

Received: 05.12.2017

Accepted: 20.03.2018

Published: 29.06.2018

Ewelina Stępień¹, Joanna Jerzyńska², Katarzyna Woicka-Kolejwa², Iwona Stelmach²

Ocena surowiczego stężenia 25(OH)D u dzieci z nawracającymi infekcjami z regionu łódzkiego

Serum concentration of 25(OH)D in children with recurrent infections from Łódź Province

¹ Laboratorium Synevo, Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii im. M. Kopernika w Łodzi, Łódź, Polska

² Oddział Kliniczny Interny Dziecięcej i Alergologii, Ośrodek Pediatriczny im. J. Korczaka, Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii im. M. Kopernika, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, Polska

Adres do korespondencji: Prof. dr hab. n. med. Iwona Stelmach, Oddział Kliniczny Interny Dziecięcej i Alergologii, Ośrodek Pediatriczny im. J. Korczaka, Wojewódzkie Wielospecjalistyczne Centrum Onkologii i Traumatologii im. M. Kopernika, ul. Piłsudskiego 71, 90-329 Łódź, tel.: +48 42 207 47 26, faks: +48 42 677 63 58, e-mail: alergol@kopernik.lodz.pl

¹ Synevo Laboratory, Copernicus Memorial Hospital in Łódź, Łódź, Poland

² Department of Paediatrics and Allergy, Korczak Paediatric Centre, Copernicus Memorial Hospital in Łódź, Medical University of Łódź, Łódź, Poland

Correspondence: Professor Iwona Stelmach, MD, PhD, Department of Paediatrics and Allergy, Korczak Paediatric Centre, Copernicus Memorial Hospital in Łódź, Medical University of Łódź, Piłsudskiego 71, 90-329 Łódź, Poland, tel.: +48 42 207 47 26, fax: +48 42 677 63 58, e-mail: alergol@kopernik.lodz.pl

Streszczenie

Witamina D pełni bardzo ważną funkcję w procesach regulacji wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej. Celem niniejszej pracy była ocena surowiczego stężenia metabolitu witaminy D – 25(OH)D – u dzieci z częstymi infekcjami dróg oddechowych. Badanie objęło 296 często chorujących dzieci w wieku od 1. do 18. roku życia, które były hospitalizowane na Oddziale Klinicznym Interny Dziecięcej i Alergologii w celu poszerzenia diagnostyki nawracających infekcji. W badanych surowicach oznaczano wątrobowy metabolit witaminy D – 25(OH)D – w różnych porach roku. U 61% dzieci stwierdzono niskie stężenie 25(OH)D. Wykazano odwrotną korelację stężenia oznaczanej witaminy D z wiekiem pacjenta: im młodsze dziecko, tym wyższe surowicze stężenie kalcydiolu. Nie stwierdzono zależności między stężeniem 25(OH)D a płcią i porą roku, w jakiej dokonywano oznaczeń. Uzyskane wyniki wskazują, że niedobór witaminy D (surowicze stężenie poniżej 30 ng/ml) jest częsty u dzieci z regionu łódzkiego z nawracającymi infekcjami układu oddechowego.

Słowa kluczowe: witamina D, dzieci, nawracające infekcje

Abstract

Vitamin D plays an important role in regulation of innate and acquired immunity. The aim of the study was to assess the serum concentration of a vitamin D metabolite – 25(OH)D – in children with recurrent respiratory tract infections. Two hundred and ninety-six children with recurrent infections, aged 1–18 years, who were hospitalised in the Department of Paediatrics and Allergy for an extended diagnosis of recurrent infections were recruited. The hepatic metabolite of vitamin D, namely 25(OH)D was determined in the analysed sera in different seasons of the year. Sixty-one per cent of the children had a low concentration of 25(OH)D. The vitamin D level was shown to be inversely correlated with the age of the patient; the younger the child, the higher the serum concentration of calcidiol. There was no correlation between the concentration of 25(OH)D and gender or season of the year in which the measurements were done. The results showed that vitamin D deficiency (serum concentration below 30 ng/mL) is common in children with recurrent respiratory tract infections from the region of Łódź.

