



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

Establecimiento de nuevos Valores de Referencia de vitamina B12 y folato séricos para población sana en la comarca interior de Bizkaia y validación en población de riesgo

Tesis Doctoral 2017

IRATXE AJURIA MORENTIN

“Establecimiento de nuevos Valores de Referencia de vitamina B12 y folato séricos para población sana en la comarca interior de Bizkaia y validación en población de riesgo”

Tesis Doctoral presentada por
IRATXE AJURIA MORENTIN

Directores:

M. BEGOÑA RUIZ LARREA
JOSÉ MARÍA QUINTANA LÓPEZ



Mayo 2017

Bidea ibiliz egiten da ...

Agradecimientos

La verdad es que me cuesta plasmar en papel todo lo que me gustaría expresar. Me parecía difícilísimo, por no decir imposible, encontrarme algún día escribiendo este apartado de mi tesis doctoral. Digo mí tesis porque yo la firmo, pero nunca lo hubiera conseguido sin la inestimable ayuda y apoyo incondicional de tantas personas que de una u otra manera han colaborado. Es cierto que el éxito no se logra sólo con cualidades especiales, es sobre todo un trabajo de constancia, método y organización.

En primer lugar quiero agradecer al equipo de investigación, Edurne y Carmen, que formamos en el Laboratorio por su enorme trabajo y dedicación a lo largo de todos estos años. Sin ellas no hubiera sido posible. Especialmente a Carmen Mar, quien me arrastró a las profundidades del mundo de la investigación desde que me puse en sus manos como residente y prácticamente me brindó la oportunidad de tomar las riendas de lo que, sin saberlo, acabaría siendo mi proyecto de tesis. *Mila esker benetan*, por haberme dado las primeras piezas del puzle y seguir conmigo construyendo muchos otros.

Debo hacer especial mención a la Unidad de Investigación del HGU (Urko, Susana, Txema) que me han ayudado y me han enseñado prácticamente lo que sé y con quienes tengo la suerte además de seguir trabajando y colaborando. Sin ellos, nunca habiéramos conseguido adentrarnos en el mundo de los proyectos de investigación.

Quiero citar aquí también la ayuda proporcionada por la mayoría de mis compañeros y compañeras, no solo del Laboratorio, sino de otros Servicios implicados (Atención Primaria, Hematología,...). Gracias también a los Comités de Investigación y Ético del HGU, así como al Departamento del Gobierno Vasco.

He tenido la suerte de contar con la ayuda desinteresada de los distintos representantes de las casas comerciales, quienes han hecho que el desarrollo de este proyecto sea posible y nunca me han dado un no por respuesta.

En principio, “la investigación necesita más cabezas que medios” y ahí es donde se sitúan las piezas fundamentales, mis directores, porque he tenido la suerte de tener dos:

- A Bego Ruiz debo agradecerle el enorme impulso y la gran ayuda proporcionada desde que realicé junto a ella la Suficiencia Investigadora en la UPV-EHU. Sin ella, estoy segura de que el puzle se hubiera quedado incompleto. Gracias por acompañarme, animarme y guiarme.
- A Txema Quintana, quien desde el principio me ayudó a contestar a la famosa “pregunta clínica” e hizo posible que desde el comienzo las pocas piezas que tenía empezaran a encajar.

En el día a día también tenemos que ir colocando piezas, y quizá, las más importantes para empezar todo el entramado son las que nos aporta la familia. En mi caso, he tenido la gran suerte de tener el ejemplo en casa, mi ama Maite, quien siempre ha estado inmersa en el mundo de la investigación y a quien quiero especialmente dedicar mi tesis doctoral. Por supuesto, que además tengo que mencionar a quienes han soportado y soportan mis malos humos y mi poca paciencia: mi aita Kepa, hermana Idoia, mi marido Omer e hijo Lier (futura Paule). Sin mi familia, ni siquiera hubiera encajado las dos primeras piezas. *Maite zaituztet!*

Eskerrik asko denoi, bihotzez!!

Resumen del proyecto de tesis

El déficit de vitamina B12 es un problema de salud pública relativamente frecuente que muchas veces pasa clínicamente inadvertido y por tanto infradiagnosticado. Sin embargo, las complicaciones pueden ser potencialmente peligrosas (fundamentalmente neurológicas y hematológicas), por lo que a priori se debe investigar en todos aquellos sujetos en los que se sospecha un posible déficit.

En el presente trabajo nos planteamos revisar e investigar este tema para poder actuar. En particular, hemos analizado los valores de referencia séricos de vitamina B12 y folato que se estaban utilizando en Osakidetza para la comarca interior de Bizkaia. Hemos utilizado distintas metodologías y hemos demostrado que los valores de referencia obtenidos para cada método no son transferibles. De los resultados del estudio se ha concluido que los valores de referencia que se estaban utilizando no eran adecuados para la población sana de nuestra comarca. Hemos descrito nuevos valores de referencia y se ha elaborado una guía/protocolo en Osakidetza sobre las recomendaciones para el diagnóstico del déficit de vitamina B12 y folato.

Si bien se han establecido los valores de referencia séricos para la vitamina B12 y el folato, el trabajo se centra fundamentalmente en la vitamina B12.

Además, debido a la utilización de tecnología similar, también se han comparado distintos inmunoensayos para la determinación de vitamina D.

Estructura de la tesis:

El trabajo de tesis doctoral que se presenta se ha elaborado como un compendio de 3 trabajos publicados en revistas internacionales especializadas en el tema y la guía práctica de Osakidetza que se ha elaborado a partir del estudio.

El trabajo tiene la siguiente estructura: 1) Estado actual, 2) Hipótesis, 3) Objetivos, 4) Resultados. Este 4º capítulo consta de 3 apartados correspondientes a las 3 publicaciones (las dos últimas con los resultados adicionales derivados de cada estudio), y como Anexo se adjunta la guía práctica de Osakidetza. En el apartado 5) se realiza la Discusión de los resultados, y en 6) se describen las conclusiones finales del estudio.

Índice:

1. Antecedentes y estado actual.....	13
1.1. Vitamina B12.....	15
1.1.1. Estructura, fuentes y recomendaciones de ingesta.....	15
1.1.2. Metabolismo y funciones de la vitamina B12.....	17
1.1.3. Folato.....	22
1.1.4. ¿Qué causa el déficit de vitamina B12?.....	24
1.1.5. Manifestaciones clínicas: ¿Cuándo se debe sospechar que existe déficit de vitamina B12?.....	26
1.1.6. Diagnóstico.....	30
1.2. Valores de referencia.....	33
1.2.1. Concepto de valores de referencia.....	33
1.2.2. Variabilidad biológica.....	40
1.3. Pruebas diagnósticas y conceptos estadísticos.....	43
1.3.1. Conceptos y propiedades.....	44
1.3.2. Análisis de concordancia.....	49
1.4. El inmunoensayo.....	51
1.4.1. Principio de medida y analítica.....	51
1.4.2. Automatización del Inmunoanálisis.....	54
1.5. Justificación.....	57
2. Hipótesis.....	59
3. Objetivos.....	63
4. Resultados.....	67
4.1. Artículo 1: “Lack of transferability between different Immunoassays and LC-MS/MS for total 25-Hydroxyvitamin D measurement and disagreement defining deficiency”.....	69
4.2. Artículo 2: “Determination of Reference Values for Serum Folate and Vitamin B12 Using Three Different Immunoassays: Is it Worth Making an Effort to produce them in Our Laboratory?”.....	81
Resultados adicionales derivados del estudio.....	102

4.3. Artículo 3: “Change in the Reference Values for serum Vitamin B12: Impact on the Clinical Laboratory”	107
Resultados adicionales derivados del estudio.....	112
5. Discusión.....	115
6. Conclusiones.....	121
7. Referencias bibliográficas.....	125
8. Anexos.....	135
8.1. Anexo I. Diagnóstico del déficit de vitamina B12 y folato. Revisión bibliográfica y recomendaciones (Osakidetza).....	137

1. Antecedentes y estado actual

1.1. Vitamina B12

El déficit de vitamina B12 es un problema de salud pública relativamente común y conocido desde hace más de 100 años, siendo en su mayoría déficits subclínicos sin sintomatología clínica aparente.

Según estudios estadounidenses recientes, aproximadamente el 6-8% de la población anciana presenta déficit clínico de cobalamina, llegando al 10-20% en los casos de déficit subclínico (Patel, 2008; Carmel, 2011). Diferentes estudios epidemiológicos muestran una prevalencia en la población general del 20% en los países industrializados, que oscila entre el 5-60%, dependiendo de la definición de déficit considerada.

1.1.1. Estructura, fuentes y recomendaciones de ingesta

El término cobalamina se refiere a una familia de compuestos con una estructura determinada. De manera estricta, la vitamina B12 hace referencia a la cianocobalamina pero muchas otras cobalaminas presentan idénticas propiedades nutricionales, por lo que los términos cobalamina y vitamina B12 se consideran intercambiables (Snow, 1999). La vitamina B12 es una cobalamina que resulta de la unión asimétrica de 4 anillos pirrólicos, formando un grupo macrocíclico (núcleo corrina) en torno a un átomo central de cobalto (Co) (Forrellat y cols, 1999). En la **Figura 1** se representa la estructura de la vitamina B12 junto con la de sus derivados.

