

Elazığ Bölgesinin 25 Hidroksivitamin D Düzeylerinin Değerlendirilmesi ve Populasyona Dayalı Yeni Referans Aralıklarının Belirlenmesi

Zekiye ÇATAK^{1,a}

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Biyokimya Bölümü, Elazığ, Türkiye

ÖZET

Amaç: Son zamanlarda vitamin D eksikliğinin birçok ciddi hastalıkla ilişkili olabileceği tartışılmaktadır. Bu çalışmada amacımız, Elazığ popülasyonuna ait vitamin D seviyelerini değerlendirmek ve indirek metotla popülasyona dayalı yeni referans aralıklarını belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu retrospektif çalışmaya 2013 Temmuz ayı itibarıyla yaklaşık olarak 2 yıl süreyle Elazığ Eğitim Araştırma Hastanesine başvuran ve 25(OH)vit D testi çalışılmış olan hastalar dahil edildi. 25(OH)vitD düzeyleri anlaşmalı laboratuvarında Siemens ADVIA Centaur XP sistemi kullanılarak CLIA yöntemi ile analiz edildi. Laboratuvar bilgi sisteminden retrospektif olarak elde edilen veriler dışlama kriterlerine göre düzenledikten sonra analiz edildi. Hastalar yaş, cinsiyet ve mevsimlere göre gruplara ayrıldı. Referans aralığı non-parametrik yöntemle hesaplandı.

Bulgular: Vitamin D eksikliği için cut-off değeri 20 ng/ml olarak kabul edildiğinde genel popülasyonun %78.2'sinde vitamin D eksikliği belirlendi. 2.5-97.5 persentil aralığı için 5,20-35,20 ng / ml olarak belirlenen referans aralıklarının üretici firma tarafından önerilen referans aralıklarından daha düşük olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Bu çalışmada, Elazığ bölgesinde geniş bir popülasyonun 25(OH)vitD seviyeleri değerlendirildi. Aynı zamanda, klinik tanı ve tedavi üzerine olumlu katkı sağlayacağına inandığımız yeni referans aralıkları belirlendi. Yine de bu çalışmanın sağlıklı popülasyonda da yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

Anahtar Sözcükler: Vitamin D Eksikliği, Vitamin D Referans Aralığı, Elazığ.

ABSTRACT

Evaluation of 25 Hydroxyvitamin D Levels and Determination of the New Population-Based Reference Ranges in the Elazığ Region

Objective: Recently, it is discussed that deficiency of vitamin D may be related to a variety of serious diseases. Our aim in this study is to evaluate 25(OH)vitD levels of Elazığ population and to determine new reference values based on the population with indirect methods.

Material and Method: As of July 2013 for a period of approximately two years, 25 (OH)vitD test studied patients admitted to Elazığ Education and Research Hospital were included in this study. The 25(OH)vitD levels were analyzed using the Siemens ADVIA Centaur XP system by CLIA method in the contracted laboratory. Retrospectively obtained data from the laboratory information system were analyzed after editing according to the exclusion criteria. Patients were divided into groups according to age, sex and season. The reference range was calculated by non-parametric method.

Results: When the cut-off value for 25(OH)vitD deficiency is accepted as 20 ng/ml, it was observed that vitamin D deficiency was present in %78.2 of general population. The determined reference intervals for 2.5-97.5 th percentil range were 5.20-35.20 ng/ml which are lower than the recommended reference intervals by manufacturer.

Conclusion: In this study, 25(OH)vitD levels were assessed in the a large population of Elazığ region. At the same time, new reference ranges were determined which we believe will make a positive contribution on the clinical diagnosis and treatment. Nevertheless, we believe that this work should be carried out also in the healthy population.

Keywords: Deficiency of Vitamin D, Reference Interval of Vitamin D, Elazığ.

