

Současný stav stanovení vitamínu D v séru

Friedecký B.^{1,2}, Vávrová J.¹

¹ÚKBD LF a FN UK Hradec Králové,

²SEKK s. r. o. Pardubice

SOUHRN

Práce poskytuje stručný přehled metod stanovení 25-hydroxyvitaminu D v séru. Uvádíme informace o referenčních metodách, referenčních materiálech, o rutinních metodách separačních (LC-MS/MS) a imunochemických. Uveden je problém nedostatečné srovnatelnosti výsledků rutinních metod a systematických diferencí mezi nimi. Pojednáno je o možných interferencích, zejména vazebného proteinu pro vitamin D, o stavu kvality měření, požadavcích na kvalitu a o úrovni jeho standardizace. Stručně je pojednáno o interpretaci laboratorních výsledků měření a rozhodovacích limitech.

Klíčová slova: 25-hydroxyvitamin D, LC-MS/MS, imunochemické metody, standardizace, srovnatelnost

SUMMARY

Friedecký B., Vávrová J.: Současný stav stanovení vitamínu D v séru

Communication deals with brief, but complete review of analytical methods of serum vitamin D determination. Reference methods, reference materials, routine separation LC-MS/MS methods and immunochemical methods are reviewed. Lack of comparability, requirement on analytical quality, possibility of creation the reference system and bias against reference method are described. Interference of vitamin D bound protein (DBP) are introduced. Lack of standardization is described. Basic information on the interpretation of results and on the cut off values are briefly published.

Keywords: 25-hydroxyvitamin D, LC-MS/MS, immunochemistry, standardization, comparability

Úvod

V roce 2009, v době raketového nástupu zájmu o vitamin D, uveřejnil bulletin Americké asociace klinické chemie (AACC) Clinical Laboratory News výsledky dotazníku o nárůstu požadavků na vyšetření této nové „hvězdy“ mezi analyty [1]. Jen 9 % respondentů nezaznamenalo tenkrát za posledních 12 měsíců nárůst požadavků na toto vyšetření. 26 % zaznamenalo nárůst o 50-100 % a 26 % dokonce o víc než 100 %. V té době dominovala stanovení separační metody a z imunoanalytických metod byla na trhu jen metoda DiaSorin RIA. Bylo jen otázkou krátkého času, kdy firmy, produkující diagnostické kity budou reagovat na zvýšenou poptávku po vyšetření vitamínu D a zaplní tuto mezeru nabídkami. Metodami volby byly přirozeně imunoanalytické postupy. Jsou technicky snadno zvládnutelné s použitím v rutinních podmínkách běžných imunochemických analyzátorů a logicky se zájem výrobců a laboratoří obrátil na ně. V současnosti je na trhu dostupných několik systémů měření, založených na imunochemických metodách měření: DiaSorin/Liaison, DiaSorin/RIA, Siemens/Centaur, Roche/Modular, Elecsys, Abbott/Architect, i-Sys/IDS.

Nyní nastala fáze kritického hodnocení analytické kvality a významu v klinické praxi. V bulletinu FONS 1/2012 jsme publikovali několik informací o problémech stanovení vitamínu D imunochemickými metodami [2] se závěrem, že vykazují řadu analytických i interpretačních problémů. Bezprostředně poté vyšla řada publikací studií všech v té době na trhu dostupných automatizovaných imunochemických stanovení, které rozšířily, upřesnily, ale v zásadě potvrdily naše infor-

mace. Stručný přehled stavu měření, kvality a základní interpretace stanovení vitamínu D je předmětem tohoto sdělení.

Metody měření

Do oficiálního seznamu referenčních metod JCTLM (Spojená komise pro návaznost v laboratorní medicíně) na stránce www.bipm.org/jctlm byly v roce 2011 zařazeny dvě navržené referenční metody na principu ID- LC-MS/MS (izotopová diluce-kapalinová chromatografie-tandemová hmotnostní spektrometrie).

První z nich pochází z Belgie [3]. Její udaná preciznost je CV = 2-3 %, bias 1,1 až 1,3 % a rozšířená kombinovaná nejistota 3,4 až 3,9 %. Metoda má na minimum potlačenou interferenci 3-epi-25-hydroxyvitaminu D₃ díky jeho účinné separaci.

