

ARTÍCULO ORIGINAL

# Estado del arte en la medición de 25-OH vitamina D y el impacto de la suplementación con calcidiol (D2) o colecalciferol (D3) en la medición con diferentes inmunoensayos.

Fenili, Cecilia Andrea<sup>1\*</sup>; Porta, Margarita<sup>1</sup>; Del Vecchio, Lorena Paula<sup>1</sup>; Nieto Leandro<sup>1</sup>; Torres, Marta Isabel<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa Buenos Aires, Centro de Investigación en Reproducción Humana y Experimental, Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

\*Contacto: Fenili, Cecilia Andrea, CEMIC, Av. Galván 4102 [C.P. 1431]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; cfenili@cemic.edu.ar; cecifenili@hotmail.com.

## Resumen

Introducción: la hipovitaminosis D es considerada un problema de salud a nivel mundial. El metabolito que refleja los niveles de vitamina D en el organismo es la 25-OH-vitamina D total en suero. Colecalciferol (vitamina-D3) y Calcidiol (vitamina-D2) son los compuestos más utilizados en la suplementación de vitamina D. En la medición de 25-OH-vitamina D se observa un reconocimiento diferente para D2 y D3 que explicaría las discrepancias entre los resultados de los inmunoensayos, esto podría llevar a diagnósticos incorrectos. Objetivos: evaluar el desempeño de los inmunoensayos de 25-OH-vitamina D respecto del criterio de calidad del CDC y evaluar el impacto de la suplementación farmacológica en la medición. Materiales y métodos: se analizaron 5 Rondas [años 2014-2018] del Programa Buenos Aires de Evaluación Externa de Calidad (ProgBA-CEMIC) para 25-OH-Vitamina D a través de indicadores de desempeño de los laboratorios usuarios de distintos inmunoensayos y se los comparó con el criterio de calidad del CDC [imprecisión general <10%]. Además se distribuyeron en la Ronda 32 dos muestras séricas, de un paciente suplementado alternativamente con D2 o D3. Resultados: la medición de 25-OH-vitamina D no cumple en todos los casos con el criterio de calidad deseable ( $\pm 10\%$ ). La presencia de D2 o D3 y sus metabolitos en las muestras evidenciaron un reconocimiento diferente de estos suplementos en los inmunoensayos evaluados. Conclusiones: No hubo mejoras significativas en el desempeño de los inmunoensayos en los 5 años evaluados. Sería necesario reevaluar la especificidad de los mismos como factor para su armonización e interpretar los resultados del paciente según el suplemento administrado. **Palabras clave:** 25-OH vitamina D, hipovitaminosis D, inmunoensayos, colecalciferol, calcidiol, control de calidad.

## State of the Art in 25-OH vitamin D measurement and impact of supplementation with calcidiol (D2) or colecalciferol (D3) in different immunoassays.

## Abstract

Introduction: hypovitaminosis D is considered a health problem worldwide. Serum measurement of total 25-OH-vitamin D reflects circulating levels of vitamin D. Cholecalciferol (vitamin-D3) and Calcidiol (vitamin-D2) are the most commonly used compounds in vitamin D supplementation. Discrepancies between immunoassay results may be due to different recognition of D2 and D3, which can lead to incorrect diagnosis. Objectives: to evaluate the performance of the 25-OH-vitamin D immunoassays against CDC quality criteria, and to evaluate the impact of pharmacological supplementation on measurement results. Materials and methods: different 25-OH-Vitamin D immunoassays were assessed by performance indicators derived from External Quality Assessment Scheme (EQAS) results against CDC quality criteria (general inaccuracy <10 %) in 5 Rounds (2014-2018 period) of EQAS Buenos Aires (ProgBA-CEMIC). In addition, two serum samples of the same patient supplemented alternatively with D2 or D3 were distributed in Round 32 (2019). Results: the measurement of 25-OH-vitamin D did not meet the desirable quality criteria in some cases ( $\pm 10\%$ ). The presence of D2 or D3 and their metabolites in the two samples from the same patient showed different recognition of these supplements by the immunoassays evaluated. Conclusions: there were no significant improvements in the performance of the different immunoassays in the 5 years evaluated. It would be necessary to reassess their specificity as a key for their harmonization, and interpret patient results according to the supplement administered. **Keywords:** 25OH Vitamin D, hypovitaminosis D, immunoassays, cholecalciferol, calcidiol, quality control.

**Introducción**

En la última década, se han publicado una gran cantidad de trabajos científicos sobre diversos aspectos relacionados a la vitamina D (VD) que abarcan desde el campo fisiológico y fisiopatológico hasta las dificultades de su medición y su terapéutica.