Keywords: vitamin D, children, recurrent infections

WSTĘP

Niedobory witaminy D mogą być przyczyną nie tylko zaburzeń gospodarki fosforanowo-wapniowej, ale również schorzeń układu oddechowego i chorób atopowych^(1,2). W metaanalizach badań bazy Cochrane, w których wzięto pod uwagę również wyniki badań prowadzonych w ośrodku autorów, potwierdzono duże znaczenie witaminy D w zapobieganiu zaostrzeniom astmy i infekcjom układu oddechowego u dzieci^(3,4).

Witamina D, wytwarzana w skórze pod wpływem promieniowania ultrafioletowego, jest prohormonem. W organizmie ulega podwójnej hydroksylacji – w wątrobie i nerkach, w wyniku czego powstaje 25-hydroksycholekalcyferol [kalcydioł, 25(OH)D, forma najczęściej oznaczana w testach laboratoryjnych] oraz 1,25-dihydroksycholekalcyferol, zwany kalcitriolem [1,25(OH)₂D]⁽¹⁾. Drugim źródłem dostarczenia witaminy D do organizmu jest jej podaż doustna, istotna w europejskiej strefie klimatycznej, gdzie klimat i nasłonecznienie nie sprzyjają syntezie skórnej^(5,6).

Do głównych przyczyn niedoborów witaminy D zalicza się obniżoną syntezę skórną, niedostateczną podaż w diecie i suplementach żywieniowych oraz otyłość. Rzadziej przyczyną niedoboru witaminy D może być defekt receptora dla witaminy D, co skutkuje upośledzoną wrażliwością tkanek docelowych na 1,25(OH)₂D⁽⁷⁾. Dzięki odkryciu receptorów dla witaminy D na komórkach narządów niezwiązanych z procesami mineralizacji kości ujawniono jej nieklasyczne działanie. Gen odpowiedzialny za syntezę białek receptora witaminy D cechuje się polimorfizmem i właśnie tej różnorodności wariantów przypisuje się związek z występowaniem takich schorzeń, jak cukrzyca, osteoporoza, astma czy nowotwory. Udowodniono wpływ witaminy D na modulację odpowiedzi immunologicznej i na hamowanie wytwarzania mediatorów zapalnych w drogach oddechowych, jak również wykazano jej rolę w prewencji astmy⁽⁸⁾. W ośrodku autorów określono związek niedoboru witaminy D z nadreaktywnością oskrzeli, gorszą kontrolą astmy i steroidoopornością⁽⁹⁾.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena surowiczego stężenia metabolitu witaminy D – 25(OH)D – u często chorujących dzieci z regionu łódzkiego, hospitalizowanych na Oddziale Klinicznym Interny Dziecięcej i Alergologii Ośrodka Pediatricznego im. J. Korczaka.

MATERIAŁ

W badaniu wzięło udział 296 często chorujących dzieci (126 dziewczynek i 170 chłopców) w wieku od 1. do 18. roku życia, które były hospitalizowane na Oddziale Klinicznym Interny Dziecięcej i Alergologii w okresie od 01.10.2016 do 01.11.2017 roku w celu poszerzenia diagnostyki nawracających infekcji. W badanych surowicach oznaczano wątrobowy metabolit witaminy D – 25(OH)D⁽¹⁰⁾ – w różnych porach roku: w okresie od stycznia do marca u 94 dzieci,

INTRODUCTION

Vitamin D deficiency may not only distort phosphate and calcium metabolism, but also cause respiratory tract disorders and atopic diseases^(1,2). Cochrane meta-analyses, which also included studies conducted in the authors' centre, have confirmed the significance of vitamin D in the prevention of asthma and respiratory tract infections in children^(3,4).

Vitamin D, which is produced in the skin from ultraviolet radiation, is a prohormone. In undergoes double hydroxylation in the body: in the liver and in the kidneys. This results in the production of 25-hydroxycholecalciferol [calcidiol, 25(OH)D, a form usually assayed in laboratory tests] and 1,25-dihydroxycholecalciferol, called calcitriol [1,25(OH)₂D]⁽¹⁾. Another source of vitamin D is its oral administration, very important in the European climatic zone, where the climate and sunlight exposure do not favour its synthesis in the skin^(5,6).