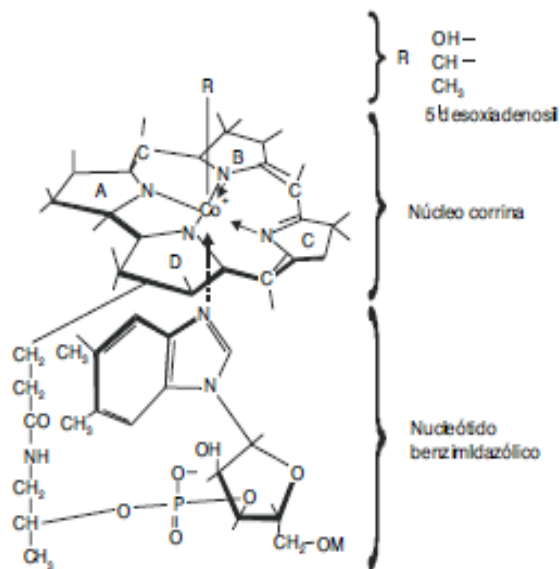


TABLA 1. Derivados de la cobalamina

Radical	Nombre del derivado
CN (ciano)	Cianocobalamina
OH (hidroxilo)	Hidroxocobalamina
CH ₃ (metilo)	Metilcobalamina
5'-desoxiadenosil	Desoxiadenosilcobalamina

Figura 1. Estructura de la Vitamina B12. (Obtenida de: Forrellat Barrios, M., Gomis Hernandez I., Gautier Du Defaix H. Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1999; 15 (3): 159-17)

La hidroxicobalamina y la cianocobalamina (vitamina B12) son formas no fisiológicas de la cobalamina; en el organismo se transforman de forma espontánea en metil y 5'-desoxiadenosilcobalamina, que son las formas fisiológicamente activas o coenzimas de la vitamina B12 (Kaplan y Pesce, 1991).

Aunque la vitamina B12 es sintetizada activamente por un gran número de bacterias intestinales del organismo humano, su absorción es mínima ya que la síntesis ocurre en sitios muy distales del lugar de absorción fisiológica. Como consecuencia, la vitamina B12 debe ser necesariamente aportada por los alimentos, cuya mayor fuente dietética se encuentra en las proteínas animales. Por tanto, la vitamina B12 del organismo proviene fundamentalmente de la dieta, de productos consumidos diariamente como son la carne, los huevos, etc. El consumo diario de la vitamina B12 es de aproximadamente 2,4 µg, de los cuales únicamente el 50-60% son absorbidos (Nielsen y cols, 2012). Artificialmente la vitamina B12 se encuentra en alimentos fortificados y suplementos y se estima que el aporte medio occidental es de 5-7 µg/día. En la siguiente tabla (**Tabla 1**) se muestran datos del Instituto de Medicina sobre la ingesta media recomendada.

Estado de la vida	EAR	DRI ($\mu\text{g}/\text{día}$)		
		RDA	AI	UL
Lactantes				
0-6 meses			0,4	
7-12 meses			0,5	
Niños				
1-3 años	0,7	0,9		
4-8 años	1,0	1,2		
9-13 años	1,5	1,8		
14-18 años	2,0	2,4		
Adultos				
19-70 años	2,0	2,4		
> 70 años	2,0	2,4		
Embarazadas				
≤ 18 años	2,2	2,6		
19-50 años	2,2	2,6		
Nodrizas				
≤ 18 años	2,4	2,8		
19-50 años	2,4	2,8		

Fuente: Institute of Medicine (2006). Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. National Academies Press, Washington D.C. Nota: En esta tabla se muestran las ingestas dietarias de referencia (DRI): ingesta media recomendada (EAR), ingesta dietética recomendada (RDA), ingestas adecuadas (AI). No existe nivel máximo tolerable de ingesta (UL) de vitamina B₁₂.

Tabla 1. Ingestas de referencia para vitamina B12

En comparación con los requerimientos diarios, el almacenamiento de la vitamina B12 en el organismo es enorme (2-5 mg), por lo que incluso en casos de malabsorción severa, el déficit de vitamina B12 puede instaurarse transcurridos entre 2 y 5 años (Snow, 1999).

1.1.2. Metabolismo y funciones de la vitamina B12

El metabolismo de la cobalamina es muy complejo y consta de diferentes etapas en las que cualquier alteración podría producir un posible déficit (Andrès y cols, 2004).

Los acontecimientos que ocurren desde la absorción de la vitamina se representan en la **Figura 2**, asociados a las posibles causas de déficit.

La vitamina B12 se absorbe en el íleon distal. En la dieta se encuentra unida a proteínas, siendo liberada por la acidez y proteólisis gástrica. Posteriormente, se une a la proteína R (haptocorrina), secretada por las glándulas salivales y esofágicas. En el duodeno el medio alcalino permite la liberación de la vitamina B12, uniéndose al factor intrínseco (FI), glicoproteína de unión específica. En el enterocito, el complejo FI-B12 es captado por endocitosis mediada por cubilina. En el citoplasma de la célula endotelial, la B12 es liberada y posteriormente ligada principalmente a transcobalamina II (TCII), llegando vía circulación portal al hígado y finalmente a todos los tejidos.

La B12 se almacena en el hígado. Por esta razón, las manifestaciones de deficiencia se producen 3-6 años después de iniciada la deficiencia para sujetos con mecanismos de absorción normal sin ingesta de B12 o suplementos. En personas con absorción menos eficiente por atrofia gástrica, estas estimaciones se reducen a 2-4 años (Brito y cols, 2012).

La absorción de vitamina B12 mediada por el FI es activa, muy eficiente y con un bajo nivel de saturación que se alcanza con dosis ingeridas de 2 µg. Cabe mencionar que existe también un mecanismo de transporte pasivo, independiente del FI y no saturable. Sin embargo, sólo entre 1-2% de una dosis ingerida es absorbida por esta vía. No obstante, aunque su magnitud es reducida, el transporte pasivo adquiere importancia cuando disminuye o desaparece el FI y explica la adecuada absorción desde altas dosis orales en ausencia de FI o en pacientes gastrectomizados.

Al igual que los folatos, la cobalamina participa en una circulación enterohepática. Entre 5 y 10 µg de cobalamina son secretados diariamente en la bilis unidos a una proteína R. Estos complejos cobalamina-proteína R son tratados en el intestino exactamente igual que aquellos que provienen del estómago, o sea, la cobalamina es liberada por digestión de la proteína R por las proteasas pancreáticas y entonces se une al FI y se reabsorbe. Se ha estimado que del 65 al 75 % de la cobalamina biliar es reabsorbida por este mecanismo. Esta circulación enterohepática genera un importante ahorro de vitamina B12 y permite comprender que cuando la carencia es debida únicamente a un aporte deficitario en la dieta, el déficit se manifieste más tardíamente.

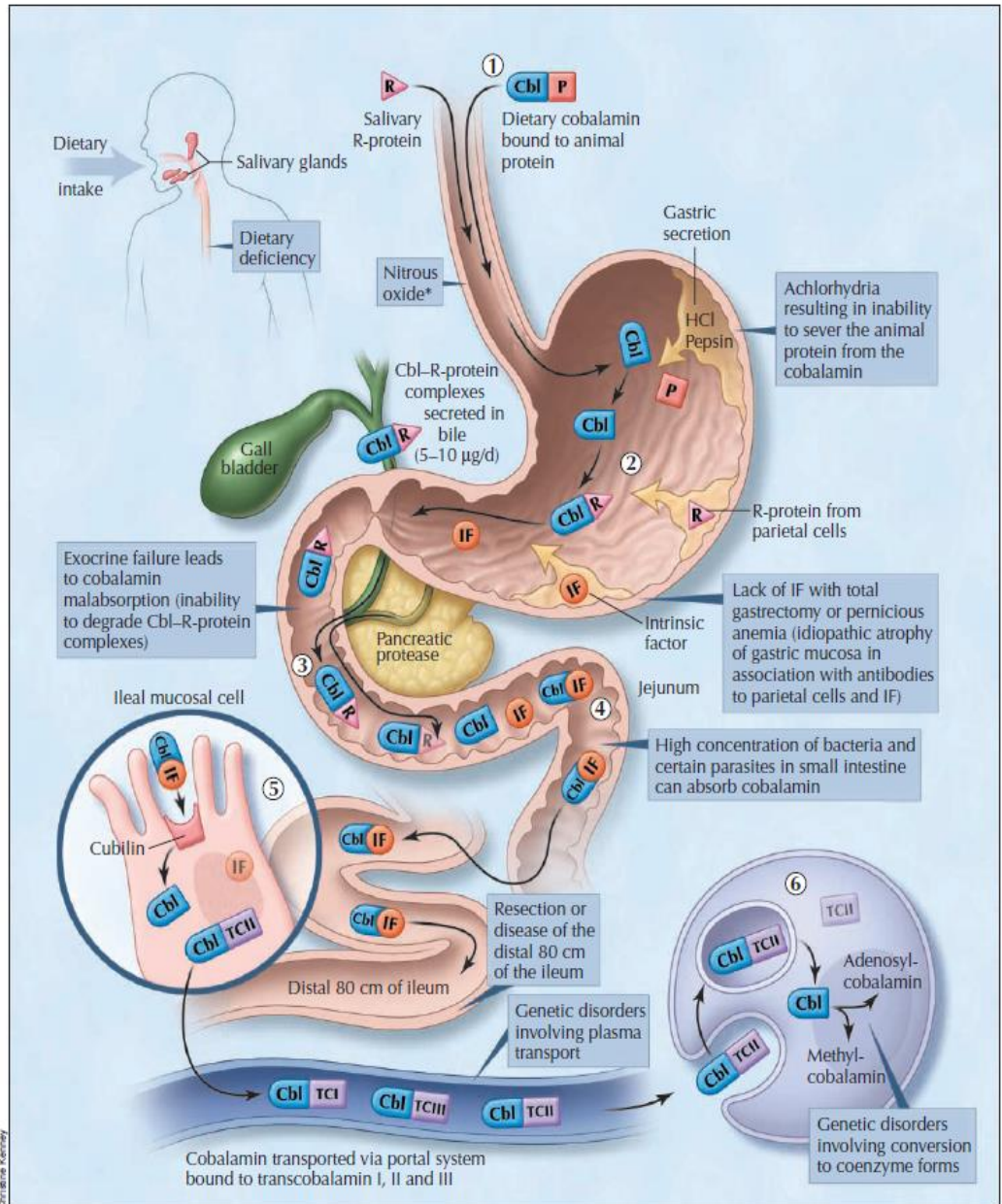


Figura 2. Aspectos fisiológicos de la vitamina B12 asociados a posibles causas de déficit. (Obtenida de: Andrés E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloysel F, Schlienger JL, Blicklé JF. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. CMAJ 2004; 171(3): 251-9)

Metabolismo intracelular

La vitamina B12 es una coenzima implicada en funciones metabólicas de importancia vital para el crecimiento celular normal, así como para la síntesis correcta del ADN. En la **Figura 3** se representa el metabolismo y reacciones bioquímicas de la cobalamina.