La VD deriva de dos fuentes principales: sólo un 20-30 % corresponde al aporte exógeno proveniente de la dieta y un 70-80 % es de síntesis endógena, mediante un proceso de fotobiogénesis, por efecto de la luz ultravioleta B (longitud de onda 290-315 nm) sobre la piel, que produce la conversión de su precursor de esteroides, 7-dehidrocolesterol (Figura 1). Por esto, la concentración de VD es altamente dependiente de la dosis de radiación UVB, varía estacionalmente en latitudes distantes del Ecuador [1] y la falta de exposición a la luz solar puede resultar en una hipovitaminosis D. Esta vitamina circula unida a su globulina transportadora (DBP) y ejerce sus funciones biológicas a través de su unión a los receptores específicos (VDR), miembros de la superfamilia de receptores de hormonas esteroideas. Los VDR se expresan en numerosos tejidos y órganos, incluidos el riñón, el hueso, el intestino, el músculo, el páncreas y el sistema nervioso central. La VD pertenece al grupo de vitaminas liposolubles y su principal función es la regulación del metabolismo fosfocálcico junto con la parathormona (PTH). Para ello, actúa sobre la absorción intestinal de calcio, la síntesis y degradación del hueso, así como sobre la excreción renal de calcio. Sin embargo, en los últimos años se han descrito otras acciones: antiproliferativas, inmunomoduladoras, de regulación cardíaca, vascular y sobre la estimulación celular. Se ha demostrado su relación con un aumento del desarrollo de varias enfermedades crónicas, incluidas la esclerosis múltiple, la enfermedad cardiovascular, la diabetes tipo 2, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad

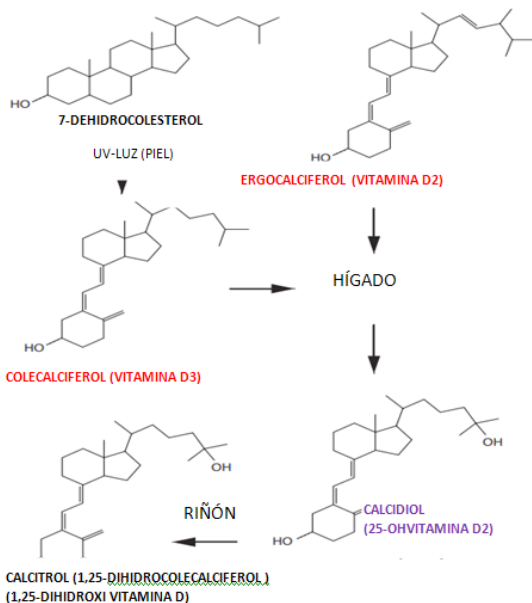
de Parkinson. En cuanto a la relación entre el déficit de VD y el cáncer, aún no existen conclusiones definitivas [2]. Se ha propuesto que la deficiencia de VD actúa como un supresor de la expresión génica. Por ejemplo, ante la deficiencia de VD se suprime uno de los genes clave en la regulación de la biosíntesis de dopamina y la expresión de factores neurotróficos [3]. Las diversas funciones en las que está implicada, muchas de ellas de tipo endócrino, hacen que se la considere una hormona esteroidea. En el laboratorio clínico, la medición de 25-hidroxitamina D (25-OH-VD) refleja el estatus de VD del paciente.

**Déficit de vitamina D**

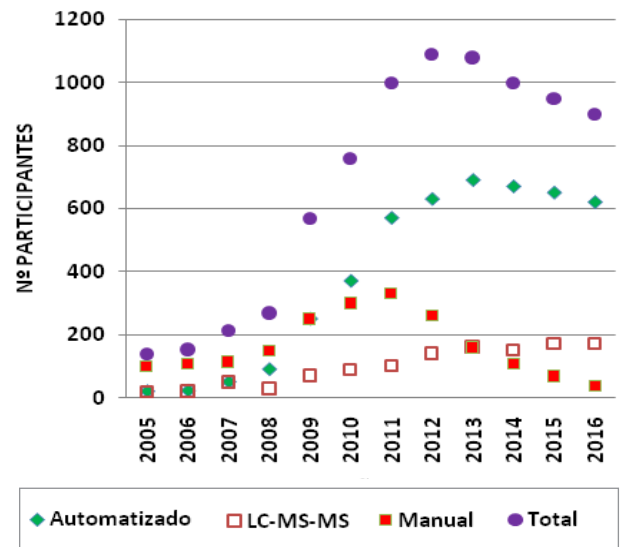
La hipovitaminosis D se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. Existe un consenso entre varias sociedades médicas, en cuanto a la necesidad de determinar niveles adecuados de VD para la salud ósea y para sus acciones no clásicas [4], pero aún hay temas que permanecen rodeados de incertidumbre, sin que se haya alcanzado un acuerdo a nivel internacional, como, por ejemplo, en las definiciones de suficiencia e insuficiencia de vitamina D (20 vs. 30 ng/mL), en la relación entre 25-OH-VD y la PTH (relación lineal versus no lineal), en el método de referencia a considerar (determinación de VD total vs. estimación de VD libre) y su utilidad en el monitoreo bajo suplementación, entre otros.

