

## Stanovení 25-hydroxyvitaminu D v séru/plazmě – minireview

Friedecký B., Vávrová J.

Ústav klinické biochemie a diagnostiky, LF a FN Hradec Králové

### SOUHRN

*Cíl:* Minireview podává přehled aktuálního stavu měření 25-hydroxyvitaminu D v krevním séru.

*Metoda:* Hodnocení analytické kvality měření 25-hydroxyvitaminu D v programech externího hodnocení kvality. Výsledky separačních a imunochemických metod, stav metrologické reference a standardizace, předměty měření (analyty), preanalytická stabilita.

*Závěr:* Je nutná standardizace měření jako podmínka vyšší úrovně srovnatelnosti mezi metodami a mezi laboratořemi využitím a rozvojem referenční metodiky a aplikací již existujících referenčních materiálů.

*Klíčová slova:* 25-hydroxyvitamin D, srovnatelnost metod, LC-MS/MS, metrologické reference.

### SUMMARY

**Friedecký B., Vávrová J.: The determination of 25-hydroxyvitamin D in serum or plasma – a mini-review**

*Objective:* A mini-review on the current state in serum 25-hydroxyvitamin D measurement.

*Methods:* The review of used routine methods for the measurement the 25-hydroxyvitamin D in serum. The assessment of analytical quality by means of inter-laboratory comparison programs is presented. The current state of metrological reference and standardization is outlined. The methods, based on separation, with immunochemistry methods are compared. Problem of suitable analytes as subjects of measurement. Stability of analyte is described.

*Conclusion:* There is the necessity of standardization for achieving the interlaboratory comparability and clinical utility by means of using reference material and reference method in routine practice.

*Key words:* 25-hydroxyvitamin D, comparability, LC-MS/MS, metrological reference.

## Úvod

Důsledkem výrazně zvýšené úrovně vědomostí o klinickém a diagnostickém významu vitaminu D v posledních letech je prudký nárůst počtu požadavků na jeho vyšetřování v rutinních klinických laboratořích. Dotazníková akce Americké asociace klinické chemie (AACC) zjistila nárůst požadovaných vyšetření za jeden rok (v období 2008–2009) u většiny dotázaných laboratoří o více než 50 %, a u 27 % dotázaných pracovišť dokonce o více než 100 % [1].

Současně s tímto enormním nárůstem požadavků se objevila řada indicií potvrzujících existenci významných systematických diferencí mezi metodami a laboratořemi. Ty vedou k závažným klinickým rozpakům při interpretaci výsledků a následně k pocitování naléhavé potřeby urychlené standardizace stanovení.

K získání obrazu o stavu publikací bylo použito databáze Pubmed. Počty vyhledaných citací ke dni 1. 3. 2011 jsou shrnuty následovně:

– nedostatek vitaminu D	17 329
– kostní metabolismus	15 656
– maligní choroby	6 263
– receptor vitaminu D	6 190
– suplementace vitaminem D	3 263
– kardiovaskulární choroby	1 863
– diabetes	1 555
– imunita	1 225
– analytické metody	117
Celkový počet citací	50 772

Číselné údaje výmluvně ilustrují klíčové otázky kolem vitaminu D:

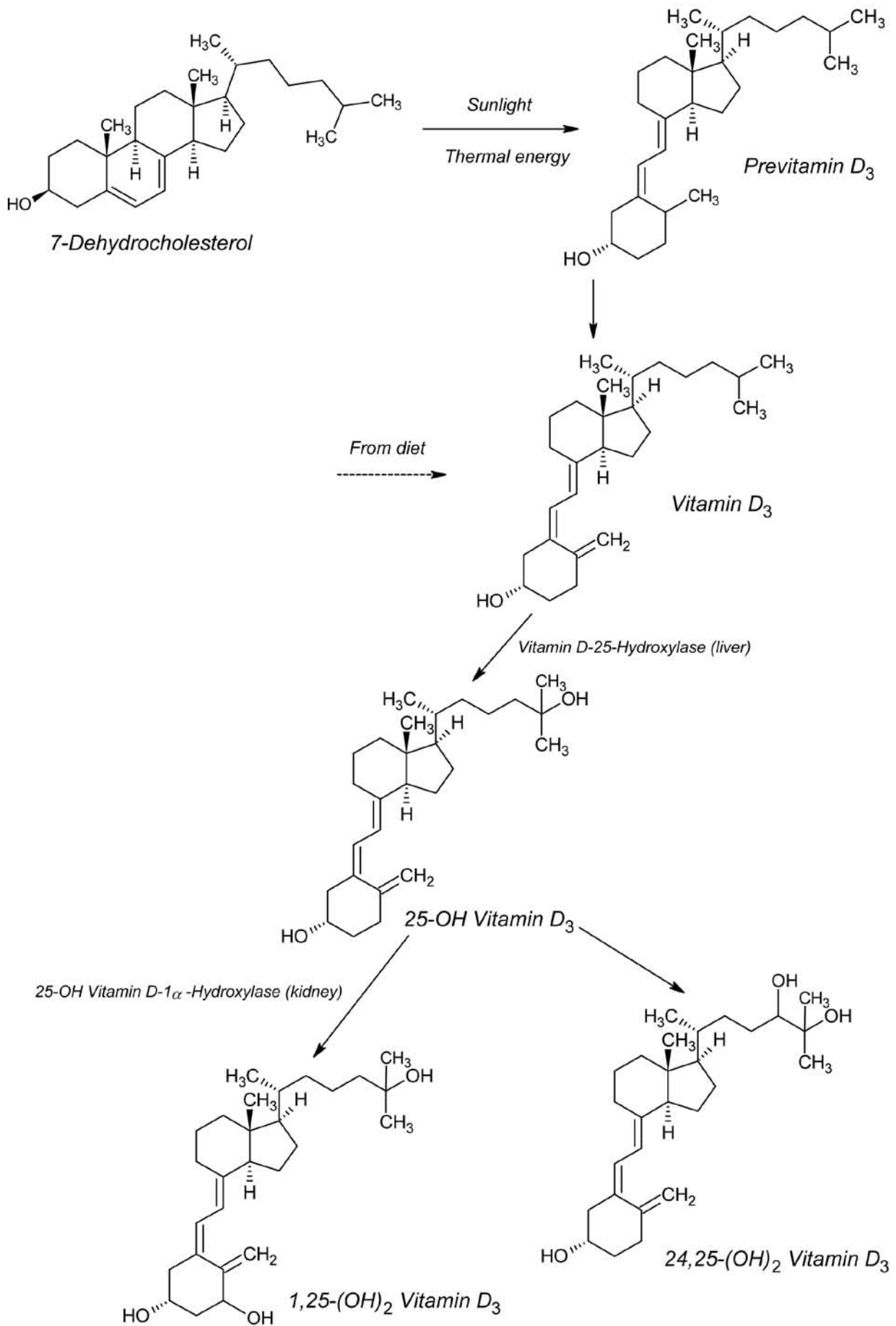
- velká publikační aktivita při výzkumu,
- nedostatek a potřeba suplementace vitaminu D u lidí,
- předpokládaný široký vliv u různých patologických stavů,
- v porovnání s klinickými aspekty problému nedostatečný zájem o analytické procesy.

Za klíčové problémy stanovení vitaminu D lze v současnosti považovat odpovědi na dvě otázky:

- Jaký analyt používanou metodou měříme?
- Jsme analyticky dostatečně připraveni na kvalitní měření vitaminu D?

## Předmět měření

Při měření, požadování a interpretaci výsledků vitaminu D se objevuje zásadní otázka, který analyt při použití dané metody vlastně měříme. V zásadě lze pomocí separačních metod (HPLC, LC-MS/MS) stanovit analyty dva: 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> (25-OH D<sub>2</sub>) a 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-OH D<sub>3</sub>). Imunochemické metody nemají obvykle dostatečnou schopnost diferencovat mezi 25-OH D<sub>2</sub> a 25-OH D<sub>3</sub> a stanovují podle údajů výrobců obvykle 25-hydroxyvitamin D (25-OH D) jako blíže nespecifikovanou sumu 25-OH D<sub>2</sub> a 25-OH D<sub>3</sub>. Firma Roche uvádí jako měřený analyt 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>. Referenční metoda a referenční materiál



**Fig. 1.** Formation and functional metabolism of Vitamin D

SRM 972 NIST disponují jasně specifikovanými analyty: 25-OH D<sub>2</sub> a 25-OH D<sub>3</sub> [2].