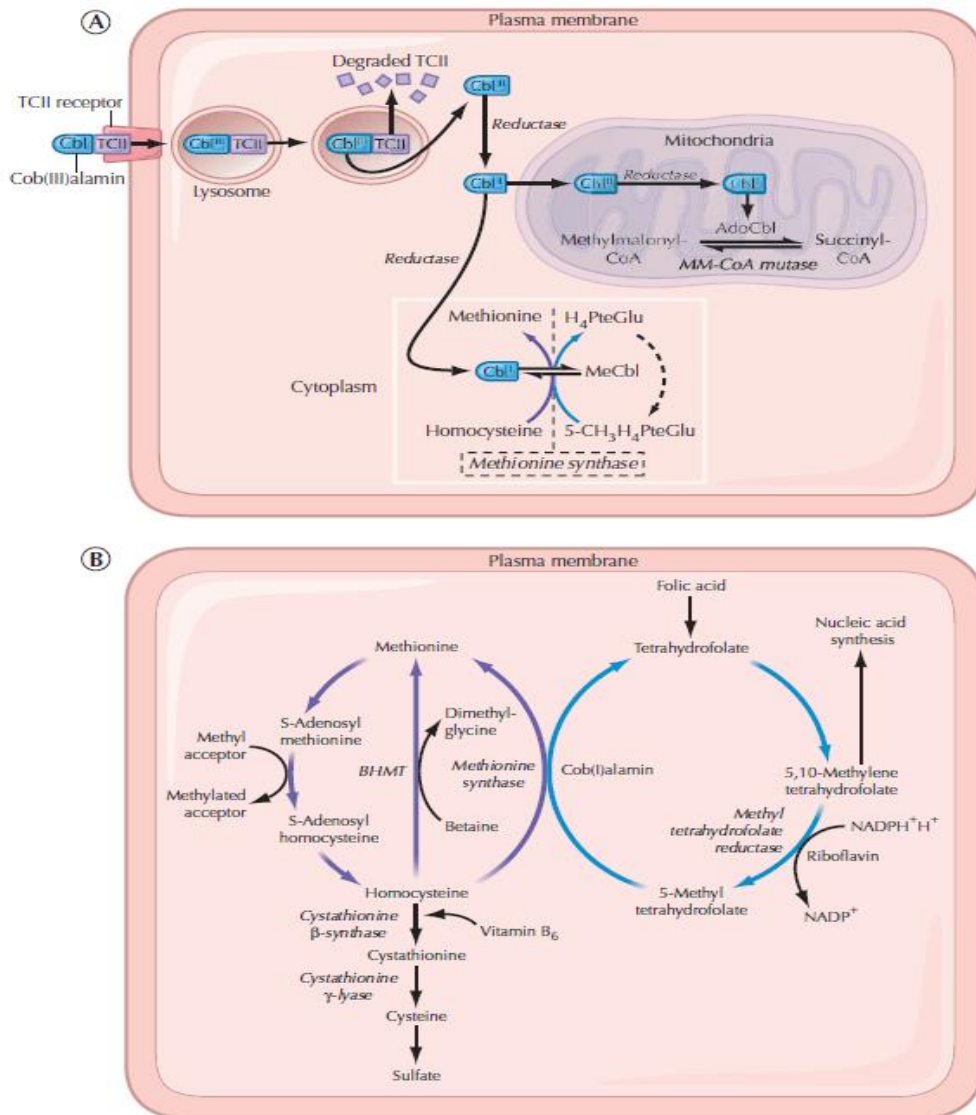


Figura 3. Metabolismo de la vitamina B12. **A:** Absorción celular y procesamiento de la cobalamina; **B:** Reacciones bioquímicas intracitoplasmáticas en las que está implicada la cobalamina. (Obtenida de: Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloysel F, Schlienger JL, Blicklé JF. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. CMAJ 2004; 171(3): 251-9)

Es esencial en numerosas reacciones bioquímicas en la naturaleza, aunque principalmente son 2 las que ocurren en el organismo de los seres humanos:

La primera es la síntesis del aminoácido metionina a partir de la homocisteína, reacción de especial interés, pues no sólo requiere metilcobalamina, sino también folato como coenzima (metiltetrahidrofolato) y la segunda es un paso en el catabolismo del propionato, la conversión del metilmalonil-CoA a succinil-CoA (Forrellat y cols, 1999).

Como vemos en la siguiente **Figura 4**, en el citoplasma el 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) y la vitamina B12 participan interactivamente.

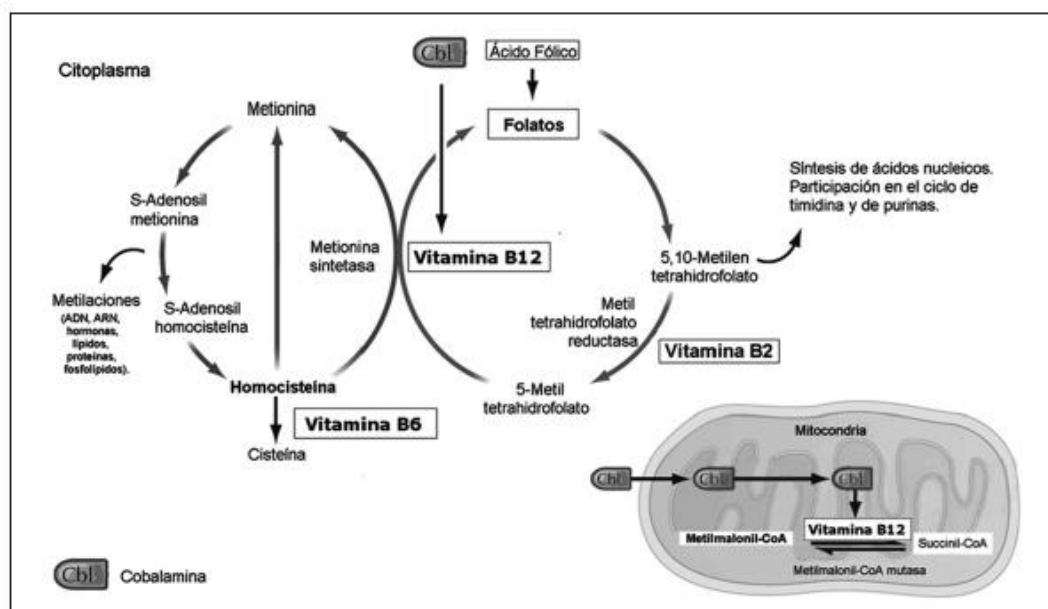


Figura 4. Metabolismo de los folatos, ácido fólico y vitamina B12. (Obtenida de: Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitán D, Sánchez H, Allen L, et al. Folatos y vitamina B12 en la salud humana. Rev Med Chile 2012; 140(11): 1464-1475)

El folato ha sido reducido previamente a 5-MTHF. Este compuesto es utilizado como cofactor en la conversión de homocisteína a metionina. En esta transformación, participa la enzima metionina-sintetasa utilizando B12 como cofactor. Posteriormente, la metionina es convertida en adenosilmetionina, compuesto fuente de grupos metilo para sintetizar creatina, fosfolípidos, proteínas, lípidos, neurotransmisores y metilar ADN y ARN. La utilización bioquímica de

folatos implica la participación de la enzima metiltetrahidrofolato-reductasa y la producción del metabolito intermediario 5,10-metilentetrahidrofolato, necesario para sintetizar ácidos nucleicos en el ciclo de purinas-timidina. El metabolismo citoplasmático de ambas vitaminas incluye la participación secundaria de riboflavina y piridoxina.

A nivel mitocondrial, la enzima metilmalonil-CoA-mutasa utiliza vitamina B12 como cofactor para transformar metilmalonil-CoA en succinil-CoA (Brito y cols, 2012).

Por lo tanto, en un déficit de vitamina B12 se elevan ambos metabolitos, la homocisteína y el ácido metilmalónico. En cambio, en el déficit de folato, sólo se eleva la homocisteína (Remacha y cols, 2014).

Se ha descrito la bioquímica de la cobalamina “clásica”, pero posteriormente han ido publicándose nuevas acciones bioquímicas de la vitamina B12 sobre el sistema inmune, la formación ósea, etc. (Solomon, 2007).

1.1.3. Folato

Como se ha indicado, la vitamina B12 y el folato son moléculas que actúan conjuntamente en el metabolismo. A continuación se describen la estructura y las propiedades del folato.

El término ácido fólico (ácido pteroilglutámico) se utiliza habitualmente como término general para hacer referencia a compuestos con actividad nutricional similar: los folatos. Son sintetizados por microorganismos y plantas y están muy presentes en la dieta (frutas, verduras, cereales,...). La ingesta media aproximada es de 200-300 µg/día, cantidad próxima a las recomendaciones (Snow, 1999).