El método adecuado para restaurar los niveles normales de VD es aún un tema de debate. El colecalciferol o vitamina D3 (VD3) y el calcidiol o vitamina D2 (VD2) son los compuestos más utilizados en la suplementación de VD y el uso relativo de ambos productos depende de razones históricas o prácticas. Existen varios medicamentos con actividad de VD para uso clínico y hacer la selección correcta para cada paciente puede ser un desafío, ya que se puede realizar la suplementación con VD2, VD3 o VD2 + D3. Además, están disponibles diferentes

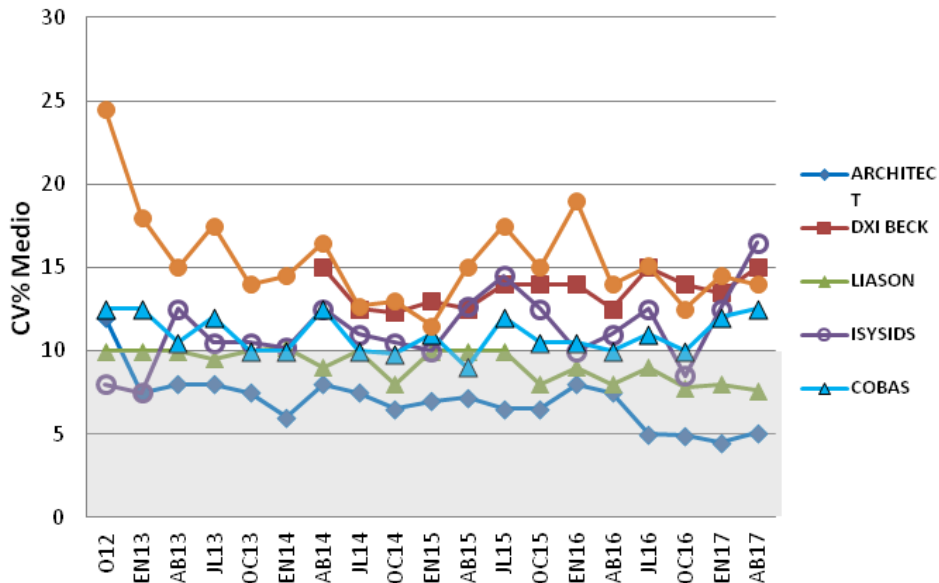
**Figura 1.** Fuentes de vitaminas D2 y D3.



**Figura 2.** Metodologías para la medición de 25-OH-VD de laboratorios participantes del Programa de Control de Calidad Externo DEQAS.



**Figura 3.** Precisión de inmunoensayos para medición de 25-OH-VD en el Programa de Calidad Externo DEQAS.



formulaciones farmacéuticas: gotas de administración diaria o semanal, ampollas mensuales, bimestrales, trimestrales, comprimidos diarios donde se combina VD con calcio, etc.

Comparando la eficacia relativa de VD2 y VD3 [5-7] administradas oralmente, se observa que:

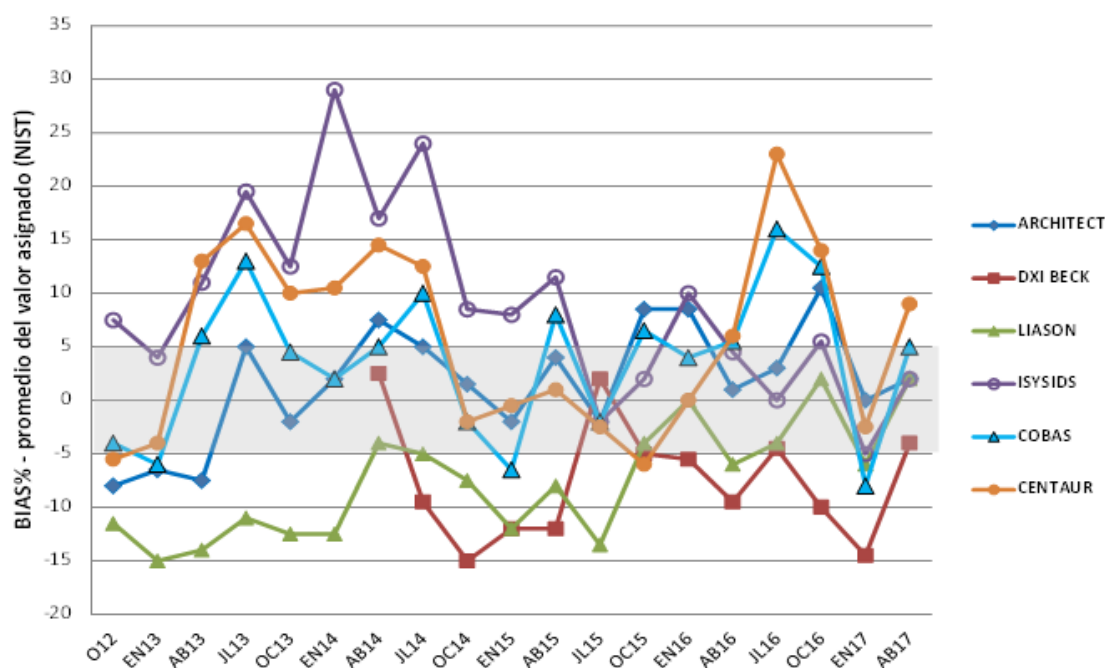
- la administración de VD2 produce un aumento más rápido de la 25-OH-VD sérica respecto de la administración de VD3 oral.
- las dosis de VD2 son de 3 a 5 veces más potentes que las de VD3.
- una posible ventaja adicional de la VD2 oral es una curva de dosis-respuesta lineal, independientemente del nivel basal de 25-OH-VD sérica.
- la VD2 es un metabolito más polar y soluble, que farmacocinéticamente puede mostrar volúmenes de distribución más pequeños y quedar menos atrapado por el tejido adiposo. También, es independiente de la 25-hidroxilasa hepática. En consecuencia, estos aspectos afectan tanto su absorción intestinal (tasa más alta) como su transporte (ya que está unida a DBP circulante) y muestra una vida media mucho más corta (aproximadamente 10 a 13 días) que el colecalciferol.
- la ingesta intermitente de VD2 da como resultado una concentración de 25-OH-VD en suero bastante estable, en comparación con las mayores fluctuaciones observadas después de la administración de VD3 oral intermitente.