D vitamininin vücudun kalsiyum-fosfor dengesinin sağlanmasında ve kemik mineralizasyonunda anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Steroid yapıdaki vitaminin Ergokalsiferol (D2 vitamini, bitkisel kaynaklı) ve kolekalsiferol (D3 vitamini, hayvansal kökenli) olmak üzere iki formu mevcuttur. Kolekalsiferol 290-310 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınların etkisiyle deride 7-dehidrokolesterolden sentezlenmektedir. Daha sonra hem vitamin D2 hem vitamin D3 karaciğerde 25- hidroksilaz enzimi ile 25-hidroksikolekalsiferole (25(OH)vitD3 ve 25(OH)vitD2'ye) bu da böbreklerde 1-alfa-hidroksilaz enzimi sayesinde biyolojik aktif formu olan 1,25 hidroksivitamin D'ye (kalsitriol, 1,25(OH)vitD) dönüştürülür (1). Bu aktif formun

ölçümü; kısa yarı ömrü, plazmada 25(OH)vitD' ye göre 1000 kat daha düşük bulunması ve parathormon etkisiyle hızla seviyelerinin değişmesi gibi nedenlerden ötürü vücuttaki D vitamini seviyelerinin belirlenmesi için uygun değildir (1, 2).

D vitamini eksikliğinin çocuklarda raşitizm, erişkinlerde osteomalazi gibi birtakım kemik hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir (3). Ancak günümüzde hafıza azalması, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, çeşitli kanserler, bazı otoimmün hastalıklar gibi ciddi pek çok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (3-7). Dolayısıyla vitamin D seviyelerinin değerlendirilmesinin önemi de gün geçtikçe artmaktadır. İnsan vücudunda vitamin D du-

^aYazışma Adresi: Zekiye ÇATAK, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Biyokimya Bölümü, Elazığ, Türkiye

Tel: 0505 839 7007

Geliş Tarihi/Received: 25.07.2016

e-mail: drcatk@hotmail.com

Kabul Tarihi/Accepted: 07.08.2017

rumunun en iyi göstergesi total 25(OH)vitD düzeylerinin ölçümüdür (8-11).

Referans aralığı, referans kişilerden oluşturulmuş belli bir populasyonda, belirlenmiş bir numune grubu için bazı istatistiksel yöntemler kullanılarak tanımlanmış üst ve alt limitlerdir (12). Testlere ait referans aralıklarının belirlenmesi klinik değerlendirme için oldukça önemlidir ve her laboratuvarın kendi referans değerlerini belirlemesi tavsiye edilmiştir (13-15). Populasyonu en iyi temsil edecek grubun seçiminde direk veya indirek metod kullanılır. Direk metodla kişiler önceden belirlenmiş kriterlere göre seçilip testler analiz edilir ve analiz sonuçlarına göre referans aralık belirlenir. İndirek metotta laboratuvarın bilgi sisteminden belli kural dahilinde elde edilen test sonuçları belli istatistiksel yöntemlerle değerlendirilerek referans aralık belirlenir (14). Referans aralık hesaplamasında kullanılacak olan güvenilir istatistiksel metodların kullanılması önemlidir. En yaygın kullanılanları parametrik ve nonparametrik metodlardır (14).

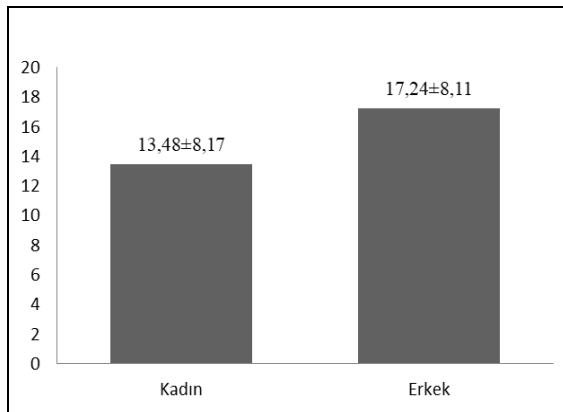
Bu çalışmada Elazığ ilinin vitamin D düzeylerinin değerlendirilmesi ve bu verilere göre 25(OH)vitD testinin populasyona dayalı yeni referans aralıklarının indirek metodla belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya 2013 Temmuz ayı itibarıyla yaklaşık olarak 2 yıl süreyle Elazığ Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran ve 25(OH)vitD testi çalışılmış olan hastalar dahil edildi. Testler anlaşmalı laboratuvarlarda Siemens ADVIA Centaur XP cihazında Siemens ADVIA Centaur marka kit ve kalibratörler kullanılarak CLIA yöntemiyle çalışıldı. Serum 25(OH)vitD ölçümleri için ölçüm aralığı 4.2 ile 150 ng/ml idi. Test sonuçları laboratuvar bilgi sisteminden retrospektif olarak alındı. Bu sınırların dışında kalan değerler çalışmaya dahil edilmedi. Böbrek hastalıklarının ve uzun süreli ilaç tedavisi