Druhá, označovaná také jako „referenční metoda NIST“ je publikovaná autory této instituce [4]. Uvádí se u ní hodnota CV % < 1 u běžných respektive CV % < 2 u nízkých koncentrací a recovery 99 až 101 %.

Recentní přehled stavu a aplikace metod hmotnostní spektrometrie je uveden v práci Kobolda (2012) [5].

LC-MS/MS je doposud jediná metoda pro specifické stanovení vitamínu D a jeho metabolitů. Velký rozvoj postupů měření otevírá možnosti rychlých analýz, prováděných v dostatečně velkých sériích. Vývoj směřuje k orientaci na stanovení 25-hydroxyvitaminu D₃ při vytvoření podmínek, vhodných pro rutinní, dostatečně rychlé, kapacitní stanovení, přiměřeně náročné na provedení.

O stavu metodologie LC-MS/MS s podrobnějšími komentáři analytických problémů separace a detekce při měření vitamínu D se lze poučit přehlednou prací [6]

s detailním přehledem literatury do roku 2010.

Produkcí imununoanalytických diagnostik ovládají velcí výrobci (Abbott, DiaSorin, Roche, Siemens, IDS). Všichni ve shodě se současným konsensem deklarují jako předmět měření celkový (total) 25-hydroxyvitamin D. Roche poskytoval donedávna jako předmět měření 25-hydroxyvitamin D₃, ale nová, současně produkovaná „generace“ udává také jako předmět měření celkový vitamin D.

Australští autoři [7] srovnávali s dvěma metodami LC-MS/MS všechny momentálně dostupné, automatizované imunochemické metody: DiaSorin RIA, DiaSorin Liaison, Abbott Architect, i-Sys/IDS, Siemens Centaur, Roche Modular, Elecsys. K srovnání bylo použito sér 170 náhodně vybraných pacientů. Preciznost imunochemických měření byla více než dvojnásobně horší, než u metody LC-MS/MS. Zatímco mezilehlá preciznost metod LC-MS/MS dosahovala hodnot CV% < 6, u imunochemických metod byla hodnota CV% < 15. Zejména málo uspokojivé jsou hodnoty bias imunochemických metod. Směrnice regresních Passingových-Bablokových rovnic při srovnávání jednotlivých imunochemických metod s metodou LC-MS/MS se pohybovaly v širokém intervalu 0,68 (Siemens Centaur) po 1,2 (IDS). Blandovy-Altmanovy diferenční diagramy ukázaly difference jednotlivých imunochemických metod -6,9% až 40,9% od LC-MS/MS pro celý soubor a +10,0 až 117,5% pro koncentrace pod 20 nmol/l. Koncentrace pod 20 nmol/l nebylo možné měřit spolehlivě, ostatní pak jen s vědomím nutnosti nepřeceňovat interpretační závěry a zejména s opatrným používáním literárních hodnot cut-off. Od výrobců lze zřejmě v budoucnosti očekávat provádění průběžných recalibrací metod s cílem dosažení lepší shody s LC-MS/MS.

Ani Roth (2008) [8] nenalezl dobrou srovnatelnost výsledků, získaných šesti různými metodami (z toho pěti s imunochemickým principem a jedné metody HPLC) ani mezi sebou, ani s metodou LC-MS/MS. Hodnoty směrníc Passingových-Bablokových vztahů mezi jednotlivými metodami a referenční LC-MS/MS se pohybovaly v intervalu 0,6-1,0. Vysoká hodnota mezilaboratorní variability a významné systematické difference mezi metodami ztěžují možnosti spolehlivé klinické interpretace výsledků měření. Australští autoři [9] zjistili při použití imunochemické metody 57% probandů pod cut-off 50 nmol/l, kdežto u metody LC-MS/MS takových bylo jen 41%.