Podle údajů respondentů již výše zmíněného dotazníků AACCC [1] není jasno v otázce analytu ani v některých laboratořích, ani u lékařů vyšetření požadujících. Celkem 78 % laboratoří poskytovalo výsledky celkového 25-hydroxyvitaminu D (dále 25-OH-D), 25 % laboratoří poskytovalo i výsledky 1,25-dihydroxyvitaminu D (1,25 (OH)<sub>2</sub> D) a 32 % poskytovalo výsledky buď 25-hydroxyvitaminu D<sub>2</sub> (25-OH-D<sub>2</sub>), nebo 25-hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> (25-OH-D<sub>3</sub>), respektive jejich sumu (zejména laboratoře používající metody LC-MS/MS).

Experti NDNS (National Diet and Nutrition Survey Velká Británie) a NHANES (National Health and Nutrition Examination) považují za potřebné simultánní měření 25-OH-D<sub>2</sub>, 25-OH-D<sub>3</sub> a 3-epi-25 hydroxyvitaminu D<sub>3</sub> s použitím separační metodologie LC-MS/MS nebo HPLC, standardizované s použitím referenčního materiálu SRM 972 [3], aby mohl být stav vitaminu D u lidské populace řádně posouzen.

Měření 3-epi-25-OH D<sub>3</sub> je důležité zejména u dětí, u nichž se podílí 15–41 % na celkovém množství 25-OH-D<sub>3</sub>, kdežto u dospělých je to jen 2–17 %. Ke stanovení 3-epi-25-OH D<sub>3</sub> byla navržena metoda UPLC-MS/MS (ultraúčinná kapalinová chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrochemií), popsána zcela nedávno belgickými autory [4].

Stanovení 1,25-dihydroxyvitaminu D je mimo rámec tohoto sdělení.

## Externí hodnocení kvality

Z výsledků programů externích hodnocení kvality je zřejmý nedostatek standardizace měření, projevující se jako nedostatečná srovnatelnost výsledků dosažených různými metodami. Patrně ve světě nejuznávanější program EHK pro vitamin D, britský DEQAS (<http://www.deqas.org>), používá jako kontrolní materiály směsi nativních sér pacientů. Jsou rozepisovány čtvrtletně a v každém cyklu je pět kontrolních vzorků. Výsledky jsou hodnoceny ve skupinách podle použitých diagnostik. Carter demonstroval, že typické hodnoty reprodukovatelnosti uvnitř těchto skupin se pohybovaly v rozmezí CV% = 15–20 a typické intervaly hodnot průměrů skupin byly 31–43, 75–94 a 94–125 nmol/l [5]. Reprodukovatelnost uvnitř skupin ukazuje nedostatečnou kvalitu práce laboratoří, kdežto diference mezi průměry dává představu o významných rozdílech mezi metodami diagnostiky.

Kontrolní program CAP USA (Ligand) ukazuje podobné výsledky. Například průměr výsledků metody LC-MS/MS 31 µg/l v jednom cyklu se velmi lišil od neúnosně širokého intervalu průměrů chemiluminiscenčních imunochemických stanovení 41–96 µg/l [6].

Také v kontrolním programu Německé společnosti klinické chemie a laboratorní medicíny (DGKL) je situace velmi podobná. V cyklu VIT 2/09 bylo dosaženo reprodukovatelnosti CV% = 19–26 a intervalu mezi průměry (u vzorku B) 76–126 µg/l. Konečně v programu SEKK v roce 2009, kde je vitamin D hodnocen jako jeden

z kostních markerů, byla dosaženo reprodukovatelnosti CV% = 15–18 a diference mezi průměry dvou dominantně použitých diagnostik (Roche a Immunodiagnosics) byly 90–104 nmol/l, respektive 197–267 nmol/l.

Výsledky programů EHK jednoznačně potvrzují nedostatečnou kvalitu analytiky v laboratořích a zejména nedostatečnou srovnatelnost různých metod měření.