Tablo 1. Uç değerler çıkarılmadan önce – sonra ve cinsiyete göre vitamin D istatistikleri.

	n(%)	Mean (ng/ml)	SD	Median	Variance	Range	Minimum	Maksimum	Interquartil range (IQR)
Uç değerler çıkarılmadan önce	3153	15.25	13.13	10.9	172.5	134.7	4.4	138.7	12.38
Uç değerler çıkarıldıktan sonra	2742	14.10	8.28	11.40	68.62	36.28	5.0	41.28	11.20
Kadın	2291(83.6)	13.48	8.17	10.60	66.86	36.28	5.01	41.28	10.10
Erkek	451(16.4)	17.24	8.11	16.40	65.95	35.31	5.0	40.31	12.60



Şekil 1. Cinsiyete göre ortalama 25(OH)vitD seviyeleri (ng/ml).

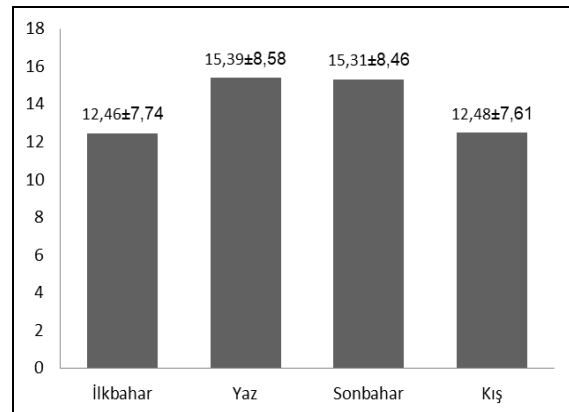
lerinin D vitamini metabolizması üzerindeki etkileri göz önüne alınarak nefroloji ve onkoloji hastaları, pediatrik yaş grubu ile hiperparatiroidizm tanılı hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Birden fazla 25(OH)vitD testi sonucu olan hastalarda ilk test sonucu çalışmaya dahil edildi diğer sonuçları çalışma dışı bırakıldı. Hastalar yaş gruplarına (18-30 yaş, 31-40 yaş, 41-50 yaş, 51-60 yaş, 61-70 yaş ve >70), cinsiyet ve testin yapıldığı mevsime göre (ilkbahar, yaz, sonbahar, kış) alt gruplara ayrıldı.

İstatistiksel Analizler:

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 20 programı kullanılarak uç değerler uzaklaştırıldıktan sonra yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) incelendi. İkili karşılaştırmalar Student-t testi ile yapıldı. İkiden fazla grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi yapıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile değerlendirildi. Varyansların homojen dağılmadığı durumlarda Welch ANOVA testi kullanıldı. Gruplar arası fark olduğunda ikili karşılaştırmalar için post-hoc testlerden yerine göre Tamhane's T2 ve Tukey testi kullanıldı. P-değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar olarak değerlendirildi. Referans değerlerin belirlenmesinde nonparametrik yüzde tahmini yöntemi baz alındı. Dağılımın %95'ini içine alan formüller (alt değer = 0,025 x (n+1), üst değer = 0,975 x (n+1)) kullanılarak hesaplandı (16, 17).

SONUÇLAR

Genel populasyon verileri ile yaş grupları, cinsiyet ve mevsimlere göre yapılan analizler Tablo 1, 2 ve 3'te ve Şekil 1, 2, 3'de gösterildi.