The main causes of vitamin D deficiency include lower synthesis in the skin, insufficient dietary intake or supplementation and obesity. Vitamin D receptor defect, which impairs target tissue sensitivity to 1,25(OH)₂D, is another, though a rare, cause of deficiency⁽⁷⁾. The discovery of vitamin D receptors on cells of organs that are not related with bone mineralisation has revealed the non-classical action of vitamin D. A gene responsible for the synthesis of vitamin D receptor-related proteins is characterised by polymorphism. It is this diversity of variants that is believed to be associated with the occurrence of diabetes, osteoporosis, asthma or cancer. Evidence has been found that vitamin D impacts the modulation of the immune response and inhibition of proinflammatory mediator production in the airways. Moreover, it has been shown to have a role in asthma prevention⁽⁸⁾. In the authors' centre, it has been found that vitamin D deficiency is associated with bronchial hyperresponsiveness, worse asthma control and steroid-resistance⁽⁹⁾.

AIM OF THE STUDY

The aim of the study was to assess the serum concentration of a vitamin D metabolite – 25(OH)D – in children with frequent respiratory tract infections from the region of Łódź, Poland. The children were hospitalised at the Department of Paediatrics and Allergy of Korczak Paediatric Centre.

MATERIAL

Two hundred and ninety-six children (126 girls and 170 boys) with recurrent infections, aged 1–18 years, who from 1 October 2016 to 1 November 2017 were hospitalised in the Department of Paediatrics and Allergy for an extended diagnosis of recurrent infections were recruited. The serum level of the hepatic vitamin D metabolite, i.e. 25(OH)D⁽¹⁰⁾, was determined in different seasons of the

Grupy wiekowe Age groups	Liczba dzieci Number of children	Dziewczynki Girls	Chłopcy Boys
I: 0–3 lata I: 0–3 years	118	38	80
II: 4–6 lat II: 4–6 years	74	38	36
III: 7–9 lat III: 7–9 years	44	20	24
IV: 10–12 lat IV: 10–12 years	21	13	8
V: 13–15 lat V: 13–15 years	18	10	8
VI: 16–18 lat VI: 16–18 years	21	7	14

Tab. 1. Podział badanych dzieci na grupy z uwzględnieniem wieku i płci

Tab. 1. Groups of examined children according to age and gender

od kwietnia do czerwca u 55, od lipca do września u 41, od października do grudnia u 106. Pacjentów podzielono na sześć grup wiekowych (tab. 1).

METODY

Oznaczenia witaminy prowadzono przy użyciu aparatu IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D^s. Zestaw do oznaczeń 25(OH)D opierał się na technice chemiluminescencji. Próbkę uzyskaną od pacjenta poddawano etapowi wstępnej obróbki umożliwiającej denaturację białka wiążącego witaminę D (vitamin D binding protein, VDBP). Tak przetworzone próbki były neutralizowane w buforze oznaczenia, a następnie dodawano do nich swoiste przeciwciała, skierowane przeciwko 25(OH)D i wyznakowane akrydyną. Po etapie inkubacji dodawano cząstki magnetyczne związane z 25(OH)D. Po kolejnym etapie inkubacji cząstki magnetyczne były „wychwytywane” z użyciem magnesu i przeprowadzano etap płukania w celu usunięcia niezwiązanego analitu. Ilość światła emitowanego przez znacznik akrydynowy była odwrotnie proporcjonalna do stężenia 25(OH)D w próbce wyjściowej. Jako interpretację wyniku przyjęto wartości stężeń witaminy D podane w tab. 2. W opracowaniu statystycznym wyników wykorzystano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) Kruskala–Wallisa dla pomiarów powtarzalnych oraz – w celu oceny korelacji liniowych – nieparametryczny test Spearmana. Za próg istotności statystycznej przyjęto $p = 0,05$.

WYNIKI

Spośród wszystkich hospitalizowanych 296 dzieci u 179 (61%) stwierdzono niskie stężenie witaminy D, u 111 (37%) było ono optymalne, a u 6 (2%) wysokie (ryc. 1). Nie wykazano istotnego wpływu pory roku na stężenie witaminy D (ryc. 2). Nie odnotowano istotnej statystycznie zależności między stężeniem witaminy D a płcią dzieci.