Ve skandinávské studii [10] bylo jen 8% výsledků HPLC pod cut off 50 nmol/l, u metody RIA (DiaSorin) to bylo 22% a u metody DiaSorin Liaison (chemiluminiscence) již 43%. Francouzský tým [11] odhadl pro metody Diasorin RIA, Diasorin Liaison, Roche Elecsys a HPLC Chromsystems nejistotu měření 20 nmol/l, takže předpokládaná koncentrace 80 nmol/l se ve skutečnosti pohybuje v intervalu 60-100 nmol/l. Z nových imunochemických diagnostik byly nedávno uveřejněny výsledky stanovení 25-hydroxyvitaminu D (celkového) systémem Abbott Architect [12]. Preciznost pod CV% = 6 a dobrá srovnatelnost s výsledky Diasorin Liaison i Diasorin RIA vypadaly optimisticky, nicméně chybělo srovnání s LC-MS/MS. Vzhledem k jasné a opakovaně prokazovaným systematickým diferen-

cím je hodnocení nových, inovovaných a rekalibrovaných imunochemických metod nedostatečné bez jejich srovnání s metodami LC-MS/MS.

Nedostatečná srovnatelnost výsledků, dosažených imunochemickými metodami je také zřejmá ze zcela recentní práce [13]. Imunochemické metody Roche, Abbott, Centaur, DiaSorin RIA neměly dostatečnou úroveň srovnatelnosti s LC-MS/MS metodou a hodnoty preciznosti a bias přesáhly velikost, která by mohla zajistit neproblematickou klinickou interpretaci stanovených výsledků (požadující hodnotu 5% pro bias a 10% pro CV). Autoři uzavřeli svá zjištění šalamounským tvrzením, že z hlediska analytické kvality testované metody sice vyhovují požadavkům programů kontroly kvality, ale ne už potřebám pacientů (!).

V rutinních laboratořích velmi často užívanou metodu DiaSorin Liaison podrobněji studovali Becker a spol. (2012) [14]. Autoři pozorovali u asi 5% výsledků významně vyšších výsledků, než u metody LC-MS/MS. Po naředění sér v poměru 1:1 tyto difference zmizely. Na podkladě výsledků po inkubaci sér ve zkumavkách typu HBT (heterophile blocking tubes) před analýzou bylo uzavřeno, že příčinou diferencí však není přítomnost heterofilních protilátek, jak se původně předpokládalo.

U imunochemických stanovení je možné předpokládat řadu potenciálních interferencí [15]:

- vazbu na DBP (vitamin D bound protein)
- rozdílnou imunoreaktivitu pro 25(OH) D₂ a 25(OH) D₃
- pozitivní bias, způsobovaný růzností koncentrace 3-epi-25-hydroxyvitaminu D₃

Dále je u imunochemických metod nutné uvažovat obecně se vyskytující interference (heterofilní protilátky a podobné).

Významné systematické difference, způsobené patrně různým průběhem ionizace u různých modifikací metody LC-MS/MS dosahující průměrně 11% je však možné pozorovat i u výsledků účastníků v programu EHK DEQAS [15].

V Tabulce 1 jsou stručně shrnuty klíčové údaje o srovnatelnosti výsledků 75 pacientů odebraných od počátku února do poloviny května 2011. Séra byla skladována při -70°C. K měření bylo použito systémů Abbott Architect, DiaSorin Liaison a Roche Modular. Analýzy provedeny a vyhodnoceny na UKBD FN a LF UK Hradec Králové. Testované metody byly srovnány vzájemně mezi sebou.

Table 1: Comparability data of three immunochemical measurement methods

Difference of medians (%)	DiaSorin vs Roche	2
	Abbott vs Roche	17
	Abbott vs DiaSorin	18
Corelation coefficients (r)	DiaSorin vs Roche	0.80
	Abbott vs Roche	0.84
	Abbott vs Diasorin	0.94
Results < 30 nmol/l (%)	Abbott	21
	DiaSorin	16
	Roche	34

Výsledky ukazují ve shodě s údaji Farrellovy práce [7] významné rozdíly mezi výsledky různých imunochemických stanovení, které se mohou nepříznivě projevit při klasifikaci stavu saturace vitamínem D u jednotlivých pacientů.

