolare l'effetto di quest'ultima sui livelli decisionali, ossia i livelli che identificano la carenza e quelli desiderabili, è di fondamentale importanza anche alla luce delle significative discrepanze fra i risultati degli studi clinici condotti negli scorsi anni in carenza di standardizzazione metodologica.

In particolare, l'effetto della mancata standardizzazione si è dimostrato in grado di modificare significativamente i livelli raccomandati per definire lo stato carenziale e di deficienza.

Ad esempio, Binkley et al., commentando due grandi studi clinici, ossia il The Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1988-1994) e il German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KIGGS, 2003-2006), hanno documentato significative differenze dopo aver rianalizzato i campioni con un metodo standardizzato. Dopo standardizzazione, infatti, la percentuale di valori

di vitamina D inferiori a 30, 50, e 70 nmol/L dello studio KIGGS, passava dal 28 al 47%, dal 13 all'87%, e dal 64 all' 85% rispettivamente; facendo riferimento allo studio NHANES III, la percentuale di valori inferiori a 30, 50 and 75 nmol/L aumentava dal 4% al 6%, dal 22% al 31% e infine dal 55% al 71%, rispettivamente (18). Altri autori hanno riportato simili risultati (19).

Queste significative differenze, pertanto, portano alla conclusione che i livelli finora raccomandati per evidenziare carenza, deficit e tossicità della vitamina D sono inficiati dalla mancata standardizzazione dei metodi con i quali sono stati ottenuti. Di conseguenza, devono essere programmati nuovi studi clinici con validi disegni sperimentali che utilizzino metodi standardizzati per definire in modo accurato i limiti decisionali per carenza, deficienza ed eventualmente tossicità della vitamina D. Sembra inoltre opportuno ribadire che i dati della letteratura degli scorsi anni vanno rivisti alla luce delle precedenti evidenze, ossia delle variazioni correlate alla standardizzazione metodologica.

Per quanto riguarda i metodi da utilizzare nel laboratorio clinico, la scelta fra un metodo immunometrico automatizzato e un metodo in LC-MS/MS dipende da vari fattori quali la numerosità delle richieste, la disponibilità di personale qualificato in tecniche di spettrometria di massa e della strumentazione specifica. In generale, i dati provenienti dai programmi di valutazione esterna di qualità dimostrano un continuo miglioramento delle prestazioni analitiche: i metodi in LC/MS/MS appaiono nel complesso migliori, con bias inferiori verso i metodi di riferimento, ma presentano una maggiore variabilità che riflette le differenze strumentali, di separazione cromatografica e di calibrazione ancora esistenti (20).

I dati più recenti dimostrano che solo il 20% dei laboratori partecipanti a programmi di VEQ utilizza metodi in LC-MS/MS, a sottolineare che i metodi immunometrici automatizzati sono ancora i più utilizzati (10).

Molto recentemente, Herrmann et al. hanno proposto un approccio innovativo per la diagnosi di deficienza funzionale di vitamina D basato sulla determinazione combinata di 25(OH)D e del suo principale catabolita (24,25-diiidrossi vitamina D) per calcolare il cosiddetto rapporto metabolico della vitamina D (VMR). Secondo gli autori del lavoro, il VMR consentirebbe una miglior identificazione dei soggetti con carenza vitaminica, anche perché si associa a valori significativamente più elevati di paratormone (PTH), accelerato metabolismo osseo e mortalità (21). Questi dati, di indubbio interesse, necessitano di ulteriori conferme in studi clinici condotti utilizzando appropriati protocolli sperimentali.

Viceversa, la proposta di determinare la frazione libera della 25(OH)D, dato che circa l'85-90% della quota circolante è legata alla VDBP e il 10-15% all'albumina, si è dimostrata per varie ragioni di scarsa utilità clinica e potrebbe essere riservata solamente a soggetti con condizioni cliniche che alterano significativamente la concentrazione o l'affinità della proteina legante la vitamina D quali cirrosi, gravidanza, malattie infiammatorie acute (22-25).

Vitamina D 1,25 diidrossilata [1,25(OH)$_2$D]

Pur esistendo ampio consenso sull'utilizzo della determinazione della forma biologica 25 idrossilata (25-OH Vitamina D), è noto che la forma biologicamente attiva della vitamina è la 1,25 diidrossilata [1,25(OH)$_2$D]: emerge, quindi, la domanda se e quando la determinazione di quest'ultima forma biologica vada affiancata a quella della 25-OH Vitamina D. La determinazione della 1,25(OH)$_2$D è notevolmente più complicata della 25(OH)D perchè la sua concentrazione nel siero/plasma è notevolmente inferiore. Inoltre, non sono disponibili né materiali di riferimento né una procedura di misura di riferimento.

Il primo metodo di determinazione della 1,25(OH)$_2$D, sviluppato nel 1974, era un metodo di legame radio-recettoriale (26), mentre negli anni successivi sono state sviluppate altre tecniche di determinazione in HPLC, EIA, gas cromatografia-spettrometria di massa ed, infine, LC-MS/MS (27,28). Lo sviluppo di metodi immunometrici automatizzati (29,30) ha modificato significativamente la situazione, rendendo disponibile in molti laboratori clinici la determinazione del vitamero ed i più recenti dati dei programmi di VEQ dimostrano che il 75% dei partecipanti utilizza metodi automatizzati, il 15% metodi immunometrci manuali e solo il 9% tecniche di LC–MS/MS (10). Alcuni metodi immunometrci automatizzati, in particolare quello proposto da DiaSorin ed applicato allo strumento Liaison XL, correlano significativamente con metodi LC-MS/MS, e presentano indubbi vantaggi nella gestione della diagnostica routinaria quali l'elevata produttività ed il risparmio di tempo e risorse umane; il loro sviluppo, pertanto, può ampliare e migliorare l'utilizzo clinico della determinazione della 1,25(OH)$_2$D (30,31).

A differenza della 25(OH)D, non sono stati identificati livelli decisionali e gli intervalli di riferimento differiscono in relazione al metodo utilizzato. Nei soggetti adulti, l'intervallo di valori ottenuto con metodo RIA varia fra 43 e 168 pmol/L, mentre con un metodo immunometrico automatizzato (IDS iSYS) l'intervallo è compreso fra 63 e 228 pmol/L (29), ed ancora con il metodo DiaSorin Liason XL l'intervallo varia fra 77-471 pmol/L nei soggetti di età pediatrica fra 0 e 1 anno, 113-363 pmol/L fra 1 e 3 anni, e 108-246 pmol/L nei bambini con età oltre i 3 anni (32,33). Nei soggetti di etnia africana, inoltre, si sono osservati livelli sierici più elevati di 1,25(OH)$_2$D, che sono stati messi in rapporto con valori più elevati di PTH.

Ad oggi, l'utilità clinica della determinazione di 1,25(OH)$_2$D è scarsamente riconosciuta. La sua concentrazione sierica ha scarsa correlazione con lo status vitaminico ed è invece fortemente regolata dal PTH. Finora, quindi, la sua determinazione è stata ritenuta utile nella valutazione di pazienti con ipercalcemia di natura non nota, nella sarcoidosi, nei casi di pseudo-vitamina D deficienza, nel rachitismo, nell'osteomalacia indotta da tumori, nell'iperparatiroidismo, e nelle situazioni di deficit del citocromo CYP24A1. In aggiunta, la sua determinazione può essere utile nella diagnosi differenziale fra rachitismo fosfopenico FGF23-dipendente (fattore di crescita dei fibroblasti-23) (34).

Valori diminuiti si riscontrano nella malattia renale

cronica (CKD) e nell'iperparatiroidismo, mentre nella sarcoidosi e nella tubercolosi i livelli sierici aumentano (34). Alcuni farmaci riducono i livelli di $1,25(OH)_2D$, inclusi alcuni antimicotici che vengono utilizzati per la terapia dell'ipercalcemia associata a tubercolosi. In gravidanza i livelli circolanti aumentano per l'induzione dell'attività della 1α-idrossilasi che è espressa anche a livello della placenta. Alcune mutazioni genetiche influenzano i livelli di $1,25(OH)_2D$ e causano rare malattie metaboliche dell'osso, inclusi il rachitismo ereditario resistente alla vitamina D (VDR), il rachitismo vitamina D-dipendente di tipo A (CYP7B1), di tipo B (CYP2R1) e l'ipercalcemia idiopatica infantile (CYP24A1). Anche alcune mutazioni della metalloproteasi PHEX sono causa dell'iposfosfatemia X-correlata che è caratterizzata da concentrazioni normali-basse di $1,25(OH)_2D$ (35).Tuttavia, recenti dati sperimentali (36,37) forniscono elementi utili per una possibile revisione delle attuali raccomandazioni sull'utilizzo della sua determinazione e sull'uso combinato di entrambe le forme biologiche in aggiunta a situazioni e condizioni cliniche nelle quali già ora viene suggerita la determinazione di $1,25(OH)_2D$.