Více než 20 let hodnotily programy EHK analytickou způsobilost laboratoří posuzováním jejich výsledků po metodických skupinách bez ohledu na rozdíly mezi nimi a s dosahovanými výsledky panovala patrně všeobecná spokojenost. Širší klinické využití v rámci medicíny založené na důkazech však vyžaduje srovnatelnost nejen v rámci jednotlivých metod, ale i mezi metodami. Z takové srovnatelnosti pak vyplynou jednotné referenční intervaly nebo rozhodovací limity. Přístup si vynucuje hodnocení systematických chyb (bias) a k tomu zatím nemají organizátoři EHK nástroje a kritéria. Především chybí cílové hodnoty na bázi mezinárodně schválené referenční metody. Narůstá počet laboratoří, které používají namísto málo specifických imunochemických metod specifitější analytické technologie LC-MS/MS, ale ani to nepřináší zatím žádoucí zlepšení. Důvodem je neexistence, respektive nepoužívání, referenčních materiálů patřící k metrologické třídě a referenčních metod a z toho plynoucí nedostatek metrologické návaznosti pracovních kalibrátorů.

Zásadní význam metrologicky korektní kalibrace demonstrovali pracovníci programu DEQAS, když porovnali výsledky účastníků používajících metodu LC-MS/MS, dosažené kalibrací „in house“ a s použitím jednotného, organizátory poskytnutého kalibrátoru firmy Chromsystems. Výsledkem aplikace jednotného kalibrátoru bylo zlepšení reprodukovatelnosti z 16,4 % na 10,4 % [7].

V období let 2008–2010, kdy nárůst klinického zájmu o vitamin D ústil do snah o urychlený začátek standardizace jeho měření, došlo však paradoxně – alespoň v České republice určitě – spíše ke zhoršení stavu analytických měření. Pokles reprodukovatelnosti, pozorovaný v kontrolních programech SEKK a DGKL, to ukazuje průkazně u systémů měření Roche, které v Německu a České republice dominují. V programu SEKK se reprodukovatelnost výsledků Roche v roce 2010 změnila na hodnotu CV% = 16 z hodnoty CV% 2008 = 6–11 v roce 2008. V programu DGKL se to projevilo ještě výrazněji. Hodnoty CV% = 15–19 z roku 2008 se v roce 2010 změnilly na CV% = 32–37.

## Metody měření

Podíváme-li se do kompletního seznamu prací, které se zobrazí v databázi Pubmed po zadání hesla „Vitamin D, analytical methods“ uvidíme, že zpočátku dominují chromatografické metody, zatímco imunoanalytické metody se začínají objevovat až v posledních 5 letech. To je neklamný příznak reakce výrobců diagnostik na zvýšené požadavky na klinické laboratoře. Odráží se v rychlém vývoji a produkci diagnostik založených na imunochemických metodách, jednoduše použitelných v běžné rutinní klinické laboratoři a dobře prodejných na trhu.

V České republice zatím dominuje diagnostikum Roche, údajně stanovující 25-OH D<sub>3</sub>. Finští autoři prokázali jeho velmi dobrou srovnatelnost s metodou LC-MS/MS [8]. V kontrolním programu SEKK byla však ověřena jeho velmi dobrá reprodukovatelnost a analytická bezproblémovost pouze v roce 2008. Poté, co byla uvedena na trh nová diagnostická souprava s monoklonální reagenční protilátkou, kvalita značně poklesla. Nový kit nebyl patrně dostatečně validovaný. V současnosti se na trhu objevují nové diagnostické kity, založené na imunochemických stanoveních, nabízené výrobcí Abbott a Siemens.

Srovnatelnost separačních a imunochemických metod sledovalo několik studií, v nichž bylo dosaženo výsledků dosvědčujících její nedostatečnost, odpovídající nízkému stupni standardizace. Při hodnocení srovnávacích experimentů mezi metodami LC-MS/MS a imunochemickými metodami je nutné mít na paměti, že u separační metodologie se měří jiné analyty (25-OH D<sub>2</sub>+25-OH D<sub>3</sub>) než u metod imunochemických (málo specifikovaný analyt 25-OH D), takže podmínky srovnatelnosti mezi metodami jsou od počátku problematické.

Výsledky porovnání metody LC-MS/MS a imunochemické luminiscenční metody, sledované švédskými autory na souboru dospělých dvojčat, vykázaly cca o 40 % vyšší výsledky u metody LC-MS/MS [9]. Při zvolené hodnotě cut-off 50 nmol/l bylo jako nedostatek vitamínu D klasifikováno 8 % členů souboru při použití separační metody, zatímco u téhož souboru při imunochemické metodě to bylo plných 43 %.