Výrobci považují koncentraci 250 nmol/l jako hodnotu, nad níž je již oblast možného rizika předávkování. Americký IOM (Institute of Medicine) zvolil jako hranici možného rizika dokonce již hodnotu 125 nmol/l. Vzorek s rizikem předávkování při kritériu 125 nmol/l byl však v celém souboru jen jeden (při použití DiaSorinu), při hodnotě rozhodovacího limitu 250 nmol/l nebyl takový žádný.

Výrobci testovaných diagnostik neuvádějí, jak a zdali vůbec validovali cut off hodnoty, uvedené ve své dokumentaci. Všichni používali stejných hodnot, které jsou však již historické, odvozené původně z metody DiaSorin RIA a v nesouladu s pozorovanými systematickými diferencemi mezi metodami.

Závažná publikace o zásadním problému souvislosti výsledků měření 25 (OH) D na koncentraci vazebného proteinu (DBP) pochází od nizozemských autorů [16]. Byly testovány systémy Abbott Architect, Siemens Centaur, iSYS (IDS), Roche (Elecsys), DiaSorin Liaison, DiaSorin RIA. U Roche bylo již použito nové generace metody, stanovující celkový 25 (OH) D. K posouzení pravdivosti byla opět jako reference použita metoda LC-MS/MS. Koncentrace DBP byla stanovena metodou na principu ELISA. Byly analyzovány vzorky čtyř skupin pacientů, o kterých je známo, že mají významně odlišné hodnoty DBP (vitamin D binding protein). Šlo o soubor zdravých jedinců (n=51), těhotných žen (n=52), pacientů na hemodialýze (n=52) a pacientů z jednotek intenzivní péče dále nespecifikovaných (n=50). Autoři pozorovali difference jednak mezi metodami, dané různými hodnotami bias, jednak difference mezi skupinami pacientů, dané nepochybně vlivem rozdílných koncentrací DBP. Směrnice regresních rovnic podle Passinga a Babloka ukazují, že velikost diferencí výsledků u jednotlivých skupin pacientů je značná a významná (Tabulka 2).

Table 2: Comparability of 25 (OH) D results in six different immunochemical methods and patient groups with different vitamin D bound protein (DPB) amount. LC-MS/MS used as reference method

Group	Slope of Passing Bablok regression analysis
Health	0.55 (Centaur) to 1.09 (Abbott)
Pregnant	0.45 (Centaur) to 0.98 (Roche, RIA)
Dialysed	0.37 (Centaur) to 0.82 (RIA)
UCP	0.62 (Centaur) to 1.29 (Liaison)

U imunochemických metod je v průběhu měření potřebné uvolnit vitamín D z vazby na DBP. Toho se dosahuje nastavením hodnoty reakční směsi na potřebnou hodnotu pH. Koncentrace DBP je různá u různých skupin pacientů a silně ovlivňuje výsledky měření. Podle uvedených výsledků se zdá, že různá je i účinnost uvolnění vitamínu D z vazby na DBP, což působí difference mezi výsledky různých metod.

Kvalita, kontrola, standardizace

Stöckl (2009) [17] odvodil na podkladě standardně používaných vztahů z hodnot biologických variací, požadavků k dosažení správné diagnostické klasifikace a stavu současných analytických možností (state of art), že pro dosažení účinnosti výsledků v klinické praxi je v rutinních laboratořích zapotřebí používat metod s precizností CV% ≤ 10 a systematickou chybou b% ≤ 5 . Viljoen (2011) [18] došel na podkladě hodnot biologických variací k poněkud jiným, ale podobným hodnotám, a to k CV% 5 a bias b% ≤ 10 . Vyčíslil hodnoty referenčních změn (kritických diferencí) dvou následných měření a hodnotu indexu individuality. Ta je nízká, omezuje účinnost hodnocení výsledků podle hodnot rozhodovacích limitů (cut off) a referenčních intervalů a dává přednost dynamičtějšímu a náročnějšímu přístupu sledování změn u individuálních pacientů na podkladě dvou a více následných měření.