Lo antes mencionado puede tener ventajas en pacientes que presentan una disminución de la capacidad de absorción intestinal, así como en pacientes obesos o con enfermedades neurológicas o bajo tratamiento con fármacos que interfieren con el sistema de enzimas hepáticas del citocromo P-450 (corticosteroides o anticonvulsivantes) [8]. Hasta el momento, la evidencia clínica no es suficiente para respaldar su uso

en el contexto del tratamiento de la osteoporosis.

El aumento de publicaciones sobre las nuevas implicancias de la VD ha llevado al aumento en las solicitudes de la determinación de sus niveles séricos, lo que ha producido que la mayoría de los laboratorios clínicos reemplacen los métodos manuales con extracción previa, por métodos más rápidos. El parámetro que mejor refleja los niveles de VD en el organismo es la 25-OH-VD total sérica. Desde un punto de vista analítico, aunque los principales fabricantes de reactivos han desarrollado inmunoensayos automatizados para la medición de 25-OH-VD [9,10], la variabilidad intralaboratorio e interlaboratorio sigue siendo alta (especialmente a bajas concentraciones). Esto podría conducir a un diagnóstico incorrecto de deficiencia / insuficiencia de vitamina D. Además, a pesar de los esfuerzos recientes para estandarizar los ensayos y minimizar su variabilidad, se observa que la misma continúa superando el criterio deseable de  $\pm 10\%$  [11].

Para promover la estandarización de las mediciones de laboratorio y reducir la variabilidad de la medición de la 25-OH-VD en 2010, la Oficina de Suplementos Dietéticos (ODS) del Instituto Nacional de la Salud (NIH) de los Estados Unidos organizó el Programa de Estandarización de la Vitamina D (VDSP) [12]. Este programa también involucra al Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC), el Programa de Evaluación Externa de la Calidad de la Vitamina D (DEQAS), el Colegio de Patólogos Estadounidenses (CAP), la Asociación Americana para Química Clínica (AACC) y la Federación Internacional de Química Clínica y Medicina de Laboratorio (IFCC). El VDSP monitorea el desempeño, acreditando a los laboratorios que participan en los análisis de VD y desarrollando un sistema de medición de referencia estándar (SRMP) con materiales previamente producidos por el NIST.

**Figura 4.** Sesgo o bias de los inmunoensayos para medición de 25-OH-VD de los resultados reportados en el Programa de Calidad Externa DEQAS.

► Se expresan los desvíos de los resultados respecto de los valores asignados por el NIST.

En la figura 2, se muestra la evolución en el uso de ensayos para la determinación de 25-OH-VD entre los participantes del DEQAS, desde el año 2004 al año 2016. Se observa un aumento en el uso de inmunoensayos automatizados y LC-MS/MS, en detrimento de los métodos manuales. En la misma línea, el CDC ofrece un programa de certificación de estandarización de VD y publica una lista de los fabricantes y laboratorios que han superado con éxito el criterio de desempeño ( $\pm 5\%$  de sesgo medio e imprecisión general de  $<10\%$  en el rango de concentración de 22-275 nmol/L [8,8-110 ng/mL] para 25-OH-VD total).

De los inmunoensayos utilizados para la medición de 25-OH-VD disponibles en nuestro medio, se reportan como certificados en el programa CDC/VDSCP el de Architect-Abbott, Cobas-Roche, Liaison-DiaSorin y Centaur-Siemens [13]. Un recurso adicional para estandarizar los pequeños laboratorios clínicos y de investigación, como una alternativa al programa CDC, son los programas ofrecidos por el CAP y el DEQAS de ensayos de aptitud (PT), basados sobre la precisión [14].