Při srovnání výsledků souboru pacientů dosažených metodami Diasorin Liaison, Elecsys Diasorin RIA a Chromsystems HPLC byla průměrná nejistota pro koncentrace cca 35 nmol/l 19,4% a pro 75,5 nmol/l 16%. To znamená, že v laboratořích, které používají tyto srovnávané metody, by mělo být bráno do úvahy, že např. hodnoty 80 nmol/l a 100 nmol/l mají stejný klinický dopad a že fixní hodnoty cut-off jsou při daném stavu analytiky iluzorní a hrubě orientační [10].

Binkley et al. [11] vyhodnotili mezilaboratorní a mezimetodický experiment s osmi laboratořemi, používajícími tři metody (LC-MS/MS, HPLC, Diasorin). K porovnání bylo použito 25 různých směsných sér s velmi širokým intervalem poměrů 25-OH D<sub>3</sub> a 25-OH D – od nulové ho množství 25-OH D<sub>2</sub> až po jeho cca 95% obsah.

Mezi třemi uvedenými metodami se vyskytují systematické difference. Například pozitivní bias cca 18% u LC-MS/MS vůči HPLC a cca 5% u imunochemické metody Liaison vůči HPLC. Úroveň mezilaboratorní porovnatelnosti však byla horší u LC-MS/MS (n = 3) než u laboratoří používajících Liaison (n = 4). Příčinou je, že laboratoře používají Liaison jako jednotný firemní kalibrátor, kdežto laboratoře s metodou LC-MS/MS používaly tři různé kalibrátory. Problém by vyřešila kalibrace s návazností na referenční materiál SRM NIST 972 dostupný od roku 2010. Klinické dopady nesrovnatelnosti jsou i zde jednoznačně prokazatelné a velmi významné. Při volbě hodnoty cut-off 75 nmol/l v případě metody HPLC by odpovídající virtuální hodnota pro LC-MS/MS byla 89 nmol/l. Vliv rozdílného množství 25-OH D<sub>2</sub> a 25-OH D<sub>3</sub> na srovnatelnost nebyl jednoznačně patrný.

V další práci byla zjištěna mezi metodou LC-MS/MS a Liaison poměrně nízká hodnota korelačního koeficientu Demingovy regresní analýzy  $r = 0,89$  [12]. Na rozdíl od předchozích srovnávacích experimentů nebyla pozorována systematická pozitivní difference mezi metodou LC-MS/MS a imunochemickou metodou Liaison, ale systematické difference výsledků obou metod byly vcelku rovnoměrně rozděleny mezi pozitivní a negativní hodnoty. U 71 % hodnocené nemocniční populace (přes 2500 probandů) byly hodnoty 25-OH D pod 75 nmol/l.

Nedostatečná úroveň srovnatelnosti způsobuje nedostatečnou znalost a hlavně platnost (nějaké hodnoty jsou v dokumentaci výrobců uvedeny vždy) referenčních intervalů, rozhodovacích mezí a potřebných dávek k suplementaci.

V metrologicky zaměřené publikaci vypočetli autoři, že bias -10 % patrně působí nárůst falešně pozitivních klinických klasifikací o 40–60 % (podle zvolené hodnoty rozhodovacího limitu), zatímco bias +10 % naopak působí nárůst falešně negativních klasifikací o 14–23 % [13]. Autoři odhadli, že by bylo nezbytné, aby reprodukovatelnost měření nepřevýšila hodnotu CV% = 10 a bias měření nepřekročil hodnotu 5 %.

Mezi výsledky dosaženými separačními a imunochemickými metodami jsou systematické difference dané růzností měřeného analytu a růzností kalibrace. K dosažení lepší porovnatelnosti výsledků je nezbytné v první řadě standardizovat všechny rutinní metody pomocí referenčního materiálu a referenční metody a také lépe definovat, jaký analyt je předmětem našeho měření.

## Reference

Pracovníci NIST (National Institut of Standards and Technology USA) nedávno vyvinuli a publikovali referenční metodu [14]. Je založena na principu kombinace kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) s použitím ionizace APCI (atmospheric pressure chemical ionization), měřením v uspořádání MRM (multiple reagent monitoring), kalibrovaná pomocí certifikovaného referenčního materiálu SRM NIST 972. Metoda vykazuje dobré parametry pravdivosti a preciznosti: hodnota bias (recovery) 92% pro 25-OH D<sub>2</sub> a 97% pro 25-OH D<sub>3</sub> a preciznost CV% < 1.