Výsledky externího hodnocení kvality ukazují, že k uvedeným požadavkům na preciznost a bias je zatím v realitě daleko. V programu EHK DEQAS pro vitamín D bylo dosaženo v roce 2011 reprodukovatelnosti CV% = 15. V období před standardizací (před existencí materiálu NIST SRM 972) to bylo CV% > 30. V programu SEKK a RFB (DGKL) Německo se pohybovaly hodnoty reprodukovatelnosti mezi 25 - 35%. Teprve v roce 2012 bylo dosaženo hodnot $\leq 20\%$ (18% v RFB a 20% v SEKK). Další zlepšení bude závislé na vývoji standardizace, na zlepšení kvality imunochemických metod a případně na větším rozšíření metod LC-MS/MS. Carter (2012) uvedl, že v programu DEQAS používalo k roku 2011 této separační metody 11% účastníků. V cyklu z dubna 2012 to bylo 12% [15].

Přehled výsledků mezinárodně uznávaného programu EHK pro hodnocení vitamínu D DEQAS, pořízených na podkladě vyhodnocení 20 kontrolních cyklů v období 4 let konstatuje roky přetrvávající významné systematické difference a vysokou mezilaboratorní variabilitu. [19]. Hodnoty bias v rozmezí 5-10% spadají bez provedení standardizace do oblasti snů. To lze ostatně vidět i z výše uvedených výsledků srovnávání imunochemických metod s LC-MS/MS. Podrobnější údaje o stavu a úrovni srovnatelnosti výsledků měření poskytují data Tabulky 3, ve které jsou uvedena souhrnná data cca 1100 účastníků kontrolního cyklu DEQAS z dubna 2012. Celková reprodukovatelnost byla 12-15%, uvnitř skupin jednotlivých metod 8-18% a maximální systematické difference mezi metodami dosahovaly hodnot nad 50%, což výmluvně charakterizuje.

Table 3: Results of 25-hydroxyvitamin D reached in regular april 2012 survey of DEQAS program

Number of participants	cca 1100
Reproducibility of all measurements (4 samples of one survey)	12-15 %
Reproducibility within individual method groups	8-18%
Systematic differences among methods	up to 55%
Reproducibility LC-MS methods	9-12%

rizuje současný nijak vynikající stav měření. Úspěšnost účastníků lze hodnotit pouze uvnitř jednotlivých skupin metod a lze očekávat, že podobné omezení může platit i při hodnocení pacientů.

Obtížným problémem při analytické kontrole stanovení vitamínu D může být i komutabilita kontrolních materiálů, bez které nelze exaktně hodnotit pravdivost (bias) měření. Její zajištění může být obtížný problém i u nativních kontrolních sér. Zejména vzhledem k interferencím DBP u imunochemických metod by mohl dělat velké problémy výběr vhodných materiálů a vhodných pacientů.

Standardizace měření není zdaleka hotová a funkční a systematické difference mezi výsledky různých metod to ukazují. Jedním z klíčů standardizace je návaznost kalibrátorů rutinních měření na certifikovaný referenční materiál NIST SRM 972 [20]. Výrobci sice deklarují, že materiálu NIST 972 používají k ustanovení hodnot jejich kalibrátorů, ale navzdory tomu není srovnatelnost různých metod dostatečná. Na otázku, položenou na počátku konjunktury měření vitamínu D [20], zda jsou klinické laboratoře dostatečně připraveny na kvalitní stanovení vitamínu D nelze zatím odpovědět kladně.

Účinná standardizace si vyžádá v budoucnosti vytvoření referenčního systému měření, sestávajícího z mezinárodně akceptované referenční metody na bázi tandemové hmotnostní spektrometrie LC-MS/MS a z certifikovaného referenčního materiálu (NIST-SRM 972). Popis referenčního systému a zdůvodnění nutnosti jeho existence je obsahem přehledné práce [21].