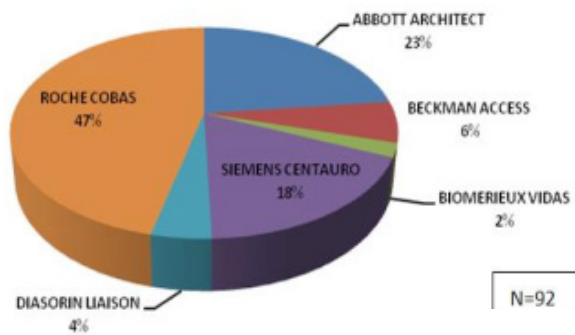
A partir de abril de 2013, cada muestra de DEQAS tiene valor asignado por el Procedimiento de Medición de Referencia (RMP) del NIST para 25-OH-VD. Además de 25-OH-VD total (25-OH-D3 + 25-OH-D2), los participantes reciben los valores individuales de NIST para los metabolitos 25-OH-D3, 25-OH-D2 y 3-epi-25-OH-D3. Esto es de particular interés para los laboratorios que utilizan métodos cromatográficos basados en HPLC-UV y LC-MS-MS.

En las figuras 3 y 4 se muestra el desempeño (sesgo e imprecisión CV%) de los métodos reportados al DEQAS desde

octubre de 2012 hasta abril de 2017. Las concentraciones de 25-OH-VD2 y 25-OH-VD3 pueden ser discriminadas sólo por técnicas cromatográficas o espectrometría de masas, mientras que se observa reactividad cruzada total o parcial con cada forma molecular, cuando se usan métodos basados en inmunoensayos. Esto implica un diferente reconocimiento de las formas moleculares de 25-OH-VD, que conlleva a discrepancias en los resultados de los diferentes inmunoensayos. Los fabricantes de estos métodos, en general, declaran en sus insertos el grado de reacción cruzada con las formas moleculares relacionadas estructuralmente con la VD. Por ejemplo, el método EQLIA de Cobas-Roche declara que tiene un 100 % de cruzamiento con 25-OH-VD3 y 93,7 % con 25-OH-VD2. El método Liaison-DiaSorin declara 100 % de cruzamiento con 25-OH-VD3 y 104 % con 25-OH-VD2. Es importante destacar que, en un paciente que no toma suplementos de VD, la 25-OH-VD medida corresponde mayoritariamente a la forma D3, mientras que la 25-OH-VD2 es menos del 5% del total de 25-OH-VD [11,15]. La vida media de la 25-OH-VD circulante es de 2 a 3 semanas, aproximadamente.

Los objetivos de este estudio fueron la evaluación del desempeño de los métodos de medición de 25-OH-VD respecto del criterio de calidad propuesto por el CDC en el período 2014-2018 a partir de los resultados de las Rondas 29 a 32 del Programa Buenos Aires (ProgBA -CEMIC). Por otro lado, se evaluó el impacto de la suplementación con VD2 y VD3 en la medición de 25-OH-VD total, a través de los resultados del Programa de Evaluación Externa Buenos Aires en la Ronda 33 del período 2018-2019.

**Figura 5.** Inmunoensayos utilizados por los participantes del ProgBA en Ronda 33 para la medición de 25-OH-VD.



### Materiales y métodos

Las pruebas de aptitud forman parte del sistema de gestión de la calidad del laboratorio clínico. El Programa Buenos Aires de Evaluación Externa de Calidad para Laboratorios Clínicos (ProgBA-CEMIC) proporciona, anualmente, materiales (preparados a partir de muestras liofilizadas de suero, plasma u orina) para realizar las determinaciones analíticas de diferentes especialidades clínico-bioquímicas, acompañados de estadísticas mensuales e informes acumulativos. El Programa se encuentra acreditado bajo normas IRAM - ISO/IEC 17043:2014.

Para mostrar el estado del arte de la medición de 25-OH-VD en nuestro medio, se analizaron resultados de 5 Rondas (R) del ProgBA [29 a 32, 2014-2018]. En promedio (Nprom), completaron las Rondas 87 laboratorios. Se utilizó el CVi % promedio individual de cada laboratorio en cada Ronda como un estimador de su CV interno. Se lo comparó con el criterio de calidad del CDC: imprecisión general menor de 10 % en el rango de concentración 22-275 nmol/L (8,8-110 ng/mL) para 25-OH-VD total.

Los métodos más utilizados por los laboratorios participantes fueron: Cobas-Roche, Architect-Abbott, Centaur-Siemens y Liaison-DiaSorin.

Durante el período 2017-2018, en el contexto de la Ronda 33 del ProgBA-CEMIC, en el módulo de marcadores óseos que incluyó la determinación de 25-OH-VD, se distribuyeron a 92 laboratorios dos muestras séricas diferentes de una misma paciente, una de ellas (muestra 4 de la Ronda 33) fue obtenida luego de finalizar el mes de tratamiento de suplementación con 15 gotas/semana de Raquiferol®. Luego de 4 meses sin suplementación con VD se logró su depuración, se comenzó una segunda suplementación de 3 meses con una ampolla de Sterogy®/mes.