Şekil 2. Mevsimlere göre ortalama 25(OH)vitD seviyeleri ng/ml.

Tablo 2. Uç değerler uzaklaştırıldıktan sonra mevsimlere göre vitamin D seviyelerinin hesaplanması.

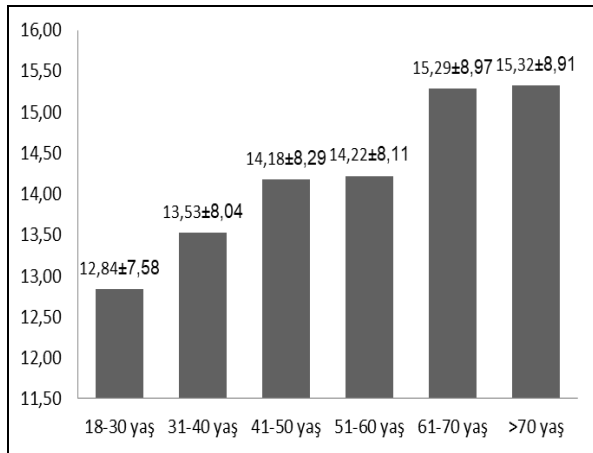
	İlkbahar	Yaz	Sonbahar	Kış
N(%)	580(21.2)	761(27.8)	789(28.8)	612(22.3)
Mean(ng/ml)	12.46	15.39	15.31	12.48
SD	7.74	8.58	8.46	7.6
Median	9.50	12.90	13.10	9.70
Variance	59.92	73.66	71.62	57.92
Range	35.40	35.80	36.28	36.10
Minimum	5.01	5.0	5.01	5.0
Maksimum	40.40	40.80	41.28	41.10
Interquartil range (IQR)	8.88	12.64	12.90	9.70

Başlangıçta 18-93 yaş arası 3153 adet hastaya ait test sonucuna ulaşıldı. SPSS 20 paket programı kullanılarak uç değerler uzaklaştırıldıktan sonra 2291 kadın ve 451 erkek olmak üzere toplamda 2742 test sonucuna ulaşıldı. Kadın ve erkek hastaların yaş ortalamaları sırasıyla 47.20 ± 14.93 ve 47.92 ± 16.18 idi. Vitamin D eksikliği için cut-off değeri 20 ng/ml olarak kabul edildiğinde genel populasyonun %78.22'si (2145 hasta), erkeklerin %65.18'i (294 hasta), kadınların %80.79'unda (1850 hasta) vitamin D eksikliği tespit edilirken ilkbaharda genel populasyonun %83.96'unda (487 hasta), yazın %72.01'inde (548 hasta), sonbaharda %74.52'unda (588 hasta) ve kış mevsiminde ise %85.29'unda (522

Tablo 3. Uç değerler uzaklaştırıldıktan sonra vitamin D seviyelerinin yaşa göre değişimi.

	18-30 yaş	31-40 yaş	41-50 yaş	51-60 yaş	61-70 yaş	>70 yaş
N(%)	415(15.1)	529(19.3)	667(24.3)	553(20.2)	384(14.0)	194(7.1)
Mean(ng/ml)	12.84	13.53	14.18	14.22	15.29	15.32
SD	7.58	8.04	8.29	8.11	8.79	8.91
Median	10.00	10.60	11.70	11.70	12.20	12.70
Variance	57.56	64.79	68.81	65.87	80.53	79.51
Range	35.30	35.80	35.90	36.10	36.28	36.10
Minimum	5.0	5.0	5.0	5.01	5.01	5.0
Maksimum	40.30	40.80	40.90	41.10	41.28	41.10
Interquartil range (IQR)	9.70	10.45	44136	10.80	13.02	13.73

Yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde 18-30 yaş arası grup ile 31-40 yaş arası gruplar, 61-70 yaş arası gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük vitamin D düzeylerine sahipti (sırasıyla $p = 0.001$ ve $p = 0.03$). Beklenenle uyumlu olarak yaz ve sonbahar mevsiminde yapılan 25(OH)vitD ortalamaları ilkbahar ve kış mevsimindeki sonuçlara kıyasla anlamlı derecede yüksekti (sırasıyla $p < 0.001$, $p < 0.001$).