A continuación se muestran las figuras que corresponden a la estructura (**Figura 5**) y fisiología del folato (**Figura 6**):

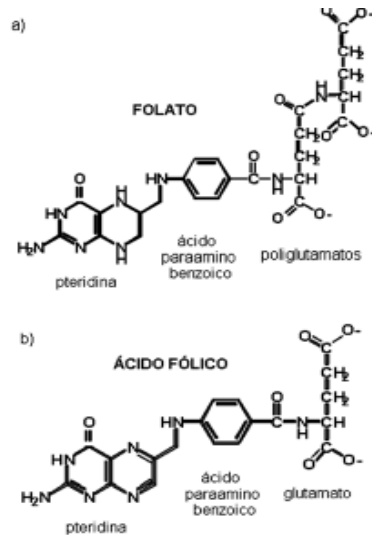


Figura 5. Estructuras químicas de: a) folato (tetrahydrofolato), b) ácido fólico (ácido pterilglutámico). (Adaptado de: Shane B. Folate and vitamin B12 metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B6 and polymorphisms. Food Nutr Bull 2008; 29: 5-16)

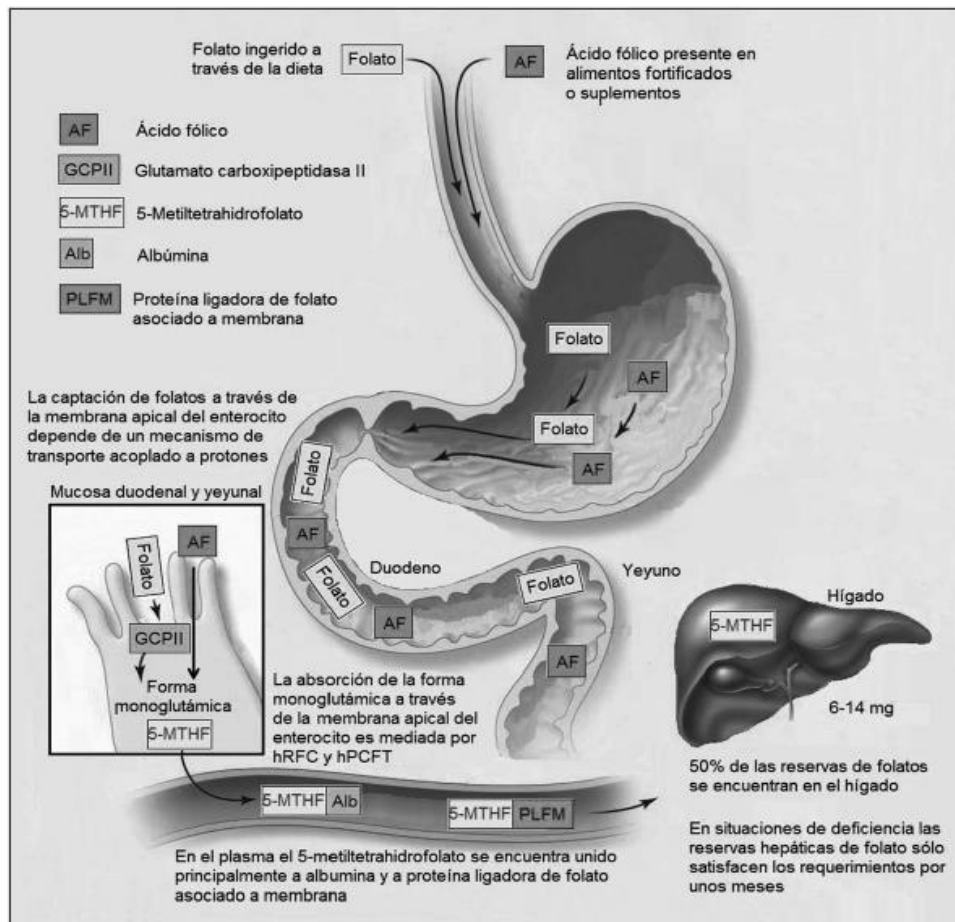


Figura 6. Aspectos fisiológicos de los folatos y del ácido fólico. (Obtenida de: Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitán D, Sánchez H, Allen L, et al. Folatos y vitamina B12 en la salud humana. Rev Med Chile 2012; 140(11): 1464-1475)

El folato es una vitamina esencial que puede encontrarse de múltiples formas en el suero, siendo el metiltetrahidrofolato la forma principal. Su deficiencia puede originarse por aporte insuficiente en la dieta, malabsorción, aumento de consumo (embarazo, infancia, enfermedades asociadas con proliferación celular rápida,...), inducido por fármacos (anticonvulsivos, anticonceptivos orales, metotrexato,...) o consumo de alcohol, hepatitis u otras enfermedades hepáticas (Dali-Youcef y Andrés, 2009).

Al contrario que la vitamina B12, las reservas hepáticas (6-14 mg) sólo satisfacen los requerimientos durante unos meses en situaciones de déficit.

1.1.4. ¿Qué causa el déficit de vitamina B12?

Su deficiencia puede deberse a diferentes razones: déficit de factor intrínseco (gastrectomía, atrofia gástrica, anticuerpos anti-factor intrínseco,...), malabsorción (insuficiencia pancreática, enfermedad celíaca, resección quirúrgica intestinal,...), sobrecrecimiento bacteriano (enfermedad inflamatoria o parasitaria), déficits dietéticos (vegetarianos,...), defectos genéticos y tratamiento con diversos fármacos (colchicina, neomicina, omeprazol, anticonvulsivos, colestiramina, ranitidina, metformina,...). Se observan niveles de vitamina B12 falsamente bajos cuando hay deficiencia de folato, en el embarazo, tras administración de anticonceptivos orales y en mieloma múltiple.

Por tanto, la causa de déficit más común a día de hoy es la malabsorción de cobalamina asociada a alimentos (food-bound cobalamin deficiency, FBCD), donde la liberación de la vitamina desde la comida ingerida se encuentra de alguna forma alterada (Dali-Youcef y Andrés, 2009). La gastritis autoinmune o anemia perniciosa es la causa de déficit severo más común a nivel mundial (Stabler, 2013).

En la tabla que se muestra a continuación (**Tabla 2**), se resumen las causas, con ejemplos asociados, más frecuentes que pueden producir niveles bajos de vitamina B12:

Cause	Examples
Low vitamin B ₁₂ intake	Vegetarianism, chronic alcoholism and older people
Autoimmune	Pernicious anaemia and Sjögren's syndrome
Food-bound cobalamin malabsorption	Atrophic gastritis, chronic gastritis and <i>Helicobacter pylori</i> -associated gastritis
Surgery	Post-gastrectomy and ileal resection
Malabsorption	Small intestinal bacterial overgrowth, chronic pancreatic exocrine insufficiency, Crohn's disease, coeliac disease and achlorhydria
Obstetric/gynaecological	Oral contraceptive, hormone replacement therapy and pregnancy
Genetic	Transcobalamin II deficiency
Drugs	Metformin, proton pump inhibitors and histamine H ₂ -receptor antagonists

Tabla 2. Causas de niveles disminuidos de vitamina B12. (Obtenida de: Shipton MJ, Thachil J. Vitamin B12 deficiency - A 21st century perspective. Clin Med 2015; 15(2): 145-50)

Además, como curiosidad a modo informativo, a nivel de tratamiento y seguimiento relacionado con la posible causa de déficit, se adjunta la **Tabla 3**:

Cause	Treatment	Follow-up
Severe malabsorption		
Pernicious anemia (autoimmune gastritis)	Intramuscular cyanocobalamin at a dose of 1000 µg administered intramuscularly daily or every other day for 1 wk, then weekly for 4 to 8 wk, and then monthly for life, or oral cyanocobalamin at a daily dose of 1000 to 2000 µg for life*	Administer iron and folate replacement as needed for full hemoglobin response, especially in patients with intestinal disease; perform surveillance for other autoimmune conditions, especially thyroid disease in patients with pernicious anemia; perform upper endoscopy in patients with symptoms of gastric cancer† or iron deficiency
Total or partial gastrectomy	Same as for pernicious anemia	Same as for pernicious anemia
Gastric bypass or other bariatric surgery	Same as for pernicious anemia	Same as for pernicious anemia
Ileal resection or organ reconstructive surgery (ileal conduit diversion and ileocystoplasty)	Same as for pernicious anemia	Same as for pernicious anemia
Inflammatory bowel disease, tropical sprue	Same as for pernicious anemia	Same as for pernicious anemia
Imerslund-Gräsbeck and other syndromes‡	Same as for pernicious anemia	Genetic counseling to detect vitamin B ₁₂ deficiency in family members
Mild malabsorption		
Protein-bound vitamin B ₁₂ malabsorption	Oral cyanocobalamin at a dose of 500 to 1000 µg daily or intramuscular cyanocobalamin at a dose of 1000 µg daily or every other day for 1 wk, then weekly for 4 to 8 wk, and then monthly for life	Perform tests for iron deficiency, anemia of chronic kidney disease, and anemia of chronic inflammation; these conditions coexist frequently in older adults, may limit the response to treatment, and may require further treatment
Mild atrophic gastritis	Same as for protein-bound vitamin B ₁₂ malabsorption	Same as for protein-bound vitamin B ₁₂ malabsorption
Use of metformin ¹⁴	Same as for protein-bound vitamin B ₁₂ malabsorption	Same as for protein-bound vitamin B ₁₂ malabsorption
Use of drugs that block stomach acid	Same as for protein-bound vitamin B ₁₂ malabsorption	Same as for protein-bound vitamin B ₁₂ malabsorption
Dietary deficiency		
Adults		
Vegan or vegetarian diet, or diet low in meat and dairy products	Supplements containing >2 µg of vitamin B ₁₂ or foods fortified with vitamin B ₁₂	Perform tests for iron deficiency, which is very common
Infants		
Breast-feeding in infants with vitamin B ₁₂ -deficient mothers ^{15,16}	Intramuscular cyanocobalamin at a dose of 250 to 1000 µg daily, then weekly until patient recovers; treatment of mother to enrich breast milk; oral supplementation with 1 to 2 µg of vitamin B ₁₂ daily or vitamin B ₁₂ -enriched formula or food	Confirm metabolic response in infants or refer parents to genetics specialist for evaluation; provide nutritional counseling for mothers