Nuove evidenze sperimentali

E' noto che l'idrossilazione di entrambe le forme biologiche (vitamina D2 e vitamina D3) avviene nel fegato grazie all'enzima D-25-idrossilasi (CYP2R1). L' ulteriore idrossilazione nella forma biologicamente attiva, $1,25(OH)_2D$, si riteneva avvenisse solamente a livello renale grazie all'azione della 25-idrossivitamina D-1-α idrossilasi (CYP27B1). Importante sottolineare che questa seconda idrossilazione dipende dai livelli circolanti di PTH, a confermare la complessa regolazione dei meccanismi di formazione delle forme biologiche della vitamina D.

Più recentemente, però, sono state raccolte prove della formazione di vitamina D diidrossilata$1,25(OH)_2D$ non solo a livello renale, ma in molti altri tipi di cellule, incluse le cellule endoteliali, i cardiomiociti, le cellule della muscolatura liscia vascolare, gli astrociti e la microglia.

Queste forme non entrano in circolazione, ma regolano comunque il metabolismo attraverso un'azione paracrina e/o autocrina. In particolare, una recente rassegna riporta le evidenze da numerosi lavori che dimostrano come la seconda idrossilazione ad opera dell'enzima 25-idrossivitamina D-1-α idrossilasi (CYP27B1) avvenga non solamente a livello dei tubuli renali: l'espressione del gene *CYP27B1*, infatti, è stata trovata nelle cellule endoteliali, nelle cellule della muscolatura liscia vascolare, nei cardiomiociti, nei fibroblasti, negli astrociti, nelle cellule epiteliali e nella microglia (36). In particolare, è stato osservato che la 1,25-diidrossivitamina D3 è in grado di proteggere vari tipi di cellule da diversi tipi di stress, ad esempio da perossido di idrogeno, da radiazioni, da elevati livelli di glucosio. Inoltre, ha un effetto anti-fibrotico a livello dei cardiomiociti e fibroblasti. Sulla base di questi dati raccolti recentemente, saranno necessari studi clinici per comprendere meglio se le nuove acquisizioni fisiopatologiche possano portare anche a rivedere ed ampliare gli attuali utilizzi nella pratica clinica e non solo a livello sperimentale. Inoltre, sono stati riportati dati sulla significativa correlazione fra status vitaminico ed epatopatie da acidi grassi e l'effetto della supplementazione con $1,25(OH)_2D$ che ha ridotto significativamente il contenuto in trigliceridi, la perossidazione lipidica e il danno cellulare (37)

Raccomandazioni attuali sulla richiesta e determinazione di $1,25(OH)_2D$

Le raccomandazioni più recenti e accreditate sul tema della determinazione della $1,25(OH)_2D$ sono quelle pubblicate da un gruppo di lavoro della IFCC nel 2021 (38).

Gli autori evidenziano, in premessa, le problematiche analitiche, in particolare la scarsa standardizzazione metodologica, che ne hanno sicuramente frenato l'utilizzo nella pratica clinica. Ad oggi, quindi, la sua determinazione viene suggerita nelle seguenti condizioni:

- ipercalcemia;
- osteomalacia e rachitismo calciopenico;
- diagnosi differenziale di rachitismo fosfopenico mediato o no da FGF23;
- disordini genetici che coinvolgano CYP27B1, il recettore VDR, e la produzione extra renale di $1,25(OH)_2D$;
- ipofosfatemia X-linked;
- patologie rare, quali McCune–Albright syndrome, epidermal nevus syndrome, neurofibromatosi, Jansen metaphyseal chondrodysplasia e rachitismi ipofosfatemici con iperparatiroidismo.

Gli autori, inoltre, suggeriscono di non raccomandare la determinazione di $1,25(OH)_2D$ nel monitoraggio di pazienti con CKD mentre ritengono necessari ulteriori studi per assicurare lo sviluppo di un metodo di riferimento, la standardizzazione dei metodi attualmente disponibili e l'identificazione di appropriati valori di riferimento nei soggetti adulti ed in età pediatrica

In un lavoro più recente, Herrmann M (39) ha identificato le situazioni cliniche più rilevanti nelle quali è indicata la determinazione della forma di-idrossilata e cioè:

- ipercalcemie di natura inspiegabile;
- sarcoidosi e altre malattie granulomatose;
- osteomalacia indotta da tumori;
- iperparatiroidismo primario.

Inoltre, la sua determinazione è importante in condizioni indotte da mutazioni genetiche che determinano un alterato metabolismo della vitamina D e che causano rare malattie del metabolismo osseo quali rachitismo ereditario resistente alla vitamina D, rachitismo vitamina D-dipendente di tipo 1, ipercalcemia infantile idiopatica e ipofosfatemia X-linked. Giustina et al. hanno recentemente confermato l'appropriatezza della determinazione della $1,25(OH_2)D$ nelle situazioni cliniche precedentemente descritte (40).

Pertanto, si ritiene che, vista la disponibilità di metodi validati ed automatizzati, la determinazione di $1,25(OH_2)D$ sia da suggerire in associazione a 25-OH Vitamina D in numerose situazioni cliniche, già citate ed in sintesi:

- nelle forme di ipercalcemia senza immediata spiegazione clinica;
- nell'iperparatiroidismo primario;

- nelle forme di ipovitaminosi non rispondenti alla terapia;
- nella sarcoidosi e nelle malattie granulomatose;
- nelle forme di rachitismo fosfo- e calciopenico;
- nelle situazioni cliniche che possono ipotizzare malattie rare e genetiche correlate al metabolismo della vitamina D.

ABBINAMENTO DELLA DETERMINAZIONE DI 25-OH VITAMINA D E PARATORMONE

Razionale

La fisiopatologia della regolazione del metabolismo calcio-fosforo si è andata arricchendo di informazioni sempre più importanti anche dal punto di vista delle ricadute cliniche e delle prescrizioni di esami diagnostici per una miglior classificazione, indicazione prognostica, guida a terapie mirate e monitoraggio dei pazienti. In particolare, oltre all'evidenza già acquisita da tempo dell'importanza del PTH per trasformare la vitamina D nella forma biologicamente attiva (di-idrossilata), si sono accumulate recenti evidenze dell'importanza del FGF23 nel controllare l'omeostasi di calcio e fosfato in concertazione con il PTH e la forma attiva della vitamina D 1,25(OH_2)D. L'aumento dei valori circolanti dei fosfati e di vitamina D determina la produzione di FGF23 a livello osseo. A sua volta quest'ultimo agisce a livello renale legando i recettori FGF e il co-recettore Klotho per promuovere la clearance dei fosfati (attraverso un aumento della fosfaturia) e la riduzione dei livelli circolanti di 1,25(OH_2)D. La rassegna di Agoro et al. ha riassunto le nuove acquisizioni in modo molto completo (41).

Pertanto, queste nuove acquisizioni, che chiariscono i raffinati e interconnessi meccanismi di regolazione dell'omeostasi calcio-fosforo, e più in generale del metabolismo osseo, sono alla base del razionale della richiesta e della valutazione non solo di uno dei parametri ma di un loro insieme. Nella rassegna già citata, si sottolinea che i disturbi in questione sono molto comuni nella popolazione generale e che fattori genetici, metabolici ed ambientali sono alla base di queste condizioni patologiche

Determinazione abbinata di PTH e vitamina D

Visti i presupposti fisiopatologici, la determinazione abbinata di PTH e vitamina D trova un preciso razionale nell'iter diagnostico sia dell'ipercalcemia che dell'ipocalcemia. Infatti, nell' iperparatiroidismo primitivo, i livelli circolanti di PTH sono più elevati rispetto a quanto ci si attende basandosi unicamente sui livelli di calcio, mentre nelle altre forme di ipercalcemia, i valori di PTH sono bassi. Nell'iperparatiroidismo secondario, invece, i livelli di PTH sono elevati a causa dell'ipocalcemia e/o della deficienza di vitamina D.