**Şekil 3.** Yaş gruplarına göre ortalama 25(OH)vitD seviyeleri (ng/ml)

hasta) 25(OH)vitD eksikliği saptanmıştır. İndirek metodla genel populasyon için belirlediğimiz referans değerler 5.20-35.20 ng/ml iken kadın ve erkeklerin referans değerleri sırasıyla 5.70-27.30 ng/ml ve 6.40-32.40 ng/ml idi (Tablo 4).

Tablo 4. İndirek metodla %90 güven aralığında 2,5. ve 97,5. persantilde gözlenen değerlere göre belirlenen referans değerleri.

	Yaş ortalaması	2,5. ve 97,5. persantilde gözlenen değerler
Genel	47.32±15.14	5.20-35.20 ng/ml
Kadın	47.20±14.93	5.70-27.30 ng/ml
Erkek	47.92±16.18	6.40-32.40 ng/ml
Mevsimsel		
İlkbahar		5.20-21.60 ng/ml
Yaz		5.38-29.16 ng/ml
Sonbahar		5.30-26.95 ng/ml
Kış		5.20-22.40 ng/ml

Bu değerler, üretici firmanın sağlıklı yetişkinlerden elde edilerek belirlenmiş olduğu 7.4-44.0 ng/ml referans aralığından farklıydı. Cinsiyetler arası karşılaştırmalarda elde edilen fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.001$).

TARTIŞMA

Birçok çalışmada 25(OH)vitD testi için 20 ng/ml'nin altı eksiklik olarak kabul etmektedir. 21-29 ng/ml arası yetersiz olarak tanımlanırken 30 ng/ml ve üzeri tüm çocuklarda ve erişkinlerde yıl boyunca sürdürülmesi tercih edilen seviyelerdir (9, 18). Test sonuçları 20 ng/ml cut-off'a göre değerlendirildiğinde toplumun %78.22'sinde vitamin D eksikliği tespit edildi. Türkiye'nin batı bölgesinde (Balıkesir) yapılan bir başka çalışmada bu oranın %71.23 olduğu ve dünya genelinde de D hipovitaminozunun oldukça yaygın olduğu bildirilmiştir (10, 14, 19). Kadın cinsiyette ve ilkbahar-kış mevsimlerinde 25(OH)vitD eksikliğinin daha yaygın olduğu tespit edildi. Sonuçlarımızla uyumlu olarak kadın cinsiyetin D vitamini eksikliği açısından risk faktörü olduğu daha önceden bildirilmiş olup kış aylarında vitamin D hipovitaminozunun arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (19-23). Her ne kadar daha genç yaş grubunda D hipovitaminozunun daha düşük olduğu bildirilmiş olsa da birçok çalışmada vitamin D seviyelerinin coğrafi bölge, yaş, cinsiyet, ırk, giyinme ve beslenme şekli, kültürel alışkanlıklar, fiziksel aktivite ve yetersiz gün ışığı maruziyeti gibi faktörlerden

etkilendiği bildirilmiştir (19, 23). Yaş gruplarına göre değerlendirildiğinde bizim çalışmamızda 25(OH)vitD seviyeleri daha genç yaş gruplarında (18-30 ile 31-40 arası yaş gruplarında) 61-70 yaş arası gruba göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. Benzer bir çalışmada 25(OH)vitD seviyelerinin 18-65 yaş arası grupta >65 yaş gruba göre daha düşük olduğu belirtilmesine rağmen bu farkın anlamlı olmadığı bildirilmiştir (22). Ancak bu çalışmada genç yaş grubu (18-30 yaş) ile 65 yaş üstü grup karşılaştırması yapılmamıştır. Bu karşılaştırma yapılmış olsaydı sonuçlarının çalışmamızın sonuçları ile benzer olabileceği muhtemeldir. Çalışmamızda ileri yaş grubundaki yüksek vitamin D seviyelerinin, bu yaş gruplarında tedavi amaçlı yapılan D vitamini takviyeleri ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Mevsimsel karşılaştırmalarda elde ettiğimiz sonuçlarımızın daha önce yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak ve yaz ve sonbahar mevsimlerinde anlamlı olarak daha yüksek olduğu tespit edildi (19). Ancak yine de yaz ayı ortalamalarının 20 ng/ml'nin altında olduğu görüldü (Şekil 2).