Tabla 3. Causas y tratamiento del déficit de vitamina B12. (Obtenida de: Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. N Eng J Med 2013; 368:149-60)

1.1.5. Manifestaciones clínicas: ¿Cuándo se debe sospechar que existe déficit de vitamina B12?

El déficit clásicamente se caracteriza por manifestaciones hematológicas y neurológicas, que pueden ir desde leves a muy severas. Las principales manifestaciones clínicas se detallan en la siguiente tabla (**Tabla 4**):

Haematological	Raised mean corpuscular volume, low haemoglobin, hypersegmented polymorphs, neutropenia, thrombocytopenia and pancytopenia
Neurological	Peripheral neuropathy, subacute combined degeneration of the cord and autonomic eg bowel/urinary incontinence and erectile dysfunction
Neuropsychiatric	Alzheimer's disease, depression, mania, delirium and psychosis

Tabla 4. Síntomas producidos por el déficit de vitamina B12. (Obtenida de: Shipton MJ, Thachil J. Vitamin B12 deficiency - A 21st century perspective. Clin Med 2015; 15(2): 145-50)

La interacción entre el folato y la vitamina B12 es responsable de la anemia megaloblástica que se observa en ambas deficiencias vitamínicas. La descordinación entre la maduración del citoplasma y la de los núcleos conduce a una macrocitosis, núcleos inmaduros, y la hipersegmentación en granulocitos observada en sangre periférica (**Figuras 7A, 7B**). La médula ósea hiper celular y displásica puede confundirse con signos de leucemia. Como resultado de la eritropoyesis ineficaz ocurre una hemólisis intramedular y liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), características que son similares a los de la anemia hemolítica microangiopática.

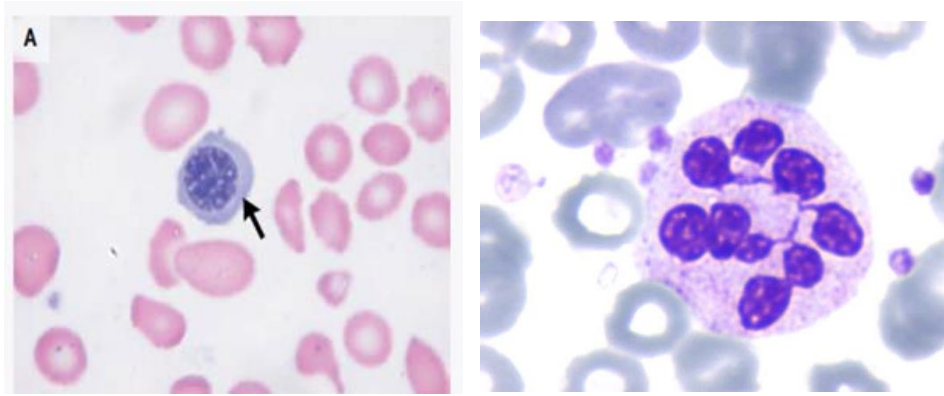


Figura 7. (A) Células en sangre periférica. La extensión muestra macrocitos ovales y fragmentados, así como un eritrocito inmaduro nucleado. (Obtenida de: Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. N Eng J Med 2013; 368: 149-60). **(B)** Pleocariocito: neutrófilo segmentado de mayor tamaño y núcleo con más de cinco segmentos. Se observan con frecuencia en la anemia megaloblástica. (Obtenida de: <http://www.anamerino.com>)

La vitamina B12 es necesaria para el desarrollo y la mielinización inicial del sistema nervioso central, así como para el mantenimiento de su función normal. Por tanto, ante un déficit de vitamina B12 puede ocurrir una desmielinización a nivel de la columna vertebral, desmielinización ocasional de los nervios craneales y periféricos, así como de la materia blanca del cerebro; es decir, "enfermedad de los sistemas combinados". Los síntomas cerebrales normalmente se acompañan de parestesias y signos de mielopatía o neuropatía (Reynolds, 2006).

Manifestaciones menos comunes asociadas con la deficiencia de vitamina B12 incluyen: glositis, malabsorción, infertilidad, trombosis, ocasionalmente hiperpigmentación, etc.

Como vemos, el espectro de patologías asociadas a este déficit es muy amplio e inespecífico, desde asintomático hasta prácticamente mortal en casos de pancitopenia o mielopatía. En la **Figura 8** se muestran la clínica y los hallazgos de laboratorio mencionados anteriormente:

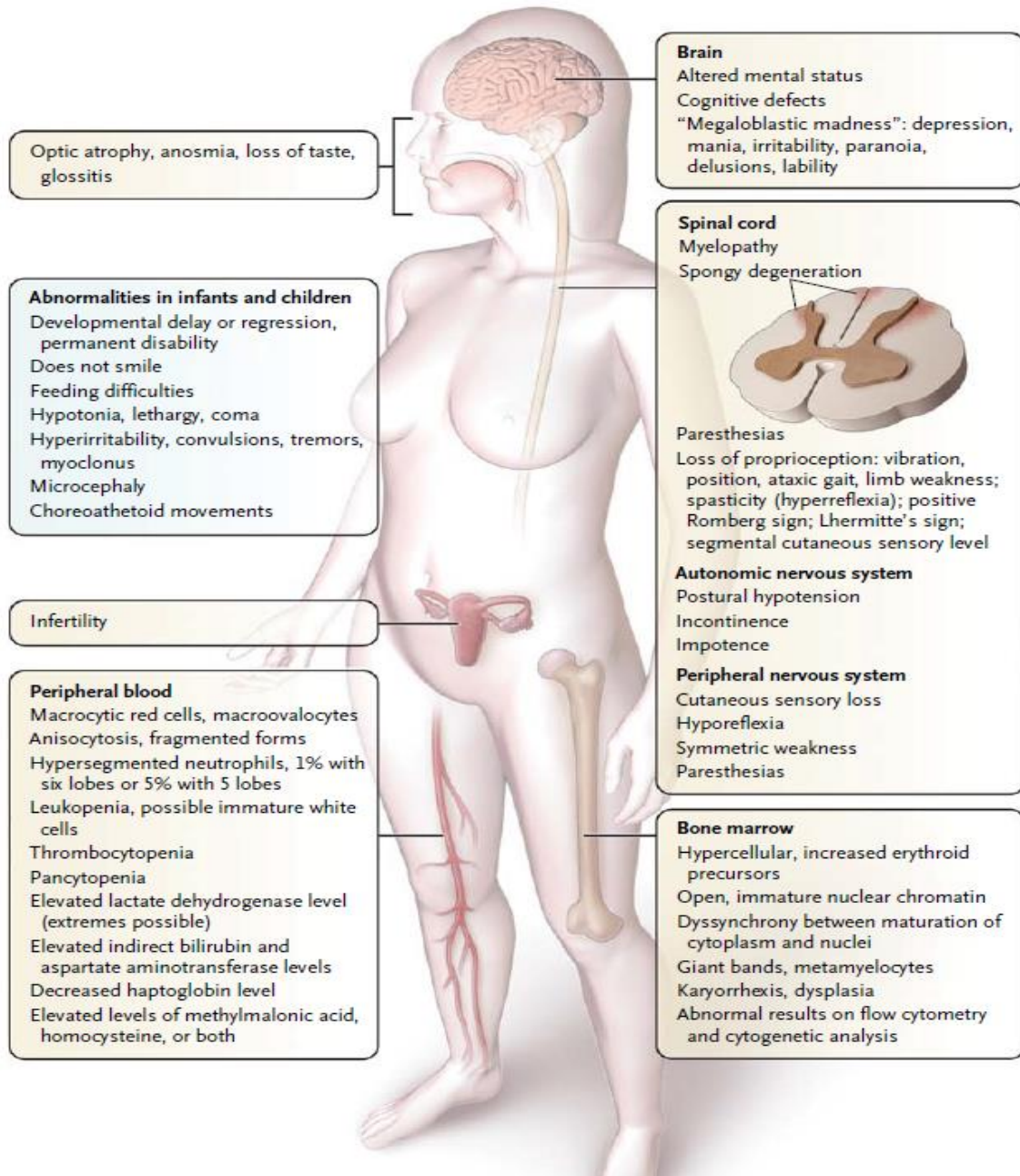


Figura 8. Hallazgos y manifestaciones clínicas del déficit de cobalamina. (Obtenida de: Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. N Eng J Med 2013; 368: 149-60)

A la hora de valorar un probable déficit, los siguientes conceptos deben tenerse muy en cuenta:

- No existe correlación entre las características hematológicas y neurológicas (McCadden, 2013). Si bien es cierto que el diagnóstico de déficit de vitamina B12 se realiza con mayor frecuencia en pacientes con anemia megaloblástica, existe mayor riesgo de no diagnosticar el déficit en el grupo de sujetos con manifestaciones clínicas y desarrollar así complicaciones neurológicas irreversibles.
- Existe evidencia de que los pacientes con vitamina B12 insuficiente tienen mayor riesgo de desarrollar osteoporosis.
- La anemia perniciosa predispone no sólo a desarrollar carcinoma gástrico sino también a otras complicaciones autoinmunes (enfermedades tiroideas, vitíligo, diabetes mellitus,... (Stabler, 2013).
- A pesar de que en muchas ocasiones de forma concomitante se eleva la homocisteína, existe suficiente evidencia de que el déficit de vitamina B12 no aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Van Oijen y cols, 2007), siendo este un tema muy controvertido en la actualidad.