Luego del tratamiento, se obtuvo la segunda muestra suplementada (número 9 de la Ronda 33). Cabe destacar que, en el período evaluado, la paciente no presentó patología evidente ni estaba bajo tratamiento con ninguna otra medicación.

### Cálculo comparativo de las dosis administradas

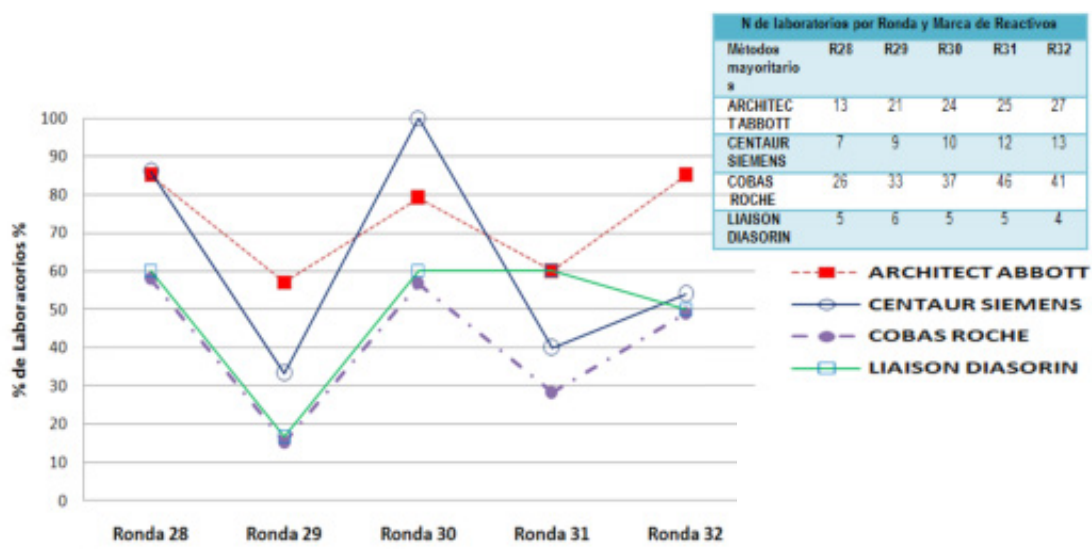
- Raquiferol® contiene 6.560.000 UI de VD2 (164 mg) cada 100 ml.
- 1 gota de Raquiferol® = 2.400 UI de VD2.
- 15 gotas/semana = 36.000 UI de VD2/semana = 144.000 UI/mes.
- Sterogy®: 1 ampolla de Colecalciferol (VD3) 2,5 mg [equivalente a 100.000 UI/mes].

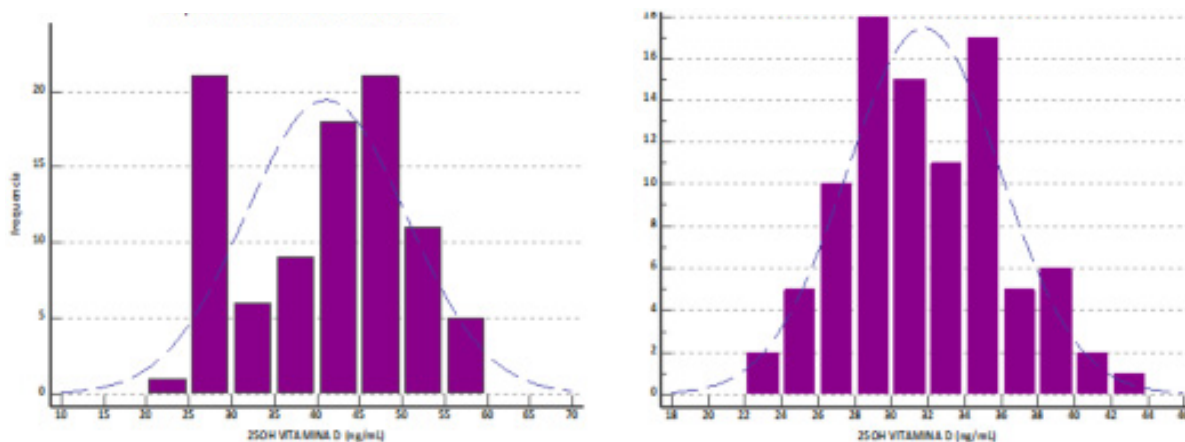
Luego de recibir los resultados de 25-OH-VD reportados por los 92 laboratorios en las 2 muestras, se realizó el tratamiento estadístico correspondiente de los datos, para la comparación de las muestras 4 y 9.

### Estadística

Los resultados dentro de la Ronda de Control de Calidad Externo se analizaron según el CCE/ProgBA y el software estadístico utilizado para la evaluación de los resultados fue MedCalc® (ANOVA, análisis a posteriori de Student - Newman - Keuls).