Uzyskano istotną statystycznie odwrotną korelację pomiędzy wiekiem dzieci a surowiczym stężeniem witaminy D: u młodszych dzieci obserwowano wyższe stężenia 25(OH)D ($p < 0,01$, $R = -0,85$) (ryc. 3 A i B).

Interpretacja wyniku Interpretation	Stężenie witaminy D Vitamin D level
Niskie Low	<30 ng/ml <30 ng/mL
Optymalne Optimal	30–50 ng/ml 30–50 ng/mL
Wysokie High	>50 ng/ml >50 ng/mL

Tab. 2. Interpretacja wartości stężeń witaminy D u badanych dzieci⁽¹¹⁾

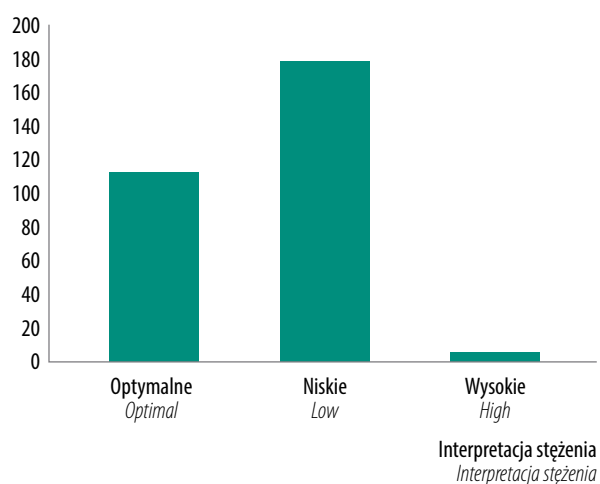
Tab. 2. Vitamin D values in the studied children⁽¹¹⁾

year: from January to March in 94 children, from April to June in 55 children, from July to September in 41 children and from October to December in 106 children. The patients were divided into six age groups (Tab. 1).

METHODS

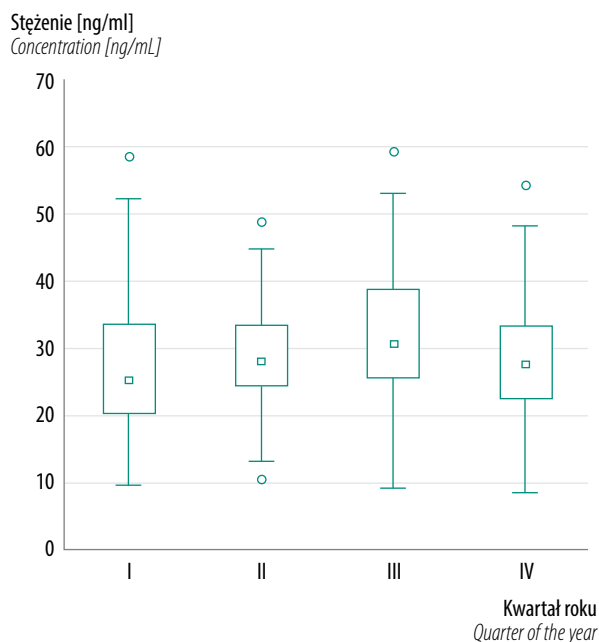
Vitamin D assays were performed with the use of the IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D^s system. The 25(OH)D assay was based on the chemiluminescence technology. A sample from the patient was initially pre-treated for vitamin D binding protein (VDBP) denaturation. Such samples were neutralised in an assay buffer, and specific anti-25(OH)D antibodies labelled with acridinium were added. After an incubation stage, magnetic particles linked to 25(OH)D were added. Following another incubation stage, the magnetic particles were captured using a magnet, and a washing stage was performed to remove any unbound analyte. The light emitted by the acridinium label was inversely proportional to the concentration of 25(OH)D in the original sample. The results were interpreted based on vitamin D concentration values presented in Tab. 2.