Při testování této „NIST“ metody v programu DEQAS byly u ní zjištěny v průměru o 11,2 % nižší výsledky než u „konvenčních“ metod LC-MS/MS. Pravděpodobnou příčinou je vznik parazitního iontu s molekulovou hmotností shodnou s jedním fragmentem 25-OH D<sub>3</sub> v procesu fragmentace [15].

Velkou nadějí pro očekávané a tolik potřebné zlepšení srovnatelnosti lze očekávat od nedávno vytvořeného certifikovaného referenčního materiálu NIST-SRM 972 s hodnotami certifikovanými metodou LC-MS/MS, který obsahuje certifikované hodnoty 25-OH D<sub>2</sub>, 25-OH D<sub>3</sub> a 3-epi.25-OH D<sub>3</sub> (<http://www.nist.gov>). Prvním krokem k dosažení standardizace bude odvozování hodnot jejich pracovních kalibrátorů výrobců od tohoto materiálu.

## Stabilita

Pokud analytické metody stanovení 25-OH D nejsou dosud na žádoucí úrovni, jsou naopak jeho preanalytické vlastnosti velmi dobré. Jak 25-OH D<sub>2</sub>, tak i 25-OH D<sub>3</sub> vykazují vysokou stabilitu již při pokojové teplotě [16], vynikající odolnost při transportu vzorků a vůči světlu i UV záření; vzorky snesou bez úhony i mnohonásobné zamrazování a rozmrazování [17]. Jak píše Wielders a Wijnberg, jde o analyt „solid as rock“. Nicméně problémy jsou i zde. Například odběr do gelových zkumavek SST BD firmy Becton Dickinson údajně působí falešně a vysoké zvýšení zdánlivé koncentrace 25-OH D<sub>2</sub>, přičemž hodnota 25-OH D<sub>3</sub> není vůbec ovlivněna [18]

Stabilita a odolnost vůči transportu by mohly hrát velmi pozitivní roli v centralizaci stanovení do specializovaných laboratoří, pokud by si to ekonomická situace vyžádala.

## Dvě imunochemické metody v jedné laboratoři

Paralelní analýza 33 lidských sér v jedné laboratoři provedená dvěma metodami (Roche Elecsys a DiaSorin RIA) postačí k demonstraci zásadních problémů při analýze a interpretaci výsledků 25-OH D, tedy k problémům porovnatelnosti výsledků a platnosti klinických závěrů z nich vyvozovaných.

V pracovní dokumentaci soupravy DiaSorin RIA není explicitně uvedena hodnota referenčního intervalu, ani cut-off, pouze se uvádí mezinárodní konsenzus klasifikace, který stanoví za hraniční hodnotu pro nedostatek vitamínu D 50 nmol/l. Jako analyt je uveden 25-hydroxyvitamin D.

Pracovní návod Roche Elecsys uvádí jako analyt 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> a hodnotu cut-off pro nedostatek vitamínu D 50 nmol/l, tedy stejnou jako u kitu DiaSorin RIA. Průměr měření DiaSorin RIA byl 72 nmol/l, zatímco průměr Roche jen 53 nmol/l. V průměru poskytoval DiaSorin výsledky o 36 % vyšší. Při jednoduché klasifikaci na nedostatek vitamínu D pomocí oběma výrobci uváděného shodného rozhodovacího limitu 50 nmol/l byly jako stav nedostatku vyhodnoceny výsledky 18 pacientů (55 %) na podkladě výsledků Roche, ale jen 8 (24 %) na podkladě výsledků DiaSorin.

## Závěry

25-hydroxyvitamin D je analyt dostatečně stabilní a odolný vůči preanalytickým vlivům. Srovnatelnost výsledků dosažených různými metodami v jednotlivých laboratořích je neakceptovatelně nízká. Důvodem je neexistence návaznosti měření v důsledku absence používání certifikovaného referenčního materiálu a mezinárodní referenční metody. Recentně vyrobený materiál NIST-SRM 972 a vyvinutá referenční metoda NIST mohou být slibným a silným nástrojem zlepšení analytické fáze vyšetření 25-hydroxyvitamínu D. V postanalytické fázi je nejproblematictější otázkou, zda je dobře

znám předmět měření a zda jde o 25-vitamin D<sub>3</sub>, nebo 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub>, popř. o 25-hydroxyvitamin D jako směs vitamínů D<sub>2</sub> a D<sub>3</sub>, s neznámým poměrem obou složek. Z hlediska analytické specifčnosti a znalosti charakteru analytu je nevhodnější k stanovení metoda LC-MS/MS. Imunochemické metody jsou pro svou nenáročnost na kvalifikaci obsluhy vhodnější pro menší a střední klinické laboratoře. Stav a kvalita měření 25-hydroxyvitamínu D jsou doposud kontroverzní a poskytované výsledky nejsou na potřebné úrovni z pohledu medicíny založené na důkazech.