**Figura 6.** Laboratorios con coeficiente de variación CV < 10 % en la medición de 25-OH-VD por grupo par.



**Figura 7.** Resultados de 25-OH-VD medida por todos los inmunoensayos en la Ronda 33 del ProgBA.

► 7A, paciente sustituida con vitamina D2 (muestra 4); 7B, paciente sustituida con vitamina D3 (muestra 9).

## Resultados

### Desempeño de los métodos para la medición de 25-OH-VD

En la figura 5, se muestran los porcentajes de los métodos mayoritarios utilizados por los participantes en la Ronda 33 de ProgBA. En la figura 6, se muestra el porcentaje de laboratorios (dentro de cada grupo par y su número de usuarios por Ronda) que cumplió con el criterio de calidad establecido en cada ronda, en el período estudiado. Si bien se observan diferencias entre los métodos, ninguno de ellos mostró una tendencia neta en estos últimos 5 años. Ese efecto se muestra independientemente de la preparación de las muestras (plasma o suero) e independientemente de la dosis analizada. Sólo podría atribuirse a una falta de robustez general en:

1. la medición de la 25-OH-VD.
2. impacto de la suplementación farmacológica en la medición de 25-OH-VD.

En las figuras 7A y 7B, se representan los resultados reportados por todos los laboratorios para las muestras 4 y 9 de la Ronda 33 del ProgBA. Si bien las muestras provienen de la misma matriz sérica (misma paciente), se observaron diferencias notables en la distribución de los resultados. Como la única variante en el estatus de la paciente fue la suplementación con dos formas farmacéuticas distintas de VD, esto llevó a realizar un análisis más detallado, enfocado a evaluar la especificidad de los métodos. En las figuras 8A y 8B, se muestran los resultados de las mismas muestras reportados por los métodos mayoritarios ( $n > 4$ ). Se hallaron diferencias significativas entre los diferentes inmunoensayos ( $p < 0.001$ ), tanto en la muestra 4 (suplementación con VD2) como en la 9 (suplementación con VD3).

La presencia de VD2 y/o sus metabolitos en la muestra 4 pone en evidencia un diferente reconocimiento del analito por parte de Architect-Abbott con resultados inferiores al resto ( $p < 0,005$ ). En cambio, en la muestra 9, la presencia de VD3 puso en evidencia la diferente especificidad del Cobas-Roche respecto del Architect-Abbott y del Centaur-Siemens ( $p < 0,005$ ).

## Discusión

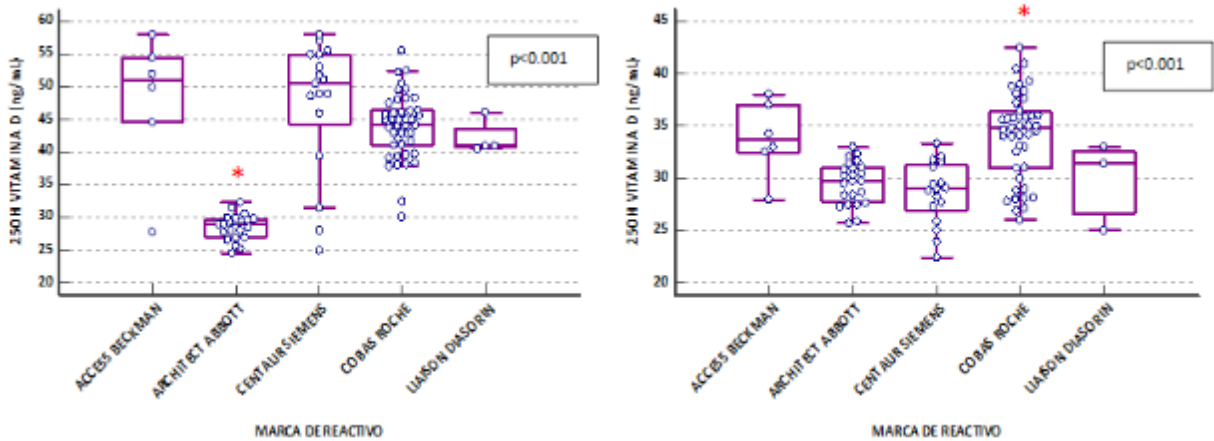
En la medición de la VD, no se observan grandes progresos en el desempeño de los métodos a través del tiempo. Esto implica que el conjunto de factores que intervienen en el desempeño de la medición de este analito (plataforma, reactivo, operador, gestión de calidad del laboratorio, etc.) no confluyeron en una mejora en la medición.