Laboratuvar test sonuçlarının klinisyenlerce değerlendirilmesinde referans aralıklarının rolü büyüktür. Ancak her laboratuvarın kendi referans aralıklarının belirlenmesi önerilmiş olup bunun için de toplumu en iyi yansıtabilecek referans populasyonun özenle seçilmesi gerektiği açıktır (24). Referans bireyler ya direk metodla analiz öncesinde IFCC ve NCLSI'nin belirlediği birtakım dışlama kriterleri baz alınarak seçilir veya indirek metodla belli kurallar dahilinde iyi düzenlenmiş demografik veri tabanından yararlanılarak seçilir (14). Direk metod uygulaması zor ve maliyeti yüksektir. İndirek metod laboratuvar bilgi sistemindeki veriler kullanılarak seçilmiş referans populasyon aracılığıyla uygun istatistiksel analizlerle referans aralığının hesaplandığı, maliyet ve uygulama kolaylığı sağlayan iyi bir alternatiftir. Bu çalışmada 25(OH)vitD referans aralığı %90 güven aralığında dağılımın %95'ini içine alacak

şekilde hesaplandı (16). Laboratuvarımızda belirlediğimiz referans aralığının üretici firmanın sağlıklı popülasyona dayalı oluşturduğu referans aralığına göre (7.4 - 44.0 ng/mL) düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 4). Bulgularımızla uyumlu olarak kadın cinsiyette 25(OH)vit D referans aralıkları erkeklere göre daha düşüktü. Mevsimsel farklılıklara bağlı olarak 25(OH)vit D'nin referans aralığının değişiklik gösterdiği gözlemlendi (Tablo 4). Günümüzde, ciddi birtakım hastalıkla ilişkili olabileceği tartışılan vitamin D eksikliğinin belirlenmesi ve önlenmesi giderek önem kazanmaktadır (8-11, 19). Bu çalışma ile Elazığ bölgesine ait geniş bir popülasyonda 25(OH)vit D seviyeleri değerlendirildi. 25(OH)vitD seviyelerindeki düşüklüğün dünya genelinde olduğu gibi bu bölgede de yaygın olduğu belirlendi (19). Ülkenin doğu kesiminde yer alan bu popülasyonda ülkenin batı bölgesinde (Balıkesir) yer alan bir diğer popülasyona nispeten vitamin D eksikliğinin daha yaygın olduğu tespit edildi (14).

Çalışmaya dahil edilecek hastalar belirlenirken özellikle vitamin D seviyelerinin düşük çıkmasına neden olabilecek bazı durumlar çalışma dışı bırakıldı. Ancak indirek metodla laboratuvarın bilgi sisteminden veri alınmış olması ve hastane veri tabanı kullanıldığından sağlıklı popülasyon verilerinin elde edilememiş olması yöntemin dezavantajlarıdır. Ancak kolay uygulanabilir ve maliyetinin düşük olması yöntemin tercih edilme nedenlerindedir (14, 25).

Bu çalışma Elazığ bölgesinde 25(OH)vitD seviyeleri hakkında genel bir fikir vermesi ve Türkiye genelinde populasyonun 25(OH)vitD düzeylerinin belirlenmesine katkı sağlaması açısından önemlidir. Ayrıca bölgeden yapılacak benzer çalışmalarla desteklenmesi taktirde, belirlenmiş olan populasyon bazlı referans aralıklarının, rutin laboratuvar kullanıma girebileceği dolayısıyla klinik teşhis ve tedavi üzerine olumlu katkılar sağlayacağı görüşündeyiz.