La rassegna recente di Smit et al. (42) ha chiarito in modo convincente questa necessità di richiesta combinata di PTH e vitamina D.

Ma è soprattutto nella diagnosi e nel monitoraggio della malattia cronica del rene e disordini dell'osso (Chronic Kidney Disease Mineral and Bone Disorders, CKD-MBD), come emerge nelle linee-guida di Kidney Disease Inproving Global Outcomes (KDIGO) 2017 (43, 44), dove viene raccomandato l'affiancamento degli esami nei vari stadi e più precisamente:

- stadio CKD G3a: PTH, Calcio (Ca), Fosforo (P) e fosfatasi alcalina (ALP) basale, Ca e P ogni 6-12 mesi, PTH per valutare la progressione della malattia;
- stadio CKD G4: monitoraggio ogni 6-12 mesi di PTH e ogni 3-6 mesi di calcio e fosforo;
- CKD G3a-G5D: aggiunta di 25-OH vitamina D e ripetizione con tempistiche dipendenti dallo specifico trattamento terapeutico e da evidenze di progressione di malattia. In questi pazienti, viene anche raccomandata la determinazione dei marcatori di sintesi del collageno (Propeptide C-terminale del collagene di tipo I, PINP) e di degradazione (Telopeptide C-terminale del collagene di tipo I, CTx) solamente in casi particolari.

Un aspetto fondamentale per sottolineare ulteriormente la necessità in numerose situazioni cliniche di abbinare la richiesta di vitamina D e PTH è l'evidenza che gli intervalli di riferimento del PTH risentono fortemente dei valori circolanti di vitamina D e i lavori della letteratura dimostrano che l'intervallo di riferimento del PTH, escludendo i soggetti con deficit vitaminico D, è inferiore del 20% circa rispetto ai valori ottenuti in una popolazione in cui la presenza di ipovitaminosi D non era stata determinata. Numerosi lavori confermano questa osservazione tanto da inserirla nella più recente rassegna sul PTH (42). E' inoltre dimostrato che i livelli di PTH sono più elevati nei soggetti di etnia afroamericana e pelle scura rispetto ai bianchi, sono correlati con l'indice di massa corporea e aumentano con l'età per la riduzione del volume di filtrato glomerulare nei soggetti con età superiore ai 60 anni.

Paratormone di terza generazione (PTH 1-84)

La letteratura corrente e le linee-guida suggeriscono di abbandonare i metodi di prima generazione, mentre ritengono che i metodi di seconda generazione possano ancora essere utilizzati e questo specialmente perché fanno riferimento all'evidenza che i metodi di terza generazione - fino ad alcuni anni fa - erano meno diffusi a livello internazionale. In altri termini, le linee-guida non hanno ancora preso in considerazione i vantaggi dei metodi di terza generazione semplicemente perché non sono state aggiornate sulla base dei lavori di letteratura più recenti.

Dal punto di vista analitico, i vantaggi dei metodi di terza generazione (più dettagliatamente del metodo Liaison 1-84 PTH), sono stati evidenziati sia in termini di minor variabilità tra matrici (in particolare siero e plasma EDTA), sia di minor interferenza e cross-reattività con frammenti 7-84. Nello lavoro di Valcour et al. i vantaggi dal punto di vista clinico sono stati valutati in una popolazione di 1 533 pazienti emodializzati. Le differenze fra metodi evidenziano l'importanza di determinare la molecola attiva di PTH con metodi di terza generazione perché la risposta alla terapia risulta più correlata con la clinica (45). Nello stesso lavoro, gli autori sottolineano un altro importante aspetto metodologico e cioè che solo i metodi di terza generazione sono in grado di determinare

la forma N-terminale del PTH che, oggi si ritiene abbia attività biologica.

Nel caso di CKD, vi è chiara evidenza che i metodi di terza generazione forniscono valori di PTH di circa 50% (45-47%) inferiori rispetto a quelli di seconda generazione con differenze intra-individuali di 4,2 volte, poiché non risentono dell'interferenza degli amminoacidi 12-24 e 26-32 (residui N-terminali) (46,47). Anche la raccomandazione nelle linee-guida KDIGO (43) di mantenere i livelli di PTH nell'intervallo fra 2-9 volte il limite superiore della norma (URL) risentiva chiaramente dell'utilizzo di metodi di seconda generazione e della mancanza di comparabilità dei risultati fra metodi immunometrici dovuta alla carente standardizzazione.

Dal punto di vista della pratica clinica, molti laboratori clinici in ambito accademico hanno adottato da tempo i metodi di terza generazione per la determinazione del PTH nella routine clinica con significative evidenze di beneficio clinico (48-50).

L'evidenza più significativa a supporto dell'utilizzo di metodi di terza generazione, è sicuramente la determinazione in corso di paratiroidectomia. La motivazione è la più rapida discesa dei valori di PTH dopo intervento chirurgico di paratiroidectomia nel caso di determinazione con metodi di terza generazione, mentre quelli di seconda generazione presentano un'emivita più lunga a causa dei residui C-terminali che vengono riconosciuti dal metodo (51,52). Pertanto, questo indubbio vantaggio permette al chirurgo una valutazione più rapida ed efficace della riuscita dell'intervento. Le differenze sono più significative nei pazienti con iperparatiroidismo secondario rispetto al primario, con una diminuzione dei valori superiore al 50% rispetto al valore basale (preoperatorio) dopo 10 minuti, mentre sarebbero necessari almeno 5-10 minuti ulteriori con metodi di seconda generazione (51,52). Entrambi i lavori sono citati nella rassegna di più recente pubblicazione (42).

Fibroblast Growth Factor23 (FGF23)

La scoperta, avvenuta nel 2003, che alcune mutazioni a livello genetico o l'eccessiva produzione di FGF23 causa alcune rare patologie, inclusi il rachitismo ipofosfatemico resistente alla vitamina D e l'osteomalacia indotta da tumori, ha stimolato numerosi studi volti a meglio caratterizzare la biologia di questo fattore di crescita e il suo ruolo in numerose condizioni fisiopatologiche (53). La principale funzione dell'FGF23 è di un ormone che orchestra l'omeostasi di calcio e fosfati assieme al PTH e all'1,25-diidrossivitamina D. Per esercitare la sua azione, l'FGF23 necessita della proteina transmembrana chiamata Klotho e, in effetti, l'omeostasi dei fosfati è regolata dal sistema FGF23/Klotho (54).

Lo sviluppo di metodi di determinazione dell'FGF23 ha progressivamente aumentato l'interesse clinico per la comprensione del suo ruolo in numerose patologie, inizialmente limitate alla CKD. In particolare, numerosi lavori hanno dimostrato il suo ruolo di fattore di rischio e prognostico nelle malattie cardiovascolari, ed in particolare sia nell'infarto acuto del miocardio che nello scompenso cardiaco (associando la riduzione dei livelli di FGF-23 a seguito della terapia ad un più basso tasso di eventi cardiovascolari avversi) (55,56), come pure nella regolazione dell'eritropoiesi (57). La determinazione dell'FGF23 si avvale di due metodi che valutano la molecola intatta (iFGF23) e la quota C-terminale (cFGF23). Il primo metodo ad essere sviluppato, che si avvale di due anticorpi capaci di riconoscere due epitopi a livello della frazione C-terminale distale rispetto al sito di clivaggio, in realtà riconosce sia la molecola intera che i frammenti C-terminali, mentre l'iFGF23 riconosce solamente la molecola intera (58). La determinazione di entrambe le forme biologiche ed il calcolo del rapporto iFGF23/cFGF23 è stata proposta come "*biopsia liquida per la dinamica dell'FGF23*", ossia il bilancio con un metodo non-invasivo fra trascrizione e clivaggio della molecola (57). Poiché l'asse FGF23/Klotho rappresenta un obiettivo terapeutico per terapie innovative e per la prevenzione terziaria nella CKD, la determinazione dei livelli circolanti appare sempre più importante e la progressiva introduzione nella routine clinica va incoraggiata e sostenuta attraverso ulteriori lavori scientifici e raccomandazioni sugli aspetti pre-analitici, su appropriati valori di riferimento e criteri interpretativi, così declinando nella pratica i principi della ricerca traslazionale (59).