Si bien los métodos analizados, según la información provista por sus fabricantes, tendrían la capacidad de reconocer tanto las formas D2 como D3, exhiben un diferente grado de reactividad con las formas moleculares presentes en los pacientes suplementados. A pesar de que los resultados obtenidos fueron similares a los observados por G.D. Carter y col [16], al agregar VD a los controles de calidad externo, cabe destacar que, en el presente trabajo, fue posible evaluar el comportamiento de los métodos en presencia no sólo del fármaco (calcidiol ó calciferol) sino de sus productos de metabolización *in vivo*. Esto reproduce la realidad en la medición de los pacientes que habitualmente son suplementados y monitoreados en el laboratorio clínico.

Sobre la base de estos resultados se puede concluir que, a lo largo de los últimos 5 años, no ha habido una suficiente evolución de la medición de 25-OH-VD que permitiera alcanzar en un mayor porcentaje el requisito de calidad planteado por el criterio del CDC. Se afirma la necesidad de reevaluar la especificidad de los inmunoensayos, ya que hoy en día los esfuerzos en pos de la armonización de los métodos corresponden principalmente a la estandarización, mientras que la especificidad no estaría mayormente contemplada.

Por otro lado, se hace indispensable jerarquizar las etapas pre y posanalíticas en cuanto al registro y reporte en el informe acerca de la medicación que reciben los pacientes (forma farmacéutica, dosis y fecha de la última administración), como también evaluar los resultados en el contexto de la reactividad cruzada de cada inmunoensayo con las formas farmacéuticas y sus metabolitos.

**Figura 8.** Resultados de la determinación de 25-OH-VD de la Ronda 33 ProgBA de los grupos par.



► 8A, paciente sustituida con vitamina D2 (muestra 4); 7B, paciente sustituida con vitamina D3 (muestra 9), \*diferencia significativa.

### Referencias bibliográficas

- [1]. Maxwell JD. Seasonal variation in vitamin D. *Proc Nutr Soc* 1994; 53:533-43.
- [2]. Minisola S, Ferrone F, Danese V, Cecchetti V, Pepe J, Cipriani C et al. Controversies Surrounding Vitamin D: Focus on Supplementation and Cancer *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16(2):189.
- [3]. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357:266-81.
- [4]. Minisola S, Ferrone F, Danese V, Cecchetti V, Pepe J, Cipriani C et al. Controversies Surrounding Vitamin D: Focus on Supplementation and Cancer *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16(2):189.
- [5]. Quesada-Gomez JM, Bouillon R. Is calcifediol better than colecalciferol for vitamin D supplementation? *Osteoporos Int.* 2018; 29(8):1697-1711.
- [6]. Cianferotti L, Cricelli C, Kanis JA, Nuti R, Reginster JY, Ringe JD et al. Clinical use of vitamin D metabolites and their potential developments: A position statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO) and the International Osteoporosis Foundation (IOF) *Endocrine*. 2015; 50:12-26.
- [7]. Quesada-Gomez JM, Bouillon R. Is calcifediol better than colecalciferol for vitamin D supplementation? *Osteoporos Int.* 2018; 29(8):1697-1711.
- [8]. Ortego-Jurado M, Callejas -Rubio JL, Ríos-Fernández R, González-Moreno J, González-Ramírez AR, González-Gay MA et al. Oral calcidiolis more effective than colecalciferol supplementation to reach adequate 25(OH)D levels in patients with autoimmune diseases chronically treated with low doses of glucocorticoids: A "real-life" study. *J Osteoporos* 2015;1-7.
- [9]. Moon HW, Cho JH, Hur M, Song J, Oh GY, Park CM et al. Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem* 2012; 45:326-30.
- [10]. Farrel CJ, Martin S, Mc Whinney B, Straub I, Williams F, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immune assays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem* 2012; 58: 531-41.
- [11]. Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Fassino V, Mazzei F, D'Erasmus E et al. Short and long-term variations in serum-calcitropic hormones after a single very large dose of ergocalciferol (vitamin D2) or colecalciferol (vitamin D3) in the elderly. *JCEM* 2008; 93(8):3015-20.
- [12]. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM; 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.
- [13]. CDC Vitamin D Standardization-Certification Program (CDC VDSCP). Certified Total 25-hydroxyvitamin D Procedures [Internet]. 2019. Disponible en: [https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/hs/CDC\\_Certified\\_Vitamin\\_D\\_Procedures-508.pdf](https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/hs/CDC_Certified_Vitamin_D_Procedures-508.pdf)
- [14]. Phinney K, Bedner M, Tai S, Vamathevan VV, Sander LC, Sharpless KE et al. Development and certification of a standard reference material for vitamin D metabolites in human serum. *Anal Chem* 2012; 84:956-62.
- [15]. Romagnoli E, Mascia ML, Cipriani C, Fassino V, Mazzei F, D'Erasmus E et al. Short and long-term variations in serum-calcitropic hormones after a single very large dose of ergocalciferol (vitamin D2) or colecalciferol (vitamin D3) in the elderly. *JCEM* 2008; 93(8):3015-20.
- [16]. Carter GD, Jones JC, Shannon J, Williams EL, Jones G, Kaufmann M et al. Hydroxyvitamin D assays: Potential interference from other circulating vitamin D metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2017; 173:100-4.