Liczba obserwacji
Liczba obserwacji



Ryc. 1. Interpretacja wyniku oznaczenia stężenia witaminy D u hospitalizowanych dzieci

Fig. 1. Vitamin D values in the hospitalised children

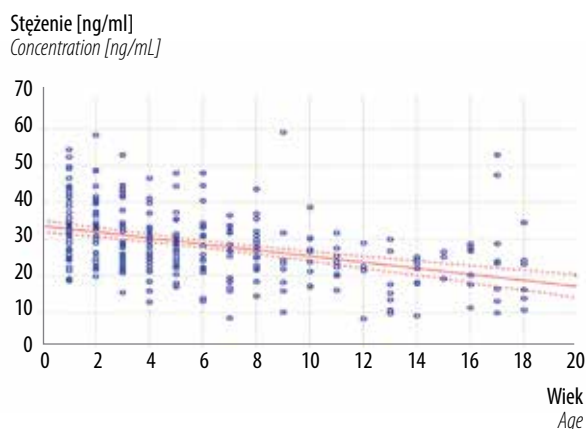


Ryc. 2. Stężenie 25(OH)D u dzieci w wieku od 1. do 18. roku życia w poszczególnych porach roku

Fig. 2. Concentration of 25(OH)D in children aged 1–18 years according to the season of the year

OMÓWIENIE

Witamina D wpływa plejotropowo na komórki organizmu, bierze udział w regulacji gospodarki wapniowo-fosforanowej, moduluje odpowiedź immunologiczną. W wielu doniesieniach zwracano uwagę na niedostateczne stężenie witaminy D u dzieci^(5,12). W opisywanym badaniu odnotowano niski poziom oznaczanej 25(OH)D u większości hospitalizowanych dzieci często chorujących. Na stężenie witaminy D może wpływać wiele czynników: dieta, pora dnia, ekspozycja na słońce, pora roku, położenie geograficzne, wiek,



Ryc. 3 A. Zależność stężenia witaminy D od wieku pacjenta w latach w całej grupie badanych dzieci (wyniki poszczególnych pacjentów)

Fig. 3 A. Concentration of 25(OH)D according to the age of children (data of individual patients)

The statistical calculations were performed with the use of the Kruskal–Wallis analysis of variance (ANOVA) for repeated measurements and the non-parametric Spearman's test for the assessment of linear correlations. The level of statistical significance was $p = 0.05$.

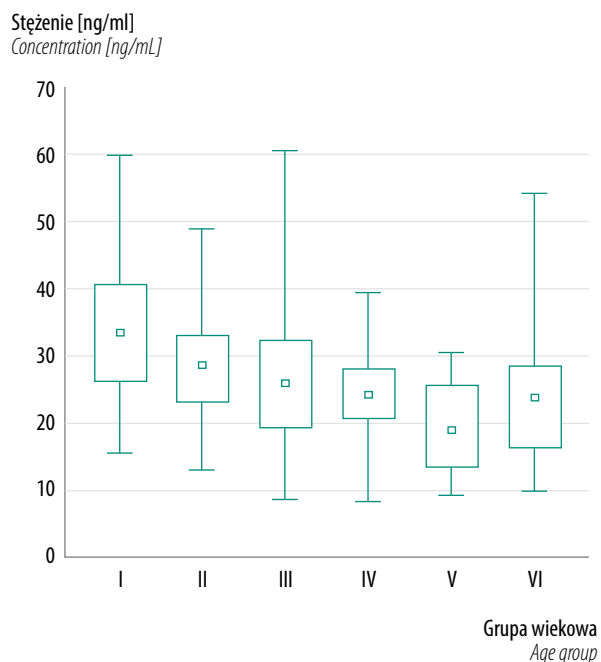
RESULTS

Of all hospitalised patients (296), the level of vitamin D was low in 179 (61%) children, optimal in 111 (37%) children and high in 6 (2%) children (Fig. 1). No significant influence of the season on vitamin D levels was noted (Fig. 2). There was no statistically significant correlation between the vitamin D level and gender.

A statistically significant negative correlation was found between age and the serum vitamin D level: younger children had higher 25(OH)D concentrations ($p < 0.01$, $R = -0.85$) (Fig. 3 A and B).