Biomarcatori ossei nella malattia renale cronica: recenti acquisizioni

Le alterazioni del metabolismo minerale e osseo si verificano precocemente nel corso di CKD e consistono nella genesi e nello sviluppo dell'iperparatiroidismo (IPT), che oltre al coinvolgimento del PTH vede un ruolo fondamentale dell'asse Klotho/FGF-23/-FGF receptor (FGFR). L'insorgenza della CKD, già nelle fasi iniziali, evidenzia l'aumento di FGF-23 conseguente alla ritenzione di fosfato, poichè quest'ultimo esercita un effetto fosfaturico tubulare, attraverso il suo legame col complesso recettoriale α-Klotho-FGFR (α-Klotho è una proteina transmembrana espressa in molti tessuti e in particolare nel tubulo convoluto distale del rene e nelle cellule del capo paratiroideo) (59). Un altro effetto dell'aumento di FGF-23, principalmente legato alla ritenzione di fosfato, è la riduzione dell'espressione e dell'attività della 1 α-idrossilasi nelle cellule tubulari renali, con conseguente diminuzione della produzione di $1,25(OH)_2D$ (calcitriolo) a partire da 25(OH)D (50,60). La minore azione del calcitriolo sul recettore VDR induce una riduzione dell'assorbimento del calcio a livello intestinale e una diminuzione del calcio sierico, che stimola la sintesi e il rilascio di PTH (59). Questi meccanismi di compensazione hanno la funzione di normalizzare il calcio sierico stimolando la 1α-idrossilasi e aumentando in tal modo il turnover e il riassorbimento osseo (61). La persistenza di anomalie del metabolismo del calcio e del fosfato, e la riduzione della risposta ossea al PTH

rendono inefficace questa compensazione e favoriscono la progressione dell'IPT secondario (sIPT) (62). Tutte queste alterazioni del metabolismo osseo nella CKD contribuiscono a complicanze ossee rappresentate dalle varie forme di osteodistrofia renale (ROD) e aumentata fragilità scheletrica (63). Quest'ultima, per quanto riguarda le fratture d'anca, tipicamente rappresentative del danno corticale nella CKD, si manifesta già con un filtrato glomerulare (VFG) inferiore a 60 mL/min per arrivare ad un aumento maggiore anche a 4 volte nel paziente in emodialisi (64). Sorprendentemente, pazienti più giovani con CKD (<65 anni) hanno un rischio relativo (RR) di fratture dell'anca quasi 8 volte maggiore rispetto ai più anziani (65). Le fratture vertebrali (FV), hanno una prevalenza tra il 20-25%, simile a quella della popolazione generale (essendo interessato maggiormente l'osso trabecolare) che può raggiungere circa il 60% quando la valutazione viene effettuata con metodo morfometrico quantitativo (66). L'importanza della diagnosi di FV è legata alla loro elevata associazione con le calcificazioni vascolari (CV) (66) e la mortalità (67). Una delle sfide più importanti per i pazienti affetti da CKD, con una o più fratture da fragilità, è determinare se il paziente è affetto da osteoporosi e/o dalle varie forme di patologie osteoarticolari (OR) per poter scegliere il miglior approccio terapeutico. In tale contesto, i dati emergenti suggeriscono che i marcatori del turnover osseo (BTM) potrebbero essere utilizzati come surrogato o come aggiunta alla biopsia ossea per la valutazione del turnover osseo (68). I BTM riflettono l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti: in particolare, i primi secernono le proteine della matrice ossea che formano la matrice organica dell'osso, o osteoide. La produzione dell'osteoide da parte degli osteoblasti si riflette nella produzione di fosfatasi alcalina ossea (ALP ossea), osteocalcina (OC) e propeptide N-Terminale del procollagene tipo I (PINP) (68). La rimozione della matrice organica ossea in seguito alla digestione enzimatica, si riflette nella produzione di frammenti di degradazione del collagene di tipo I, N- e C-telopeptidi (NTX e CTX) e nel rilascio di enzimi dagli osteoclasti quali la fosfatasi acida tartrato-resistente di tipo 5 b (TRAP5b) (69). Salam et al. hanno valutato se i biomarcatori ossei possono predire lo stato del turnover osseo determinato mediante istomorfometria (biopsia ossea) in 69 pazienti con insufficienza renale cronica (IRC) agli stadi 4-5, inclusi pazienti in dialisi (70). Le curve ROC, per i marcatori di ridotto turnover osseo risultavano: ALP ossea (0,82), PINP (0,79) e TRAP5b (0,80) significativamente migliori del PTH (0,61). Viceversa, nella condizione di elevato turnover osseo il PTH presentava valori di ROC del tutto sovrapponibili a quelle dei BTM (0,76). In uno studio simile, Jorgensen et al. (71), condotto in 80 pazienti con IRC agli stadi 4-5 e 119 pazienti trapiantati di rene sottoposti a biopsia, hanno dimostrato che la capacità discriminatoria era buona sia per basso che per elevato turnover osseo, con un'area sotto la curva (AUC) superiori a 0,80 per ALP ossea, PINP, TRAP5b. I pochi studi prospettici sull'evento di frattura nei pazienti con IRC hanno dimostrato che il miglior predittore di frattura ossea è la fosfatasi alcalina (ALP) (72). Maruyama et al., analizzando i dati del registro giapponese di pazienti in dialisi, hanno dimostrato che in 185 277 pazienti, i livelli di ALP erano indipendentemente associati alla mortalità e all'incidenza di fratture dell'anca (73). Allo stesso modo, Iimori et al. hanno dimostrato, in uno studio di coorte in un singolo centro su 485 pazienti in dialisi, che la ALP era un indicatore utile per predire il rischio di frattura (AUC=0,766, p<0,0001) (74).Tutti questi risultati hanno portato, durante il recente meeting KDIGO "Controversies Conference on Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder", tenutosi a Settembre 2023 a Madrid, a considerare per il futuro, non solo i livelli di PTH ma un insieme di biomarcatori e BTM (75), come indicato in Tabella 1.

Tabella 1
Marcatori di turnover osseo nelle fratture di femore

	Elevato turnover		Basso turnover		Fratture di femore
	Salam (70)	Jorgensen (71)	Salam (70)	Jorgensen (71)	Marujama (73)**, Iimori (74)***
iPTH (ng/L)*	>327	>143,5	<183	<90,5	
Total ALP (U/L)	>102	>97	<88	<87	>405**
B ALP (mg/L)	>31	>33,7	<21	<24,2	>27,4 (18,2-38,7)***
Intact PINP (ng/L)	>107	>120,7	<57	49,8	
TRAP5b (U/L)	>4,6	>5,05	<4,6	<3,44	

**Intervalli di riferimento di iPTH: Salam 10-45 ng/L; Jorgensen 3-40 ng/L.*
iPTH: paratormone, molecola intatta; Total ALP: fosfatasi alcalina totale; B-ALP: fosfatasi alcalina ossea; Intact PINP: peptide N-terminale del procollagene di tipo I, molecola intatta; TRAP5b: fosfatasi acida tartrato resistente 5.

VITAMINA D: PRESCRIVIBILITA' SVINCOLATA DALLA RIMBORSABILITA' E DAL VALORE DI 30 nmo/L (12 ng/mL)

La nota AIFA 96, introdotta inizialmente nel 2019 ed aggiornata nel febbraio 2023 (6), sulla base dell'aumento generalizzato ed in parte inappropriato delle richieste di esami di laboratorio per la determinazione della vitamina D, e più specificamente di uno dei vitameri, la forma 25-(OH)D, è stata pensata per regolamentare la rimborsabilità, ma di fatto anche la prescrizione della supplementazione vitaminica, e, anche se non appare come obiettivo primario, la richiesta di determinazione della vitamina D.

A fronte dell'aggiornamento intervenuto a febbraio 2023, peraltro, non esistono dati ufficiali sull'effetto della nota in termini di andamento delle prescrizioni dell'esame nel nostro Paese, a testimonianza dell'incapacità di verificare gli effetti di interventi da parte di Enti come AIFA sui comportamenti nel mondo reale.

Il fatto che la nota AIFA non raccomandi lo screening, ossia la richiesta generalizzata sulla popolazione dei valori di 25(OH)D, appare basato su una serie di lavori scientifici pubblicati negli ultimi anni (76,77) e di campagne quali "choosingwisely" (https://www.choosingwisely.org) che iniziata nel 2012 ha ricevuto interesse, ma anche numerose critiche sulle evidenze scientifiche che l'hanno ispirata, ed in particolare sulla lista di esami di laboratorio definiti inappropriati che vedeva al primo posto proprio la vitamina D.