KAYNAKLAR

1. Ustaalioglu YE, Dirican M. Plazma 25-OH Vitamin D ölçümünde HPLC, CMIA ve ECLIA yöntemlerinin karşılaştırılması. Ulu- dağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2015; 41: 53-8.
2. Souberbielle J-C, Friedlander G, Kahan A, Cormier C. Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. Joint Bone Spine 2006; 73: 249-53.
3. Park S, Kim da S, Kang S. Vitamin D deficiency impairs glucose-stimulated insulin secretion and increases insulin resistance by reducing PPAR-gamma expression in nonobese Type 2 diabetic rats. J Nutritiol Biochem 2016; 27: 257-65.
4. Faridi KF, Lupton J, Martin S, Kulkarni K, Jones S, Michos E. Vitamin D deficiency and non-lipid serum markers of cardiovascular risk: The very large database of lipids study. J Am Coll of Cardiol 2016; 67: 1908.
5. Iniesta RR, Rush R, Paciarotti I, et al. Systematic review and meta-analysis: Prevalence and possible causes of vitamin D deficiency and insufficiency in pediatric cancer patients. Clin Nutr 2016; 35: 95-108.
6. Kuźma E, Soni M, Littlejohns TJ, et al. Vitamin D and memory decline: Two population-based prospective studies. J Alzheimer's Dis 2016; 50: 1099-108.

7. Williams JD, Aggarwal A, Swami S, et al. Tumor autonomous effects of vitamin D deficiency promote breast cancer metastasis. *Endocrinology* 2016; 157: 1341-7.
8. Chen Y, Kinney L, Bozovic A, et al. Performance evaluation of Siemens ADVIA Centaur and Roche MODULAR Analytics E170 Total 25-OH Vitamin D assays. *Clin Biochem* 2012; 45: 1485-90.
9. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009; 19: 73-8.
10. Wagner D, Hanwell HE, Vieth R. An evaluation of automated methods for measurement of serum 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem* 2009; 42: 1549-56.
11. Zerwekh JE. The measurement of vitamin D: analytical aspects. *Ann Clin Biochem* 2004; 41: 272-81.
12. Kaplan LA, Kazmierczak E. *Clinical chemistry: theory, analysis, correlation*: Mosby, 2003: 789-90.
13. Flegar-Meštrić Z, Perkov S, Radeljak A. Standardization in laboratory medicine: Adoption of common reference intervals to the Croatian population. *World J Methodology* 2016; 6: 93.
14. Alpdemir M, Alpdemir MF. Determination of the reference range with the indirect methods of 25-Hydroxyvitamin D3 test in Balıkesir Region, Turkey. *Turk J Med Sci* 2016; 46: 1504-19.
15. CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition*. CLSI Document C28-A3. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008
16. Lumsden J, Mullen K. On establishing reference values. *Canadian J Comparative Med* 1978; 42: 293.
17. Reed AH, Henry RJ, Mason WB. Influence of statistical method used on the resulting estimate of normal range. *Clin Chem* 1971; 17: 275-84.
18. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *American J Clin Nutrition* 2006; 84:18-28.
19. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2009; 20:1807-20.
20. Bouillon RA, Auwerx JH, Lissens WD, Pelemans WK. Vitamin D status in the elderly: seasonal substrate deficiency causes 1, 25-dihydroxycholecalciferol deficiency. *American J Clin Nutr* 1987; 45: 755-63.
21. Moan J, Porojnicu AC, Dahlback A, Setlow RB. Addressing the health benefits and risks, involving vitamin D or skin cancer, of increased sun exposure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008; 105: 668-73.
22. Vurgun E, Evliyaoğlu O, Yıldırım S. Kanıta dayalı laboratuvar: D vitamini yetersizlik sınırlarının belirlenmesi. *Med Bull Haseki* 2016; 54: 76-82.
23. Looker AC, Johnson CL, Lacher DA, Pfeiffer CM, Schleicher RL, Sempos CT. Vitamin D status: United States, 2001–2006. *NCHS Data Brief* 2011; 59: 1-8.
24. Solberg H. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1 The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 337-42.
25. Baadenhuijsen H, Arts J, Somers L, Smit J. Refvalue, a software package to calculate reference intervals from total hospital patient laboratory data. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York; 1984.