## Literatura

1. **Rollins, G.** Vitamin D testing – what's the right answer? *Clinical Laboratory News*, 2009, 35, 7. Dostupné na [www: http://www.aacc.org](http://www.aacc.org).
2. **El-Khoury, J. M., Reineks, E. Z., Wang, S.** Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues. *Clin. Biochem.* 2011, 44, p. 66–76.
3. **de la Hunty, A., Wallace, A. M., Gibson, S., Vijakainen, M., Lamberg-Albert, C., Ashwell, M.** UK food standards agency consensus report: the choice of method for measuring 25-hydroxyvitamin D to estimate vitamin D status for the UK National Diet and Nutrition Survey).
4. **Stepman, H. C., Vanderroost, S., Stockl, D., Thienpont, L. M.** Full-scan mass spectral evidence for 3-epi-25-hydroxyvitamin D (3) in serum of infants and adults. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2011, 49, p. 253–256.
5. **Carter, G. D.** 25-hydroxyvitamin D assays: the quest for accuracy. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1300–1302.
6. **Singh, R.** Are clinical laboratories prepared for the accurate testing of 25-hydroxyvitamin D? *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 221–222.
7. **Carter, G. D., Jones, J. C.** Use of common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for serum 25-hydroxyvitamin D. *Annals of Clinical Biochemistry*, 2009, 46, p. 79–81.
8. **Leino, A., Turpeinen, U., Koskinen, P.** Automated measurement of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> on the Roche Modular E170 analyzer. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 2059 to 2062.
9. **Snellman, G., Melhus, H., Godeborg, R., Byberg, L., Berglund, L., Wernroth, L., Michaelsson, K.** Determining vitamin D status. A comparison between commercially available assays. *PLOS One*, 2010, 13, p. e11555.
10. **Cavalier, E., Rozet, E., Gadisseur, R., Carlisi, A., Minge, M., Chapelle, J. P. et al.** Measurement uncertainty of 25-OH vitamin D determination with different commercially available kits: impact of the clinical cut offs. *Osteoporosis Int.*, 2010, 21, p. 1047–1051.
11. **Binkley, N., Krueger, D. C., Morgan, S., Wiebe, D.** Current status of clinical 25-hydroxyvitamin D measurement: An assessment of between-laboratory agreement. *Clin. Chim. Acta*, 2010, 411, p. 1976–1982.
12. **French, D., Gorgi, A. W., Ihemetu, K. U., Weeks, M. A., Lynch, K. I., Wu, A. H. B.** Vitamin D status of country hospital patients assessed by the DiaSorin Liaison 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin. Chim. Acta*, 2011, 412, p. 258–262.
13. **Stöckl, D., Sluss, P. M., Thienpont, L. M.** Specification of trueness and precision of a reference measure-

- ment system for serum/plasma hydroxyvitamin D analysis. *Clin. Chim. Acta*, 2009, 408, p. 8–13.
14. **Tai, S. S., Bedner, M.** 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. *Anal. Chem.*, 2010, 82, p. 1942–1948.
  15. **Carter, C. D.** Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr. Drug Targets*, 2011, 12, p. 19–28.
  16. **Wielders, J. P. M., Wijnberg, F. A.** Preanalytical stability of 25 (OH) vitamin D3 in human blood or serum at room temperature. *Clin. Chem.*, 2009, 55, p. 1584–1585.
  17. **Lewis, J. C., Elder, P. A.** Serum 25-OH vitamin D2 and D3 are stable under exaggerated conditions. *Clin. Chem.*, 2008, 54, p. 1931–1932.
  18. **Elder, P. A., Lewis, J. G., King, R. J., Florkowski, C. M.** An anomalous result from gel tubes for vitamin D. *Clin. Chim. Acta*, 2009, 410, p. 95.

Do redakce došlo 21. 3. 2011.

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