El enigma del déficit subclínico de cobalamina (SCCD)

Como ya hemos mencionado, existe un estado en el que a pesar de las alteraciones bioquímicas, no existen manifestaciones clínicas (Carmel, 2012).

Es un estado más prevalente que la deficiencia sintomática. En un 30-40% de los casos parece ser consecuencia de la malabsorción de cobalamina asociada a alimentos (food-bound cobalamin deficiency, FBCD).

Es un error pensar que la situación subclínica evolucionará en todos los casos a sintomatología clínica, dado que todavía no existen ensayos clínicos que demuestren dicha causalidad. En caso de que finalmente progrese a déficit clínico, éste ocurrirá sucesivamente en tres etapas: agotamiento de los depósitos,

desorden metabólico-funcional y aparición de manifestaciones clínicas (trastornos neurológicos, anemia megaloblástica, enfermedad vascular oclusiva, afectación gastrointestinal,...). Existe también la posibilidad de que el estado subclínico se mantenga indefinidamente fluctuando entre el estado normal y subclínico o que remita completamente sin conocer el motivo (Carmel, 2011).

Este fenómeno debe ser muy tenido en cuenta sobre todo para identificar los casos tratables ya que es una entidad de muy difícil manejo (Shipton y Thachil, 2015) y no es posible desarrollar puntos de corte para diferenciar entre los estados clínico y subclínico (Devalia y cols, 2014). Además, la definición de déficit de vitamina B12 varía según el método y las características técnicas del ensayo utilizado para su determinación.

1.1.6. Diagnóstico

Dado que el folato y la vitamina B12 están implicados en un gran número de procesos bioquímicos es fundamental para detectar su deficiencia en estadios iniciales, disponer de métodos sensibles y con baja imprecisión en los puntos de corte, además de unos rangos de referencia adecuados para nuestra población. **Establecer los límites adecuados** es especialmente importante y crítico a la hora de clasificar a los pacientes, ya que la población con déficit subclínico es asintomática. Además, la **falta de un estándar oro** complica el diagnóstico y la consecuente toma de decisiones, especialmente cuando, como en el caso de un déficit subclínico, el diagnóstico depende completamente de los biomarcadores (Bock y Eckfeldt, 2011). Los problemas de sensibilidad y especificidad de la gran mayoría de determinaciones relacionadas con la detección del déficit de vitamina B12 (cobalamina, ácido metilmalónico, holotranscobalamina II, homocisteína,...) hacen que sea necesario incluir al menos dos marcadores, uno plasmático y otro funcional, para clasificar correctamente a los individuos (Yetley y cols, 2011a; Valente y cols, 2011; Yetley y cols, 2011b). Entre la población de riesgo (ancianos, vegetarianos, embarazadas y pacientes con enfermedades renales e intestinales), la **determinación de vitamina B12 total es la utilizada como cribado**, a pesar de ser un marcador tardío e inespecífico (Herrmann y Obeid, 2008; Clarke y cols, 2007; Hvas y Nexø, 2006).

Entre los marcadores asociados a la determinación de la vitamina B12 los más relevantes son: folato sérico, holotranscobalamina II (vitamina B12 activa), ácido metilmalónico y homocisteína. A su vez, el método de determinación y el punto de corte empleado para cada uno de estos analitos introducen una dispersión adicional a la hora de clasificar a los pacientes (Valente y cols, 2011).

A pesar de ser moléculas simples, presentan características (unión a proteínas, múltiples formas, baja concentración plasmática,...) que hacen que la estandarización sea verdaderamente difícil, aunque hoy día los inmunoensayos competitivos son los predominantes en los laboratorios clínicos (Vogeser y Lorenzl, 2007). En el mercado existen diversas técnicas y casas comerciales que ofrecen la posibilidad de determinar vitamina B12 y folato séricos; sin embargo, proporcionan puntos de corte diferentes, por lo que los resultados que informan no son transferibles.

En la literatura existen diferentes algoritmos y recomendaciones para diagnosticar los desórdenes de la vitamina B12 y el folato séricos. La mayoría, tratan de evitar pruebas invasivas innecesarias y que se realizan de manera sistemática a toda la población (Andrés y cols, 2004; Hannibal y cols, 2016). Fundamentalmente se han aplicado algoritmos que combinan un mínimo de dos biomarcadores, siempre conociendo sus ventajas y desventajas (Palacios y cols, 2013), así como algoritmos en cascada que comienzan con la determinación inicial de vitamina B12 sérica total (Berg y Shaw, 2013). También se han publicado estrategias diagnósticas como ecuaciones basadas en los 4 parámetros fundamentales (Fedosov y cols, 2015). Dado que no se puede realizar un cribado a toda la población y que los niveles de vitamina B12 pueden situarse por encima del extremo inferior del rango de referencia del laboratorio, incluso en pacientes con déficit clínico, para documentar la deficiencia previamente a iniciar el tratamiento, generalmente se deben medir el ácido metilmalónico, la homocisteína total o ambos. En los casos de ausencia de restricción dietética o causa conocida de malabsorción se justifica continuar con el estudio -en particular, pruebas de anemia perniciosa (anticuerpos anti-factor intrínseco).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el estatus de vitamina B12 según los siguientes puntos de corte: >221pmol/L “*B12 adequacy*”; entre 148 y 221pmol/L “*lowB12*”; y menos de 148 pmol/L “*B12 deficiency*” (Allen, 2009).

Sin embargo, tal y como hemos mencionado, estos puntos de corte no son extrapolables a toda la población. En la literatura no existe consenso sobre los puntos de corte establecidos para la vitamina B12 y sus metabolitos asociados (Aparicio-Ugarriza y cols, 2015), por lo que **SE DEBEN ESTABLECER VALORES DE REFERENCIA PROPIOS**, haciendo especial hincapié en los límites que determinan insuficiencia (incertidumbre).

Es necesario que cada centro establezca sus propios protocolos basándose en las publicaciones actualizadas y las recomendaciones realizadas por las guías clínicas (Devalia y cols, 2014).

1.2. Valores de Referencia

El objetivo primordial del laboratorio clínico es la detección de variaciones de los distintos constituyentes, aportando una serie de valores cuantitativos, con fines preventivos, diagnósticos y de control de tratamiento. Estos valores deben ser interpretados en relación con valores similares obtenidos en condiciones fisiológicas, pudiendo estar sometidos a variaciones de origen genético, constitucional o ambiental, así como a las introducidas por la administración de medicamentos u otros agentes terapéuticos.

Al ser competencia del laboratorio clínico la producción e interpretación de valores analíticos, le corresponde a éste el establecimiento de valores de referencia en función de la población a la que presta sus servicios y de la metodología que utiliza. Es imprescindible para la correcta obtención e interpretación de los valores de referencia el conocimiento y la descripción meticulosa de todos los factores capaces de introducir variaciones.

1.2.1. Concepto de valores de referencia

Cualquier resultado del laboratorio carece de interés por sí mismo. Una primera aproximación a dotar de contenido el resultado de la determinación de un constituyente es su comparación con el valor de dicho constituyente en una población considerada como “sana”, es decir, compararlo con los llamados valores de referencia.

El concepto de valores de referencia ha sido formulado por el *Expert Panel* de la IFCC y recogido, en ocasiones, con algunos matices diferentes, por comisiones nacionales *ad hoc* con el propósito de unificar conceptos, métodos y terminología, habida cuenta de la importancia formal y conceptual de la comparación antes aludida.

Un *valor de referencia* se define como el resultado analítico obtenido en un *individuo de referencia*. Este individuo es una persona que pertenece a la comunidad a la que sirve el laboratorio en cuestión, y que se caracteriza

fundamentalmente por disfrutar de un estado de salud definido por el propio investigador, no un estado de salud “absoluto”. Esta flexibilidad en la definición de individuo de referencia permite establecer valores de referencia utilizando grupos peculiares tanto por su estado fisiológico (mujeres embarazadas, por ejemplo), patológico (insuficiencias renales en tratamiento con diálisis), o historia farmacológica (mujeres tomando anticonceptivos orales), sin descuidar los fundamentos teóricos.

Todos los individuos que cumplan las condiciones de inclusión definidas por el investigador, constituyen la *población de referencia*. La aplicación de la estadística a los datos obtenidos tras realizar las correspondientes determinaciones analíticas en todos estos individuos permite la reducción de la información.

El número de las personas que integran la *población de referencia* suele ser inmenso y, por lo tanto imposible de obtener. Por esta razón se recurre a la teoría estadística del muestreo y se define la *muestra de referencia*: un grupo representativo de la población de referencia sobre el que se realizarán las determinaciones analíticas. Es evidente que al actuar así se introducirán errores debido a la imperfección de la selección de los individuos.

Esta imperfección, no obstante, será reducida según vaya aumentándose el tamaño de la muestra. Por esta razón se definen unos intervalos de tolerancia, en función del número de individuos que constituyen la muestra de referencia, de cada estimación de los parámetros de la población. Dentro de estos intervalos de tolerancia se halla con una probabilidad determinada el auténtico valor del parámetro poblacional: media aritmética, desviación típica, etc.

Las distribuciones de probabilidad de los datos recogidos en la muestra de referencia constituyen la distribución de referencia. Esta distribución no sigue necesariamente un modelo gaussiano, sino más bien la obtención de tal modelo suele ser excepcional. El tipo de distribución condiciona el tratamiento estadístico de los datos.