Peraltro, altre linee guida, quali quelle della Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS) rilasciate nel 2022 (78) concordano nel *"non raccomandare lo screening dei livelli di vitamina 25-(OH)D nella popolazione generale per mancanza di evidenze di rapporto costo/beneficio favorevole".*

La nota AIFA del 2019 è stata oggetto di commenti e critiche da parte di varie organizzazioni e società scientifiche, ed in particolare di un documento congiunto di Società Scientifiche della medicina di laboratorio e della clinica che ha messo in rilievo sia problematiche analitiche che cliniche (79).

In particolare, dal punto di vista prettamente analitico le critiche sono essenzialmente:

- l'evidenza che la standardizzazione dei metodi utilizzati dai laboratori clinici è modesta, soprattutto prima della identificazione di un metodo di riferimento e dei lavori che dimostrano la necessità di ricalibrare i metodi commerciali ed evitare che il bias rispetto al metodo di riferimento determini significative differenze nei risultati che si possono riflettere nell'inadeguatezza rispetto ai livelli decisionali raccomandati
- la non uniformità delle unità di misura che, anche nella nota AIFA, si traducono nell'identificazione di due diverse unità di misura, con le conseguenti possibili fonti di errore e confusione
- la nota AIFA stabiliva un valore soglia unico (50 nmol/L; 20 ng/mL) legato alla rimborsabilità, mentre i laboratori clinici utilizzavano livelli diversi e più vicini a quelli raccomandati dall'Endocrine Society, ad esempio 75 nmol/L (30 ng/mL) (6).

Nella nuova versione della nota 96 (febbraio 2023) 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 e soggetti che hanno diritto alla rimborsabilità solo in relazione ai livelli ematici di 25-(OH)D.

Al primo gruppo appartengono:

- persone istituzionalizzate;
- persone con gravi deficit motori o allettate che vivono al proprio domicilio;
- donne in gravidanza o allattamento;
- persone affette da osteoporosi da qualsiasi causa non candidate a terapia remineralizzante.

Nel secondo gruppo, si individuano diversi valori soglia di intervento terapeutico:

- persone con valori sierici di 25-(OH)D <30 nmol/L (12 ng/mL) e sintomi attribuibili a ipovitaminosi;
- persone asintomatiche con rilievo occasionale di 25-(OH)D <30 nmol/L (12 ng/mL);
- persone con livelli <50 nmol/L (20 ng/mL) in terapia di lunga durata con farmaci interferenti con il metabolismo della vitamina D;
- persone adulte affette da malassorbimento con livelli <50 nmol/L (20 ng/mL);
- pazienti con diagnosi di iperparatiroidismo primitivo o secondario con valori <75 nmol/L (30 ng/mL);
- pazienti affetti da osteoporosi da qualsiasi causa o altre osteopatie candidate a terapia remineralizzante con valori <75 nmol/L (30 ng/mL);

Secondo la SIOMMMS, la revisione della nota presenta alcune criticità che possono essere così sintetizzate: vengono considerati livelli decisionali che, alla luce di evidenze scientifiche, appaiono discutibili, se non sbagliati e si condiziona la rimborsabilità della supplementazione alla misura dei livelli di vitamina D anche in casi e categorie di soggetti che non necessiterebbero dell'esame di laboratorio.

Per quanto riguarda il primo punto, i livelli decisionali raccomandati da numerose organizzazioni scientifiche e in particolare nel nostro Paese da SIOMMMS, non sono totalmente coincidenti con quelli della nota AIFA.

I livelli raccomandati da SIOMMMS, e che quindi i laboratori clinici dovrebbero riportare nel referto sono:

- <30 nmol/L stato carenziale;
- 30-50 nmol/L insufficienza;
- 50-125 nmol/L adeguatezza;
- 75-125 nmol/L valori ottimali in pazienti affetti da osteoporosi o con condizioni cliniche a rischio di ipovitaminosi D;
- >250 nmol/L eccesso.

Dal punto di vista metodologico, la nota AIFA si basa sostanzialmente sui risultati di due ampi studi clinici randomizzati, lo studio americano VITAL (76) e lo studio europeo DO-HEALTH (77). In entrambi gli studi la supplementazione con dosi di vitamina D non ha dimostrato di prevenire l'evento fratturativo, e per tale motivo la prescrivibilità ai fini della rimborsabilità è stata ridotta da 50 a 30 nmol/L (da 20 a 12 ng/mL) del livello di vitamina 25(OH)D circolante, in presenza o meno di sintomatologia specifica e in assenza di altre condizioni di rischio associate. Tuttavia, entrambi gli studi già citati, presentano significative limitazioni. Nel

primo studio, LeBoff et al., hanno testato l'ipotesi che l'integrazione di vitamina D3 possa ridurre il rischio di fratture rispetto al placebo. I partecipanti a questo studio non sono stati, tuttavia, arruolati sulla base di carenza di vitamina D [livello medio di vitamina D 75 nmol/L (30 ng/mL)], bassa massa ossea o osteoporosi. Gli endpoint primari erano le fratture totali, non vertebrali e dell'anca, riportate dai partecipanti e convalidate da un comitato scientifico indipendente. La vitamina D3 supplementare, rispetto al placebo, non ha mostrato un effetto significativo sulle fratture totali (p=0,70), sulle fratture non vertebrali (p=0,50) o sulle fratture dell'anca (p =0,96). In un sottogruppo di 16 757 partecipanti su 25 871 (circa il 65%), erano disponibili anche le concentrazioni basali di 25(OH)D. Le concentrazioni medie (SD) di 25(OH)D erano 76,6 (25) nmol/L ([30,7 (10) ng/mL] e l'87% dei pazienti aveva livelli di 25(OH)D >50 nmol/L (20 ng/mL) (76). Ciò vuol dire che circa 9 pazienti su 10 arruolati in questo studio ancillare del VITAL avevano una concentrazione di 25(OH)D >50 nmol/L (20 ng/mL), un valore soglia oltre il quale, sulla base di considerazioni epidemiologiche, non era da attendersi alcun beneficio da parte della supplementazione sul tasso di incidenza di fratture (76). Lo stesso bias relativo ai livelli di vitamina D lo si riscontra anche nell'altro studio considerato dall'AIFA (77). Tripepi et al. dopo un'esaustiva analisi degli studi presi in considerazione da AIFA per stendere la determina, sottolineano come sia di cruciale importanza indagare l'effetto della supplementazione con vitamina D sugli esiti clinici in un intervallo di valori di 25(OH)D all'interno dei quali sia almeno presumibile, sulla base di studi osservazionali di ampio respiro, un effetto benefico della medesima supplementazione. In altre parole è necessario che la ricerca eziologica, orientata all'analisi dei rapporti di causa-effetto tramite studi interventistici, mantenga una coerenza tra la sua componente osservazionale e quella sperimentale (80).

Per quanto riguarda i valori da eccesso, la nota AIFA 96, sulla base di due soli studi (76,77), afferma che valori di 25-(OH)D >112 nmol/L (45 ng/mL) risultano associati a un progressivo aumento del rischio di eventi avversi, inclusa la mortalità. Studi più recenti documentano invece una progressiva riduzione della mortalità al crescere dei livelli ematici di 25-(OH)D fino a circa 50 nmol/L (20 ng/mL), con successivo "steady state" fino a valori di 125 nmol/L (60 ng/mL), ma senza che si individuino valori soglia associati a rischio di mortalità per diverse cause (81). Il più recente studio prospettico di Takacs et al. non ha riscontrato alcun aumento del rischio di cadute, eventi avversi, ipercalcemia e alterazioni del metabolismo osseo fino a valori di 150 nmol/L (60 ng/mL) (82).

Anche il riscontro di un supposto rischio di carcinoma prostatico e pancreatico per valori >100 nmol/L (40 ng/mL), segnalato dalla nota AIFA 96, non è stato confermato in studi più recenti che, invece, dimostrano una riduzione del rischio di incidenza di neoplasia metastatica e mortalità per neoplasia per gli stessi valori ematici (<100 nmol/L; 40 ng/mL) (83,84).