Základ návaznosti měření, certifikovaný referenční materiál NIST SRM 972, je k dispozici od roku 2009. Popis jeho přípravy je dostupný [22]. Sada materiálů SRM 972 obsahuje čtyři vzorky. Level 1 - je směs „normálních“ lidských sér s certifikovanými hodnotami 25 (OH) D₃ a 25 (OH) D₂. Level 2 je materiál se sníženými koncentracemi 25 (OH) D₃ a 25 (OH) D₂, získaný naředěním materiálu Level 1 koňským sérem. Level 3 je s přídavkem substrátu 25 (OH) D₂, Level 4-s přídavkem substrátu 3-epi-25 (OH) D₃. Sada materiálů zahrnuje tedy oba měřené analyty [25 (OH) D₂ a 25 (OH) D₃] a hlavní předpokládaný interferent [3-epi-25 (OH) D₃]. Materiál je nepoužitelný k přímému použití u imunochemických metod, neboť jde ve dvou případech o vzorky s přídavky exogenních metabolitů [25 (OH) D₃, 25 (OH) D₂, 3-epi-25-OH D₃] a jeden je ředěn koňským sérem. Certifikované hodnoty jsou stanoveny referenční metodou „NIST“ ID-LC-MS/MS.

Stručné informace o interpretaci výsledků

S ohledem na dostatečně velkou hodnotu biologického poločasu je optimálním předmětem měření pro posouzení stavu saturace jedinců vitamínem D 25-hydroxyvitamin [23]. V pracovní dokumentaci všech výrobců diagnostik jsou jako kritéria saturace vitamínu D stereotypně uváděny stejné hodnoty navzdory známým a výše uvedeným faktům o nedostatečné srovnatelnosti jejich výsledků a navzdory skutečnosti, že tyto hodnoty jsou odvozeny již před léty na podkladě

dat, získaných pomocí metody DiaSorin RIA aniž by byly nově revidovány. Jako kritérium (cut off) pro nedostatek vitamínu D slouží hodnota 25 nmol/l, hodnota 50 nmol/l je považována za hraniční hodnotu nedostatečné saturace a až od hodnoty 75 nmol/l je obvykle posuzována hladina vitamínu jako dostatečná. V roce 2011 byla publikována zajímavá data NHANES-National Healthy and Nutrition Examination Surveys [24], získaná dlouholetým sledováním velkého souboru dat populace USA.

Podle expertů NHANES je kritériem pro klasifikaci závažného nedostatku (deficitu) koncentrace pod 30 nmol/l. Koncentrace nižší než 50 nmol/l klasifikuje stav nedostatečnosti (inadequacy) a 125 nmol/l je hraniční hodnota, kdy je možné očekávat již možné poškození z nadbytku.

Počty nedostatečně saturovaných jedinců rostou s jejich věkem a u žen jsou významně vyšší, než u mužů. U těhotných žen počet nedostatečně saturovaných významně roste. Čtvrtina populace USA měla snížený vitamín D (pod 50 nmol/l), 8% dokonce závažný nedostatek (pod 30 nmol/l). Závažné jsou etnické rozdíly. Deficit pod 30 nmol/l byl zaznamenán u 32% černých, 9% Hispánců a 3% bílé populace. Při hodnocení klinického stavu je třeba také brát do úvahy vliv roční doby (sluneční svit). Výsledky uvedené studie byly na tento sezónní vliv adjustovány.

Nedostatečná standardizace, působící vysokou mezilaboratorní variabilitu a významné systematické difference mezi metodami však klinické hodnocení stavu saturaci organismu vitamínem D komplikují.

Imunoanalytické metody stanovení 25-hydroxyvitamínu D umožní snadnost, komfort a dostupnost tohoto vyšetření ve všech rutinních laboratořích, vybavených některým z běžných automatických analyzátorů. Výsledky je však třeba používat a interpretovat opatrně, se znalostí úskalí a s ohledem na celkový stav pacienta. Imunochemická stanovení nejsou dostatečně standardizovaná a jsou zatížena silnými interferencemi, zejména vazebným proteinem pro vitamín D. Častá skepse nutričních odborníků k jiným, než LC-MS/MS metodám je pochopitelná. Soudobá úroveň srovnatelnosti problematizuje efektivitu hodnocení podle cut off limitů.