La probabilidad de que un resultado forme parte de la población de referencia a lo largo de toda la distribución es, obviamente, máxima (igual a la unidad). En otras palabras, el intervalo de resultados analíticos que contienen la máxima

probabilidad, la probabilidad igual a uno, es aquel que está delimitado por los valores máximo y mínimo (Ricós y cols, 2004). Generalmente se suele definir el intervalo de referencia como el intervalo de resultados que comprenden un 95% de la probabilidad total. Los límites de este intervalo son, por tanto, los límites de referencia y, por proceder de una muestra de la población, están sujetos al intervalo de tolerancia (Aytekin y Emerk, 2008). En la **Figura 9** se representan esquemáticamente los conceptos mencionados con anterioridad.

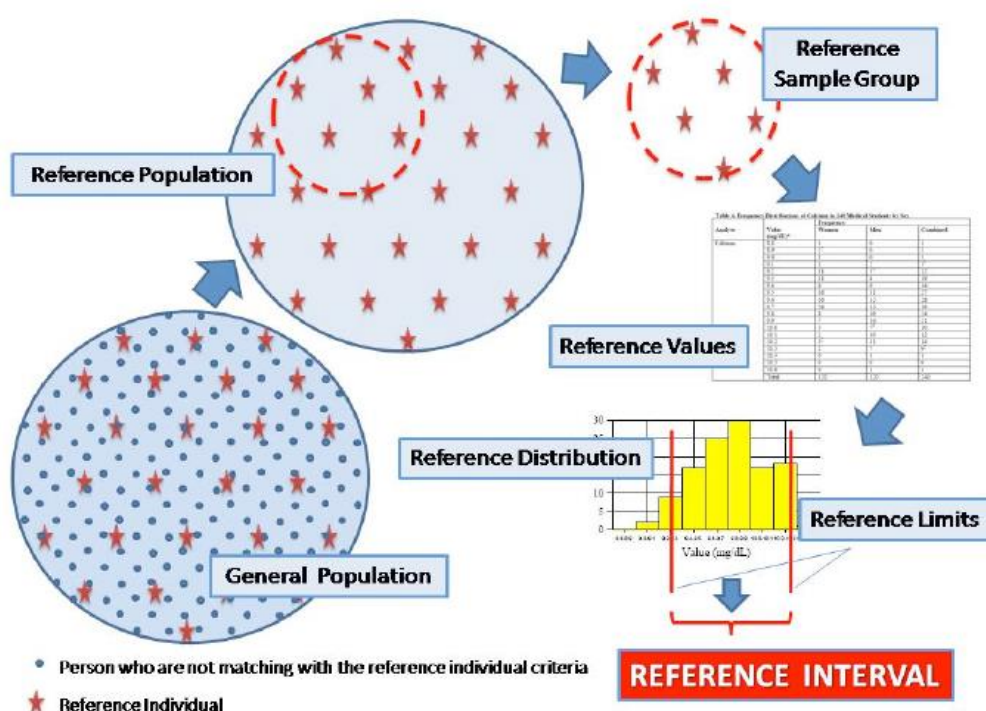


Figura 9. Esquema de la selección de los individuos de referencia para estudios de intervalos de referencia. (Obtenida de: Aytekin M, Emerk K. Accurate Reference Intervals are required for Accurate Diagnosis and Monitoring of Patients. EJIFCC 2008; 19 (2): 137–141)

Los valores de referencia pueden ser categorizados según diferentes criterios, por ejemplo, valores de referencia basados en población o valores de referencia basados en individuos los cuales pueden ser univariados o multivariados, tiempo especificados o tiempo no especificados.

La mayoría de los valores de referencia publicados son valores de referencia basados en población, univariados y tiempo no especificados, es decir los especímenes son tomados de varios individuos de referencia sin tener en cuenta los ritmos biológicos y analizados para un tipo de magnitud (Comisión SEQC, 1991; Fuentes-Arderiu, 2007).

En consecuencia y a día de hoy, en la era de la medicina basada en la evidencia, y en contraste con los avances en el campo de la medicina, los intervalos de referencia siguen siendo la herramienta más utilizada en la toma de decisiones (Horn y Pesce, 2003). Sin embargo, el valor esperado en la práctica clínica es inferior al supuesto valor teórico. Esto es debido a que la obtención de un adecuado intervalo de referencia es una actividad muy exigente y complicada, sobre todo en términos de tiempo, dinero y conocimiento.

Pero, ¿qué se entiende por un "buen" intervalo de referencia? Es un intervalo que, cuando se aplica a la población que atiende dicho laboratorio, incluye correctamente a la mayoría de los sujetos con características similares a las del grupo de referencia y excluye a los demás. Por lo general, se considera un intervalo de referencia "relacionado con la salud", que significa que los sujetos con valores dentro del intervalo tienen una menor probabilidad de ser afectados por una enfermedad específica, mientras que los que están fuera del intervalo tienen una mayor probabilidad estadística de tener la enfermedad o, al menos, de que el valor observado sea normal en una persona sana (Ceriotti, 2007).

Generalmente, en la práctica diaria, los laboratorios tienden a utilizar los intervalos de referencia proporcionados por los fabricantes, pero en la mayoría de los casos no se ajustan a la población atendida. Por tanto, la pregunta planteada es: ¿de dónde se obtienen los intervalos de referencia utilizados rutinariamente en los Laboratorios Clínicos? La respuesta es muy amplia y variable: desde aisladas publicaciones sobre metodologías, *inserts* de los distintos fabricantes, etc., recomendaciones nacionales e internacionales de organizaciones expertas, hasta los más robustos intervalos de referencia obtenidos directamente de la población aparentemente sana (Tate y cols, 2015).

A pesar de que los laboratorios están cualificados para verificar y validar las diferentes metodologías, no se le da la importancia que tiene al establecimiento y selección de los intervalos de referencia apropiados.

Por lo tanto, es responsabilidad única y exclusiva de los diferentes Laboratorios Clínicos el uso de intervalos de referencia apropiados para la metodología utilizada y la población atendida. Cada Laboratorio, para cada intervalo de referencia para cada analito, debería cuestionarse lo siguiente: ¿es este intervalo de referencia adecuado para mi población, incluyendo los procesos de recolección y el análisis metodológico?

Deberían siempre ser revisados tal y como especifica la *International Organization for Standardization* (ISO) 15189.: “los intervalos de referencia biológicos deberían ser periódicamente revisados. Si un laboratorio tiene motivos para sospechar que un intervalo de referencia concreto no es adecuado para su población, debe investigarlo y corregirlo si procede” (ISO, 2012).

En las directrices del *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI) encontramos exactamente instrucciones detalladas para definir y establecer los intervalos de referencia biológicos (CLSI, 2008).

También se han publicado durante años recomendaciones realizadas para la producción de valores propios de la *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) (Solberg, 1987a; PetitClerc y Solberg, 1987; Solberg, 1987b; Dybkaer y Solberg, 1987; Solberg y PetitClerc, 1988; Solberg y Stasman, 1991).

No obstante, son escasos los laboratorios que en la práctica diaria tienen la capacidad para establecer sus propios intervalos de referencia, debido a la dificultad de obtener individuos de referencia suficientes y al elevado coste de las mediciones. Para obviar este problema, el CLSI propone como alternativa la transferencia y revisión de intervalos de referencia previamente establecidos (González de la Presa y cols, 2016).

- La transferencia de un intervalo de referencia es el proceso por el cual se adapta un intervalo de referencia previamente establecido a otro procedimiento de medida o a una población diferente. No es necesario recoger muestras de individuos de referencia y, simplemente, se pueden usar muestras de individuos de los que no se dispone de información sobre su estado de salud.
- La revisión de un intervalo de referencia es el proceso por el cual se confirma que un intervalo de referencia puede ser transferido, con una razonable confianza, usando un número relativamente pequeño de individuos de referencia.

Así, se debe demostrar que las condiciones preanalíticas (muestreo, transporte y recolección), y la comparación entre métodos (precisión, bias, especificaciones analíticas) son similares, no existiendo diferencias relevantes entre las poblaciones estudiadas. Por lo tanto, cuando se transfieren intervalos de referencia los resultados deben ser al menos equivalentes a los producidos localmente y si no, deberán ser transformados. Una vez transferidos, deberán ser validados utilizando muestras de sujetos aparentemente sanos de la población atendida.

En la siguiente tabla (**Tabla 5**) se muestran los procedimientos para transferir y validar valores de referencia, sugiriendo lo que se debe y no se debe hacer en cada caso.