DISCUSSION

Vitamin D has a pleiotropic effect on the cells in the body; it participates in the regulation of the calcium and phosphate metabolism and modulates the immune response. Numerous authors have underlined too low vitamin D levels in children^(5,12). In the present study, the 25(OH)D levels were low in most of the hospitalised children who frequently caught infections. Vitamin D levels may depend on various factors: diet, time of the day, sunlight exposure, season of the year, geographical region, age, using sunscreens and (or) protective clothing as well as skin pigmentation^(13,14).



Ryc. 3 B. Wartość stężeń witaminy D w zależności od grupy wiekowej, w jakiej były oznaczane

Fig. 3 B. Concentration of 25(OH)D according to the age groups

stosowanie kremów z filtrem i (lub) odzieży ochronnej, a także pigmentacja skóry^(13,14). W obserwacjach własnych nie stwierdzono istotnej zależności surowiczych stężeń witaminy D od pory roku, w jakiej dokonywano oznaczeń, ani od płci dzieci. Wykazano natomiast korelację między stężeniem oznaczanego parametru a wiekiem dziecka: im młodsza grupa wiekowa, tym wyższe stężenie kalcydiolu. Może się to wiązać z faktem, że najmłodsze dzieci są poddawane suplementacji częściej niż dzieci starsze, oraz tym, że kładzie się coraz większy nacisk na suplementację kobiet w ciąży^(3,11). Należy podkreślić, że oznaczanie witaminy D w surowicy jest procedurą trudną; wpływa na to duża hydrofobowość witaminy D, co oznacza możliwość interferencji licznych składników surowicy i występowanie we krwi pochodnych witaminy D. Przeprowadzone w opisywanym badaniu oznaczenie przy użyciu IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D^s zostało wystandaryzowane z zastosowaniem metody chromatografii cieczowej z rozcieńczaniem izotopów, sprzężonej z tandemową spektrometrią mas [*isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS) 25(OH)D reference method procedure (RMP)*]. Metodę ID-LC-MS/MS 25(OH)D RMP cechuje spójność z materiałem odniesienia National Institute of Standards and Technology Standard Reference Material (NIST SRM) 2972^(10,15). Metoda oznaczania witaminy D zastosowana w prezentowanym badaniu jest bardzo nowoczesna, wykazuje wysoką i porównywalną powtarzalność i odtwarzalność w materiale pediatricznym, charakteryzuje się niskim błędem oznaczeń (<8%), dlatego też należy przyjąć, że wyniki oznaczeń stężenia witaminy D uzyskane w niniejszej pracy są wiarygodne.

Biorąc pod uwagę częste występowanie zakażeń układu oddechowego u badanych pacjentów, należałoby odpowiedzieć na pytanie, czy obserwowany u nich niedobór witaminy D jest przyczyną, czy też skutkiem licznych infekcji dróg oddechowych. Uzasadnione wydaje się dalsze badanie konsekwencji niedoboru witaminy D w różnych chorobach.

WNIOSKI

1. U 61% dzieci z regionu łódzkiego z nawracającymi infekcjami układu oddechowego hospitalizowanych w ośrodku autorów stwierdzono niskie stężenie 25(OH)D w surowicy krwi (<30 ng/ml).
2. Wykazano odwrotną korelację stężenia oznaczanej witaminy D w zależności od wieku pacjenta – im młodsze dziecko, tym wyższe stężenie kalcydiolu w pobranej surowicy.
3. Nie odnotowano zależności między stężeniem 25(OH)D a płcią i porą roku, w jakiej dokonywano oznaczeń.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

Źródło finansowania

Praca została sfinansowana przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi, grant nr 503/2-056-01/503-01.

Our observations showed no significant correlations between the serum vitamin D level and the season of the year in which assays were made or patients' gender. However, correlations were noted between age and the concentration of the studied parameter: the younger the patients, the higher the calcidiol levels. This may be associated with the fact that the youngest children are given vitamin D supplementation more often than older children and that supplementation during pregnancy is more and more often emphasised^(3,11).