Per quanto riguarda il secondo punto, le linee guida SIOMMMS considerano soggetti a rischio di ipovitaminosi anche:

- soggetti obesi;
- persone con condizioni associate a ridotta esposizione solare;
- pazienti affetti da anoressia nervosa, insufficienza renale cronica, diabete mellito tipo 2 e fibrosi cistica;
- pazienti affetti da neoplasie.

Pertanto le linee guida SIOMMMS ritengono comunque mandatoria la supplementazione con vitamina D in tutte queste categorie di soggetti/pazienti, a prescindere dai valori ematici della vitamina stessa; tuttavia ne raccomandano la misura quando "i*ndispensabile per la gestione clinica del paziente, ad esempio per la diagnosi differenziale o dopo aver iniziato la supplementazione per accertare il raggiungimento di valori ottimali a distanza di 3-6 mesi*".

Pertanto, la determina AIFA, anche nella revisione del Febbraio 2023, non appare allineata con le evidenze scientifiche più recenti, né per quanto riguarda la necessità di supplementazione in varie categorie di soggetti/pazienti, di fatto riducendo la fascia di popolazione che deve trarre vantaggio dalla supplementazione, né per quanto riguarda l'appropriatezza della richiesta di determinazione del vitamero 25-(OH)-D. La Tabella 2 riporta le popolazioni a rischio di deficit di vitamina D definite in una recente Conferenza di Consenso sulla base di un approccio clinico (40).

Tabella 2

Soggetti a rischio di deficit di vitamina D su base clinica (da rif. 40, modificato)

Anziani
Soggetti allettati:
- affetti da disabilità;
- ricoverati in istituzioni sanitarie.
Soggetti costretti a lavorare a lungo all'interno:
- impiegati in uffici;
- lavoratori di fabbriche e magazzini;
- tassisti;
- lavoratori notturni.
Soggetti con pelle scura
Soggetti con bassi livelli di attività fisica
Soggetti con patologie croniche/debilitanti:
- diabete;
- malattia renale cornica;
- sindromi gastrointestinali da malassorbimento;
- malattie delle paratiroidi;
- epatopatie.
Obesità, in particolare con livelli molto elevati di Massa Corporea (BMI)
Pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica
Soggetti che assumono farmaci capaci di aumentare il catabolismo della Vitamina D:
- Fenobarbital;
- Carbamazepina;
- Desametazone;
- Rifampicina;
- Sironolattone;
- Nifedipina;
- Ritonavir;
- Ciproterone acetato.
Bambini di madre affetta da deficit di vitamina D

Quando è indicata la richiesta e la determinazione della 25-(OH)D?

In primis, devono essere chiaramente identificati alcuni cardini e requisiti per rendere appropriata la determinazione della vitamina D, che non appaiono chiaramente nella Determina AIFA:

- vista la variabilità dei livelli vitaminici legati alla stagionalità, la valutazione dello status vitaminico va raccomandata nel periodo che intercorre fra la fine della stagione invernale e l'inizio dell'estate.
- i risultati ottenuti dai laboratori clinici sia che vengano eseguiti con metodi immunometrici che con metodi in LC-MS presentano un bias rispetto al metodo di riferimento. L'incertezza di misura, che può essere ragionevolmente proposta, è di considerare una variabilità pari al 10% rispetto al valore refertato. Quest'aspetto, peraltro, è particolarmente importante quando il valore sia prossimo al livello decisionale, in particolare al livello che identifica la "carenza", ossia un valore <30 nmol/L (12 ng/mL).
- infine, si ritiene di confermare la raccomandazione di armonizzare le unità di misura identificando nelle nmol/L l'unità di misura metrologicamente più corretta e più adottata a livello internazionale.

Ma quando è appropriata la richiesta di determinazione della vitamina D?

Il punto totalmente carente nella Nota AIFA è che non si chiarisce come sia assolutamente indicata la richiesta e la determinazione dell'esame di laboratorio, ovviamente, nei casi nei quali la supplementazione è "autorizzata" sulla base del valore ematico della vitamina stessa, ma anche nei casi nei quali la supplementazione è raccomandata per appartenenza ad una delle categorie e situazioni cliniche precedentemente illustrate. In queste situazioni la determinazione a distanza di 2-6 mesi dall'inizio della supplementazione è necessaria per verificare l'ottenimento di livelli adeguati.

Infatti, la letteratura è assolutamente concorde nell'indicare che l'efficacia della supplementazione è obiettivabile solo con il riscontro dell'aumento dei valori ematici di 25(OH)D fino al raggiungimento di livelli appropriati (>75 nmol/L; 30 ng/mL) (40). Inoltre, la determinazione è opportuna per verificare la compliance dei pazienti rispetto all'indicazione terapeutica, che come noto è ancor più problematica in fasce di età senile e in pazienti fragili in politerapia.

In definitiva, la determinazione della vitamina D appare appropriata e raccomandata:

- in tutti i casi di sospetto clinico di osteomalacia (conferma dell'ipotesi diagnostica e/o diagnosi differenziale) e va ripetuta a distanza di 3-6 mesi; in tutti i casi di sospetto iperparatiroidismo, sia primario che secondario, e nei pazienti diagnosticati per questa condizione morbosa; nei pazienti con insufficienza renale cronica per la valutazione ed il monitoraggio delle malattie renali croniche con disturbi del metabolismo minerale e osseo (CKD-MBD);
- nei soggetti di età pediatrica con fattori di rischio per deficit, con ritardi nella crescita e nel caso di lunghi periodi di ospedalizzazione/istituzionalizzazione.

E' da segnalare, inoltre che una rassegna pubblicata recentemente, e che riassume le problematiche analitiche e le ricadute cliniche della determinazione della vitamina, alla luce delle problematiche tuttora aperte, conclude suggerendo l'importanza di ulteriori studi sulla supplementazione che siano effettuati utilizzando metodi standardizzati ed arruolando solamente pazienti con deficit di vitamina D (85).

In relazione alla popolazione generale, si ritiene corretta e condivisibile l'indicazione riportata in un documento intersocietario che indica nel valore di 50 nmol/L (20 ng/mL) la condizione di adeguatezza (86).

CONFLITTO DI INTERESSE

Nessuno

RICONOSCIMENTI

Il Documento ha ricevuto il riconoscimento delle Società Italiane di laboratorio SIBioC ed ELAS, del Gruppo Italiano Bone Interdisciplinary Specialist (GIBIS) e della Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS).

BIBLIOGRAFIA

1. Giuliani S, Barbieri V, Di Pierro AM, Rossi F, Widmann T, Lucchiari M et al. LC-MS/MS based 25(OH)D status in a large Southern European outpatient cohort: gender- and age-specific differences. Eur J Nutr 2019;58:2511-20.
2. Stoica AB, Mărginean C. The impact of vitamin D deficiency on infants' health. Nutrients 2023;15:4379.
3. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. Physiol Rev 2016;96:365-408,
4. Pilkey NG, Novosel O, Roy A, Wilson TE, Sharma J, Khan S et al. Does native vitamin D supplementation have pleiotropic effects in patients with End-Stage Kidney Disease? A systematic review of randomized Trials. Nutrients 2023;15:3072.,
5. Cosentino N, Campodonico J, Milazzo V. Vitamin D and cardiovascular disease: current evidence and future perspectives. Nutrients 2021;13:3603.
6. 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. (ultimo accesso: maggio 2024)
7. Holick MF. The use and interpretation of assays for vitamin D and its metabolites. J Nutr 1990;120 Suppl 11:1464-9.
8. Lips P. Relative value of 25(OH)D and 1,25$(OH)_2$D measurements. J Bone Miner Res 2007;22:1668-71.
9. Amrein K, Scherkl M, Hoffmann M, Neuwersch-Sommeregger S, Köstenberger M, Tmava Berisha A, et al. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. Eur J Clin Nutr 2020;74:1498-513.
10. Alonso N, Zelzer S, Eibinger G, Herrmann M. Vitamin D metabolites: analytical challenges and clinical relevance. Calcif Tissue Int 2023;112:158-77.
11. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance

characteristics and limitations. Steroids 2010;75:477-88.
12. Altieri B, Cavalier E, Bhattoa HP, Pérez-López FR, López-Baena MT, Pérez-Roncero GR et al. Vitamin D testing: advantages and limits of the current assays. Eur J Clin Nutr 2020;74:231-47.
13. Bikle DD. Vitamin D assays. Front Horm Res 2018;50:14-30.
14. Belsey R, DeLuca HF, Potts Jr JT Competitive binding assay for vitamin D and 25-OH vitamin D. J. Clin. Endocrinol Metab 1971;33:554-7.
15. Bouillon R, Van Heck E, Jans I, Tan BK, Van Baelen H, De Moor P. Two direct (nonchromatographic) assays for 25-hydroxyvitamin D. Clin Chem 1984;30:1731-6.
16. Le Goff C, Cavalier E, Souberbielle JC, González-Antuña A, Delvin E. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D: a historical review. Pract Lab Med 2015;12:1-14.
17. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vitamin D Stardardization-Certification Program (VDSCP). Accessed April 24, 2024. https://www.cdc.gov/labstandards/csp/vdscp_procedures.htlm (ultimo accesso: maggio 2024)
18. Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, Thamm M, Tian L, Merkel JM,et al. Vitamin D measurement standardization: The way out of the chaos. J Steroid Biochem Mol Biol 2017;173:117-21.
19. Durazo-Arvizu RA, Tian L, Brooks SPJ, Sarafin K, Cashman KD, Kiely M et al. The Vitamin D standardization program (VDSP) manual for retrospective laboratory standardization of serum 25-Hydroxyvitamin D data. J AOAC Int 2017;100:1234-43.
20. Briggs LE, Whitewood JK, Williams EL. Analytical variation concerning total 25-hydroxyvitamin D measurement, where are we now? A DEQAS review of current assay performance J Steroid Biochem Mol Biol 2023;231:106328.
21. Herrmann M, Zelzer S, Cavalier E, Kleber M, Drexler-Helmberg C, Schlenke P et al. Functional assessment of vitamin D status by a novel metabolic approach: the low vitamin D profile concept. Clin Chem 2023;69:1307-16.
22. Schwartz JB, Gallagher JC, Jorde R, Berg V, Walsh J , Eastell R et al. Determination of free 25(OH)D concentrations and their relationships to total 25(OH)D in multiple clinical populations. J Clin Endocrinol Metab 2018;103:3278-88.
23. Nielson CM, Jones KS, Bouillon R, Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Group. Role of assay type in determining free 25-hydroxyvitamin D levels in diverse populations. N Engl J Med 2016;374:1695-6.
24. Nielson CM, Jones KS, Chun RF, Jacobs JM, Wang Y, Hewison Met al. Free 25-hydroxyvitamin D: impact of vitamin D binding protein assays on racial-genotypic associations. J Clin Endocrinol Metab 2016;101:2226-34.
25. El Sabeh M, Ghanem P, Al-Shaar L, Rahme M, Baddoura R, Halaby G et al. Total, bioavailable, and free 25(OH) D relationship with indices of bone health in elderly: a randomized controlled trial. J Clin Endocrinol Metab 2021;106:e990-e1001.
26. Brumbaugh PF, Haussler DH, Bressler R, Haussler MR. Radioreceptor assay for 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. Science1974;183:1089–91.
27. Tsugawa N, Okano T. Bone and bone related biochemical examinations. Hormone and hormone related substances. Vitamin D (25D, 1,25D); measurements and clinical significances. Clin Calcium 2006;16:36–42.
28. Hollis BW, Horst RL The assessment of circulating 25(OH) D and 1,25$(OH)_2$D: where we are and where we are going. J Steroid Biochem Mol Biol 2007;103:473-6.
29. Hussein H, Ibrahim F, Boudou P Evaluation of a new automated assay for the measurement of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D levels in daily practice. Clin Biochem 2015; 48:1160– 2.
30. Valcour A, Zierold C, Podgorski AL, Olson GT, Wall JV, DeLuca HF et al. A novel, fully-automated, chemiluminescent assay for the detection of 1,25-dihydroxyvitamin D in biological samples. J Steroid Biochem Mol Biol 2016; 164:120–6.
31. Spanaus K, von Eckardstein A. Evaluation of two fully automated immunoassay based tests for the measurement of 1α,25-dihydroxyvitamin D in human serum and comparison with LC-MS/MS. Clin Chem Lab Med 2017;55:1305-14.
32. Higgins V, Truong D, White-Al Habeeb NMA, Fung AWS, Hoffman B, Adeli K. Pediatric reference intervals for 1,25-dihydroxyvitamin D using the DiaSorin LIAISON XL assay in the healthy CALIPER cohort. Clin Chem Lab Med 2018; 56:964–72.
33. Souberbielle JC, Cavalier E, Delanaye P, Massart C, Brailly-Tabard S, Cormier C, et al. Serum calcitriol concentrations measured with a new direct automated assay in a large population of adult healthy subjects and in various clinical situations. Clin Chim Acta 2015;451:149-53.
34. Adams JS, Hewison M. Extrarenal expression of the 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase. Arch Biochem Biophys 2012;523:95-102.
35. Goltzman D. Functions of vitamin D in bone. Histochem Cell Biol 2018;149:305–12.
36. Janubová M, Žitňanová I. The effects of vitamin D on different types of cells. Steroids 2024;202:109350.
37. Chang E. Vitamin D mitigates hepatic fat accumulation and inflammation and increases SIRT1/AMPK expression in AML-12 hepatocytes. Molecules 2024;29:1401.
38. Makris K, Bhattoa HP, Cavalier E, Phinney K, Sempos CT, Ulmer CZ, et al, .Recommendations on the measurement and the clinical use of vitamin D metabolites and vitamin D binding protein - A position paper from the IFCC Committee on bone metabolism. Clin Chim Acta 2021; 517:171-97.
39. Herrmann M. Assessing vitamin D metabolism - four decades of experience. Clin Chem Lab Med 2023;61:880-94.
40. Giustina A, Bilezikian JP, Adler RA, Banfi G, Bikle DD, Binkley NC et al. Consensus statement on vitamin D status assessment and supplementation: whys, whens, and hows. Endocr Rev 2024 doi: 10.1210/endrev/bnae009 (ahead of print).
41. Agoro R, White KE. Regulation of FGF23 production and phosphate metabolism by bone-kidney interactions. Nat Rev Nephrol 2023;19:185-93.
42. Smit MA, van Kinschot CMJ, van der Linden J, van Noord C, Kos S. Clinical guidelines and PTH measurement: does assay generation matter? Endocr Rev 2019;40:1468-80.
43. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L et al. Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. Kidney Int 2017;9:26-36.
44. Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA, McCann L, et al. Diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder: synopsis of the kidney disease: Improving Global Outcomes 2017 Clinical Practice Guideline update. Ann Intern Med 2018;168:422-30.
45. Valcour A, Zierold C, Blocki FA, Hawkins DM, Martin KJ, Rao SD et al. Trueness, precision and stability of the LIAISON 1-84 parathyroid hormone (PTH) third-generation assay: comparison to existing intact PTH assays. Clin Chem Lab Med 2018;56:1476-82.
46. Einbinder Y, Benchetrit S, Golan E, Zitman-Gal T. Comparison of intact PTH and bio-intact PTH assays among non-dialysis dependent chronic kidney dis- ease