Literatura

1. **Schleicher, R. L., Pfeiffer, C. M.**, How will we get it right? *Clin. Lab. News*, 2009, 35, p. 12.
2. **Friedecký, B., Vávrová, J.**, Zpráva o srovnatelnosti, standardizaci a hodnocení výsledků vitamínu D. *Fons*, 2012, 1, p. 12-14.
3. **Stepman, H. C., Vanderroost, A., Van Uyphange, K., Thienpont, L. M.**, Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2011, 57, p. 441-448
4. **Tai, S. S., Bedner, N., Phiney, K.W.**, Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann. Chem.*, 2010, 82, p. 1942-1948.

5. **Kobold, V.**, Approaches to measurement of vitamin D concentrations. Mass spectrometry. *Scan. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 2012, 243, p. 54-59
6. **El-Khong, J. M., Reineks, E. Z., Wong, S.**, progress of liquid-chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues. *Clin. Biochem.*, 2011, 44, p. 66-76.
7. **Farrell, C-J. L., Martin, S., McWhinney, B. a spol.**, State of Art vitamin D assays:A comparison of Automated Immunoassays with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods. *Clin. Chem.*, 2012, 58, 531-542
8. **Roth, H. J., Schmidt-Gayk, H., Weber, H., Riedentrau, C.**, Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as reference. *Ann. Clin. Biochem.*, 2008, 45, p. 150-159
9. **Lei, J. K., Lucas, R. M., Clements, M. S. a spol.**, Assessing vitamin D status:pitfalls for the unway. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2010, 54, p. 1062-1071.
10. **Snellman, G., Melkus, H., Godeborg, R. a spol.**, Determining vitamin D status, a comparison between commercially available assays. *Plos One*, 2010, 13, 5: e11555.
11. **Cavalier, E., Dozet, E., Gadisseur, R. a spol.**, Measurement uncertainty of 25-OH vitamin D determination with different commercially available kits: impact on the clinical cut offs. *Osteoporosis Int.*, 2010, 21, p. 1047-1051.
12. **Cavalier, E., Carlisi, A., Beckert, A. a spol.**, Analytical evaluation of the new Abbott Architect 25-OH vitamin D assay. *Clin. Biochem.*, 2012, 45, p. 505-508.
13. **Ong, L., Saw, S., Schabdeen, N. B. a spol.**, Current 25-hydroxyvitamin D assays: Do they pass the test? *Clin. Chim. Acta*, 2012, 413, p. 1127-1134.
14. **Becker, N., McClellan, A. C., Gronowski, A. M., Scott, M. G.**, Innacurate 25-hydroxyvitamin D results from a common immunoassay. *Clin. Chem.*, 2012, 58, p. 948-951.
15. **Carter, G. D.**, 25-hydroxyvitamin D: A difficult analyte. *Clin. Chem.*, 2012, 58, 486-488
16. **Herijboer, A. C., Blankenstein, M., Kema, I. P., Buijs, M. M.**, Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: Influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin. Chem.*, 2012, 58:543-548
17. **Stöckl, D., Sluss, P. M., Thienpont, L. M.**, Specification for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin. Chim. Acta*, 2009, 408, p. 8-3.
18. **Viljoen, A., Singh, D. K., Farrington, K., Twoney, P. J.**, Anylytical quality goals for 25-vitamin D based on biological variation. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2011, 25, p. 130-133.
19. **Carter, G. D.**, Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr. Drugs Targets*, 2011, 12, p. 19-28.
20. **Singh, R. J.**, Are clinical laboratories prepared for accurate testing of 25-hydroxyvitamin D? *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 2082-2084.
21. **Thienpont, L. M., Stepman, H. C., Vesper, H. W.**, Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 2012, 243, p. 41-49.
22. **Pinney, K. W.**, Development of a standard reference material for vitamin D in serum. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2008, 511S-512S.
23. **DeLuca, H.F.**, Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutrition Rewiews*, 2008, 66S, p. 73-87.
24. **Looker, A., Johnson, M. P. A., Lacher, D. A. a spol.**, Vitamin D Status: United States, 2001-2006. *Clinical Laboratory News*, May 2011

Do redakce došlo 21. 5. 2012

Adresa pro korespondenci
 RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.
 ÚKBD LF a FN UK Hradec Králové
 Sokolská 581
 500 05 Hradec Králové
 e-mail: friedecky@sekk.cz