It should be underlined that the vitamin D assay from the serum is a difficult procedure. This is related with high vitamin D hydrophobicity which translates into potential interference of various serum components and the presence of vitamin D derivatives in blood. The assay with IDS-iSYS 25-Hydroxy Vitamin D^s has been standardised using isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (ID-LC-MS/MS) 25(OH)D reference method procedure (RMP). The ID-LC-MS/MS 25(OH)D RMP method is characterised by consistency with the reference material of the National Institute of Standards and Technology Standard Reference Material (NIST SRM) 2972^(10,15). The method of vitamin D assay employed in the presented study is innovative. It exhibits high and comparable reproducibility and repeatability in the paediatric material and is characterised by a low assay error (<8%). That is why, the assay results presented in this study should be deemed reliable.

Taking into account the frequency of respiratory tract infections in the investigated patients, one should consider whether the observed vitamin D deficiency is a cause or an effect of numerous respiratory tract infections. Further investigations addressing the consequences of vitamin D deficiency in different diseases seem justified.

CONCLUSIONS

1. Low serum 25(OH)D levels (<30 ng/mL) were observed in 61% of the children with recurrent respiratory tract infections from the region of Łódź, Poland, who were hospitalised at the authors' centre.
2. The vitamin D level was shown to be inversely correlated with the age of the patient; the younger the child, the higher the serum concentration of calcidiol.
3. There was no correlation between the concentration of 25(OH)D and gender or season of the year in which the measurements were done.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest.

Funding/Support and role of the sponsor

The study was financed by the Medical University of Lodz; grant No. 503/2-056-01/503-01.

Piśmiennictwo / References

1. Rustecka A, Jung A, Kalicki B: Znaczenie witaminy D w chorobach atopowych u dzieci. *Pediatr Med Rodz* 2013; 9: 41–45.
2. Stelmach I, Majak P, Jerzyńska J et al.: Cord serum 25-hydroxyvitamin D correlates with early childhood viral-induced wheezing. *Respir Med* 2015; 109: 38–43.
3. Jolliffe DA, Greenberg L, Hooper RL et al.: Vitamin D supplementation to prevent asthma exacerbations: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir Med* 2017; 5: 881–890.
4. Martineau AR, Jolliffe DA, Hooper RL et al.: Vitamin D supplementation to prevent acute respiratory tract infections: systematic review and meta-analysis of individual participant data. *BMJ* 2017; 356: i6583.
5. Rustecka A, Jung A, Jobs K et al.: Ocena stężeń witaminy D w surowicy dzieci z alergią. *Pediatr Med Rodz* 2016; 12: 85–93.
6. Morris HA: Vitamin D: a hormone for all seasons – how much is enough? *Clin Biochem Rev* 2005; 26: 21–32.
7. Thieden E, Philipsen PA, Wulf HC: Ultraviolet radiation exposure pattern in winter compared with summer based on time-stamped personal dosimeter reading. *Br J Dermatol* 2006; 154: 133–138.
8. Szodoray P, Nakken B, Gaal J et al.: The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* 2008; 68: 261–269.
9. Majak P, Olszowiec-Chlebna M, Smejda K et al.: Vitamin D supplementation in children may prevent asthma exacerbation triggered by acute respiratory infection. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127: 1294–1296.
10. Holick MF: Vitamin D: photobiology, metabolism, etc. In: Favus MJ (ed.): *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 3rd ed., American Society for Bone and Mineral Research, Lippincott-Raven, Philadelphia 1996: 74–81.
11. Płudowski P, Karczmarewicz E, Chech-Kowalska J et al.: Nowe spojrzenie na suplementację witaminą D. *Stand Med, Pediatr* 2009; 6: 23–41.
12. Chlebna-Sokół D, Golec J, Karalus J: Suplementacja witaminy D u dzieci i młodzieży w Polsce. *Stand Med, Pediatr* 2012; 9: 701–704.
13. Holick MF: Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004; 80 (Suppl): 1678S–1688S.
14. Salih FM: Effect of clothing varieties on solar photosynthesis of previtamin D₃: an *in vitro* study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; 20: 53–58.
15. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW et al.: Vitamin D Standardization Program (VDSP): Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2012; 243: 32–40.