patients. Ann Lab Med 2017;37:381–7.
47. Gao P, Scheibel S, D'Amour P, John MR, Rao SD, Schmidt-Gayk H,et al. Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1- 84: implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. J Bone Miner Res 2001;16:605–14.
48. Sella S, Bonfante L, Fusaro M, Neri F, Plebani M, Zaninotto M et al. Efficacy of weekly administration of cholecalciferol on parathyroid hormone in stable kidney-transplanted patients with CKD stage 1-3. Clin Chem Lab Med 2020;59:343-51.
49. Censi S, Iacobone M, Simmini S, Manso J, Franceschet G, Plebani M et al. PTH: Redefining reference ranges in a healthy population-the role of interfering factors and the type of laboratory assay. Int J Endocrinol 2020. doi: 10.1155/2020/1053719.
50. Fusaro M, Barbuto S, Gallieni M, Cossettini A, Re Sartò GV, Cosmai L et al. Real-world usage of Chronic Kidney Disease - Mineral Bone Disorder (CKD-MBD) biomarkers in nephrology practices. Clin Kidney 2023;17:sfad290.
51. Cavalier E, Schleck ML, Souberbielle JC. Spurious intraoperative PTH results observed with 2nd, but not with 3rd generation PTH assays. Clin Chim Acta 2018;477:72-3.
52. Yamashita H, Gao P, Cantor T, Noguchi S, Uchino S, Watanabe S, et al. Comparison of parathyroid hormone levels from the intact and whole parathyroid hormone assays after parathyroidectomy for primary and secondary hyperparathyroidism. Surgery 2004;135:149-6.
53. Jonsson KB, Zahradnik R, Larsson T, White KE, Sugimoto T, Imanishi Y et al. Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia. N Engl J Med 2003;348:1656-63.
54. Donate-Correa J, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernández C, Navarro-González JF. FGF23/Klotho axis: phosphorus, mineral metabolism and beyond. Cytokine Growth Factor Rev 2012;23:37-46.
55. Moe SM, Chertow GM, Parfrey PS, Kubo Y, Block GA, Correa-Rotter R et al.; Evaluation of Cinacalcet HCl therapy to lower cardiovascular events (EVOLVE) trial investigators. Cinacalcet, Fibroblast Growth Factor-23, and Cardiovascular Disease in Hemodialysis: Circulation 2015;132:27-39.
56. Edmonston D, Grabner A, Wolf M. FGF23 and Klotho at the intersection of kidney and cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol 2024 ;21:11-24.
57. Edmonston D, Wolf M. FGF23 at the crossroads of phosphate, iron economy and erythropoiesis. Nat Rev Nephrol 2020;16:7-19.
58. Smith ER, McMahon LP, Holt SG. Fibroblast growth factor 23. Ann Clin Biochem 2014;51:203-27.
59. Ferraro S, Biganzoli G, Calcaterra V, Zuccotti G, Biganzoli EM, Plebani M. Fibroblast growth factor 23: translating analytical improvement into clinical effectiveness for tertiary prevention in chronic kidney disease. Clin Chem Lab Med 2022; 60:1694-705.
60. Chiang C. The use of bone turnover markers in chronic kidney disease-mineral and bone disorders. Nephrol 2017; Suppl 2:11-3.
61. Lau WL, Obi Y, Kalantar-Zadeh K. Parathyroidectomy in the management of secondary hyperparathyroidism. Clin J Am Soc Nephrol 2018;13:952-61.
62. Cannata-Andía JB, Martín-Carro B, Martín-Vírgala J,Rodríguez-Carrio J, Bande-Fernández JJ, Alonso-Montes C et al. Chronic kidney disease—mineral and bone disorders: pathogenesis and management. Calcif Tissue Int 2021;108:410-22.
63. Rodríguez-Ortiz ME, Rodríguez M. Recent advances in understanding and managing secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. F1000Res 2020;9:F1000 Faculty Rev-1077.
64. Smout D, Jørgensen HS, Cavalier E, Evenepoel P. Clinical utility of bone turnover markers in patients with chronic kidney disease. Curr Opin Nephrol Hypertens 2022;31:332-8.
65. Vilaca T, Salam S, SchiniM,Harnan S, Sutton A, Poku Eet al. Risks of hip and nonvertebral fractures in patients with CKD G3a-G5D: a systematic review and meta-analysis. Am J Kidney Dis 2020;76:521-32.
66. Fusaro M, Tripepi G, Noale M, Vajente N, Plebani M, Zaninotto M et al. High prevalence of vertebral fractures assessed by quantitative morphometry in hemodialysis patients, strongly associated with vascular calcifications. Calcif Tissue Int 2013;93:39-47.
67. Castro-Alonso C, D'Marco L, Pomes J, Del Amo Conill M, García-Diez AI , Pablo Molina P et al. Prevalence of vertebral fractures and their prognostic significance in the survival in patients with Chronic Kidney Disease Stages 3–5 not on dialysis. J Clin Med 2020;9:1604.
68. Schini M, Vilaca T, Gossiel F, Salam S , Eastell R. Bone turnover markers: basic biology to clinical applications. Endocr Rev 2023;44:417-3.
69. Ginsberg C, Ix JH. Diagnosis and management of osteoporosis in advanced kidney disease: a review. Am J kidney Dis 2022;79:427-36.
70. Salam S, Gallagher O, Gossiel F, Paggiosi M, Khwaja A, EastellR . Diagnostic accuracy of biomarkers and imaging for bone turnover in renal osteodystrophy. J Am Soc Nephrol 2018;29:1557–65.
71. Jørgensen HS, Behets G, Viaene L, Bammens B, Claes K, Meijers B, Naesens M,et al. Diagnostic accuracy of noninvasive bone turnover markers in renal osteodystrophy. Am J Kidney Dis 2022;79:667-76.
72. Haarhaus M, Cianciolo G, Barbuto S, La Manna G, , Gasperoni L, Tripepi G et al. Alkaline phosphatase: an old friend as treatment target for cardiovascular and mineral bone disorders in chronic kidney disease. Nutrients 2022;14:2124.
73. Maruyama Y, Taniguchi M, Kazama JJ, Yokoyama K, Hosoya T, Yokoo Tet al. A higher serum alkaline phosphatase is associated with the incidence of hip fracture and mortality among patients receiving hemodialysis in Japan. Nephrol Dial Transplant 2014;29:1532-8.
74. Iimori S, Mori Y, Akita W, Kuyama T, Takada S, Asai T et al. Diagnostic usefulness of bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in predicting fracture in CKD stage 5D patients--a single-center cohort study. Nephrol Dial Transplant 2012;27:345-51.
75. Sridharan K. Chronic kidney disease mineral and bone disorder: A guide for general practice. Aust J Gen Pract 2023;52:52-7.
76. LeBoff MS, Chou SH, Ratlif KA, Cook NR, Khurana B, Kim E, Cawthon PM, et al (2022) Supplemental vitamin D and incident fractures in midlife and older adults. N Engl J Med 2022;387:299-309.
77. Bischoff-Ferrari HA, Vellas B, Rizzoli R, Kressig RW, da Silva JAP, Blauth M,et al.; DO-HEALTH research group. Effect of vitamin D supplementation, Omega-3 fatty acid supplementation, or a strength-training exercise program on clinical outcomes in older adults: The DO-HEALTH Randomized Clinical Trial. JAMA 2020;324:1855-68.
78. SIOMMMS, Sintesi delle nuove raccomandazioni 2022 della Società Italiana dell' Osteoporosi, del Metabolismo

Minerale e Malattie dello Scheletro (SIOMMMS) per la gestione della carenza di vitamina D, 2022. https://www.siommms.it/wp-content/uploads/2023/03/Sintesi-nuove-raccomandazioni-SIOMMMS-2022-carenza-vitamina-D.pdf (ultimo accesso: maggio 2024)
79. Dittadi R, Corbetta S, Banfi G, Bertoldo F, Migliaccio S, Gonnelli S et al. Documento congiunto di SIBIOC, della Società Italiana dell'Osteoporosi, del Metabolismo Minerale e delle Malattie dello Scheletro (SIOMMMS), della Sezione Italiana della European Ligand Assay Society (ELAS), e della Associazione Medici Endocrinologi (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.
80. Tripepi G, Fusaro M, Arcidiacono G, Sella S, Giannini S. Evaluating benefit from vitamin D supplementation: defining the area for treatment. Osteoporos Int 2023;34:1531-3.
81. Cummings SR, Rosen C. VITAL findings - a decisive verdict on vitamin D supplementation. New Engl J Med 2022;387:368-70.
82. Takács I, Tóth BE, Szekeres L, SzabóB, Bakos B, Lakatos P. Randomized clinical trial to comparing efficacy of daily, weekly and monthly administration of vitamin D (3). Endocrine 2017;55:60-5.
83. Lv Q-B, 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.
84. Stroomberg HV, Vojdeman FJ, Madsen CM, Helgstrand JT, Schwarz P, Heegaard AM, et al. Vitamin D levels and the risk of prostate cancer and prostate cancer mortality. Acta Oncol 2021;60:316-22.
85. Cavalier E, Makris K, Heijboer AC, Herrmann M, Souberbielle JC. Vitamin D: analytical advances, clinical impact, and ongoing debates on health perspectives. Clin Chem. doi: 10.1093/clinchem/hvae056. (ahead of print)
86. Bertoldo F, Cianferotti L, Colao A, Dittadi R, Giannini S, Lombardi G et al. Proposta per la refertazione della Vitamina D. Documento di consenso intersocietraio SIBIoC, SIOMMMS, ELAS, GIBIS, AME, SIR, SIMI, ORTOMED. Biochim Clin 2024;48:xx-xx.