Procedure	Suggested Do's	Suggested Don'ts
1. Do initial investigation of local laboratory assay to assess its suitability to transfer proposed reference interval obtained in formal study	Assess assay for compatible methodology and same calibration traceability as used to establish reference interval, and for bias: Gather information from manufacturer, EQA programs, and other published sources [Koerbin et al. (11)]; or Do a method comparison study	If biases exist between methods owing to analytical specificity or calibration differences, do not use proposed reference interval
2. Use method comparison study to assess whether: Methods are similar enough to use proposed reference interval as is; Methods are similar enough to develop a transfer equation; or Bias will prevent reference interval transfer	a) Perform method comparison with same assay used to establish reference interval as the comparator according to CLSI EP09-A3 [CLSI (7)]: Use leftover samples (from individuals or produce pools) with concentrations across reference interval; and Consider the data correlation and, if appropriate, use regression analysis to determine slope and y-intercept values to be used for transference b) Perform a multisite (multiple platforms and multiple laboratories) method comparison when considering transfer to a common (shared) reference interval: Use frozen aliquots from healthy individuals; Assess data by applying allowable performance limits to detect any bias [Koerbin et al. (11)]; and If values are within acceptable performance limits for multiple assays/platforms, consider other evidence for use of a shared reference interval [Tate et al. (15)]	a) An inadequate correlation across reference interval concentrations ($r^2 < 0.70$) usually reflects a poor correlation [Estey et al. (8)]; do not transfer proposed reference interval b) Do not share a common reference interval for analytes with values outside the specified allowable limits of performance
3. Perform a validation of proposed reference interval to demonstrate: Similar preanalytical processes and method comparability including precision, bias, and analytical specificity according to predefined acceptance criteria; and No relevant population differences; Also consider use of a common reference interval across multiple assays/platforms for analytes with acceptable bias	a) Perform reference interval validation according to CLSI 28-A3 [CLSI (12)]: Analyze ≥ 20 samples obtained from healthy individuals; Accept proposed reference interval if ≤ 2 values fall outside reference interval b) Mine existing laboratory data if these consist of mostly unaffected results from a general practice population [Jones (14)]: Compare midpoint of extracted data with corresponding midpoint of data used to set reference interval; and Assess expected flagging rates of proposed upper and lower reference limits with current rates [Tate et al. (15)]	a) Do not use proposed reference interval if: Sample collection, transport, and sample handling conditions are different from original study; Method precision and bias are outside acceptance criteria (QC and EQA criteria); Significant population differences exist; or >2 values are outside reference interval on 2 occasions. b) Do not use data mining of laboratory data if: Healthy distribution of values cannot be clearly distinguished from the non-healthy values; or There is significant method bias resulting in falsely high or low flagging rates

Tabla 5. Procedimientos para transferir y validar intervalos de referencia. (Obtenida de: Tate JR, Yen T, and Jones G. Transference and Validation of Reference Intervals. Clin Chem 2015; 61(8):1012-1015)

Debemos tener en cuenta que la mayoría de las magnitudes biológicas se caracterizan por no ser constantes, sino variables. Los analitos determinados en el laboratorio clínico forman parte de estas magnitudes biológicas. En ellos, los valores observados en distintos individuos suelen ser diferentes.

Sin embargo, aun siendo conocidos o teniendo controlados experimentalmente los factores causantes de la variación preanalítica y analítica, es un hecho que para una magnitud concreta los valores observados en diferentes individuos son distintos. También se observa que una misma magnitud repetida en un mismo individuo en diferentes momentos del día o de su vida, arrojará diferentes resultados cuyas diferencias no son imputables únicamente a factores preanalíticos y al error analítico. Esta variación es conocida como **Variabilidad Biológica** (Ricós, 2012; Fraser, 2001).

1.2.2. Variabilidad biológica

El concepto de la variabilidad biológica (VB) es fundamental para comprender cuestiones relacionadas con la calidad de la información que aporta el laboratorio clínico durante las distintas fases. Es decir, la VB se debe tener en cuenta en las etapas preanalítica, analítica y post-analítica, siendo en esta última donde juega un papel fundamental en la elaboración y aplicación de valores de referencia tradicionales (Plebani y Lippi, 2010).

De hecho, en los estudios llevados a cabo en las últimas décadas se ha demostrado que la VB tiene una gran influencia en los valores de referencia poblacionales, lo que apoya la necesidad de revisar este concepto también, o al menos, tenerlo muy en cuenta (Henny y cols, 2000).

En la práctica diaria, para comprender el término de VB, debemos entender que se compone de la VB intra-individual (CV_{WS}) y VB inter-individual (CV_{BS}). El conocimiento de la variación es importante no sólo para el correcto uso de los valores de referencia, sino también para la lógica interpretación de los resultados.

Para algunas magnitudes, en lugar del intervalo de referencia poblacional, se utiliza un valor discriminante para comparar los resultados aislados. En otros casos, se comparan los resultados de un paciente con sus resultados anteriores, pero, en general, la comparación de los resultados consecutivos no suele ser utilizada en toma de decisiones clínicas cuando estos resultados están dentro del intervalo de referencia. Los datos publicados sobre VB pueden ayudar a decidir cuál es el mejor criterio para valorar los resultados de una magnitud.

Un aspecto muy importante a tener en cuenta es la relación entre la CV_{WS} y CV_{BS} . A este cociente se le denomina **índice de individualidad (II)**. Las magnitudes con fuerte individualidad presentan una estricta regulación homeostática dentro de cada individuo, mientras que los puntos homeostáticos entre individuos son muy diferentes. De este modo, su CV_{WS} es baja en relación a la CV_{BS} . Los intervalos de referencia poblacionales en estas magnitudes son muy amplios y su uso puede ser inadecuado para aquellos pacientes cuyo punto homeostático está muy centrado entre dichos límites o muy alejado del límite de interés clínico. De modo que pueden sufrir un cambio en su estado de salud acompañado de un cambio clínicamente significativo en su valor habitual que no llegue a sobrepasar el intervalo de referencia poblacional (Fraser, 2001).

Para que el cambio del resultado de una magnitud respecto al resultado previo sea clínicamente significativo, debe superar aquel valor que puede ser explicado por las dos fuentes de variabilidad inherente: CV_{WS} y variabilidad analítica (CV_A) (imprecisión analítica). Este valor numérico se denomina Valor de Referencia de un Cambio (RCV). El concepto es simple y el cálculo sencillo y se ha de aplicar para evaluar el significado clínico de las diferencias observadas en los resultados seriados de un individuo (Fraser, 2011; Plebani y Lippi, 2012).

En la práctica hay muchos datos en la literatura, por lo que todos los laboratorios deberían usar datos disponibles para establecer especificaciones de la calidad, valores de referencia de un cambio, evaluar la utilidad de los valores de referencia convencionales y otros propósitos.

1.3. Pruebas diagnósticas y conceptos estadísticos

El diagnóstico es un proceso complejo, siempre basado en la incertidumbre. Esta incertidumbre se puede acotar por medio de herramientas estadísticas basadas en la teoría de la probabilidad.

Es evidente que una buena prueba diagnóstica es aquella que ofrece resultados positivos en enfermos y negativos en sanos. Por lo tanto, las condiciones que deben ser exigidas a un test son (Morrison, 1992):

- **Validez:** Es el grado en que un test mide lo que se supone que debe medir. ¿Con que frecuencia el resultado del test es confirmado por procedimientos diagnósticos más complejos y rigurosos? La sensibilidad y la especificidad de un test son medidas de su validez.

- **Reproducibilidad:** es la capacidad del test para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares. La variabilidad biológica del hecho observado, la introducida por el propio observador y la derivada del propio test, determinan su reproducibilidad.

- **Seguridad:** La seguridad viene determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo. ¿Con que seguridad un test predecirá la presencia o ausencia de enfermedad? Ante un resultado positivo de un test ¿qué probabilidad existe de que este resultado indique presencia de la enfermedad? Se debe tener en cuenta que esta probabilidad está muy influenciada por la prevalencia de la patología (Pita y Pértegas, 2003).

1.3.1. Conceptos y propiedades

La capacidad diagnóstica de los análisis bioquímicos supone que los resultados del análisis ayudan a diagnosticar si una persona está o no enferma. Existen diferentes modelos que tratan de definir la capacidad diagnóstica de los test bioquímicos, siendo el más importante el “MÉTODO DEL VALOR PREDICTIVO”:

- Verdaderos positivos (VP): personas enfermas con resultados positivos
- Falsos positivos (FP): personas sanas con resultados positivos
- Verdaderos negativos (VN): personas sanas con resultados negativos
- Falsos negativos (FN): personas enfermas con resultados negativos

Existen características o propiedades que surgen de la aplicación de los análisis a un número de personas:

- SENSIBILIDAD: frecuencia de personas enfermas que han tenido un resultado positivo respecto a la muestra de todas las personas enfermas. Probabilidad de que el resultado de una prueba sea positivo cuando está presente la enfermedad.

$$S = VP/(VP+FN) \times 100$$

De ahí que también la sensibilidad se conozca como “fracción de verdaderos positivos (FVP)”

- ESPECIFICIDAD: frecuencia de personas sanas que han tenido un resultado negativo respecto a la muestra de todas las personas sanas. Probabilidad de que el resultado de una prueba sea negativo cuando no está presente la enfermedad.

$$E = VN/(VN+FP) \times 100$$

De ahí que también sea denominada “fracción de verdaderos negativos (FVN)”

Cuando se estudia una muestra de pacientes, los datos obtenidos permiten clasificar a los sujetos en cuatro grupos según una tabla 2x2. En ella se enfrenta el resultado de la prueba diagnóstica (en filas) con el estado real de los pacientes en columnas) o, en su defecto, el resultado de la prueba de referencia o “gold standard” que vayamos a utilizar (**Tabla 6**). El resultado de la prueba puede ser correcto (VP y VN) o incorrecto (FP y FN). El análisis de su validez puede obtenerse calculando la S y E.

Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico	
	Enfermo	Sano
Positivo	Verdaderos Positivos (VP)	Falsos Positivos (FP)
Negativo	Falsos Negativos (FN)	Verdaderos Negativos (VN)

Tabla 6. Relación entre el resultado de una prueba diagnóstica y la presencia o ausencia de una enfermedad. (Obtenida de: Pita Fernández, S, Pértegas Díaz S. Pruebas diagnósticas: sensibilidad y especificidad. Cad Aten Primaria 2003; 10: 120-124)

Los conceptos de S y E, sin embargo, carecen de utilidad en la práctica clínica, ya que no proporcionan información relevante a la hora de tomar una decisión clínica. Son más bien propiedades intrínsecas de la prueba diagnóstica y definen su validez independientemente de cuál sea la prevalencia de la enfermedad. Por lo tanto, la información se completa con el uso de los valores predictivos:

- VALOR PREDICTIVO POSITIVO: probabilidad de que el individuo padezca la enfermedad.

$$VPP = VP/(VP+FP) \times 100$$

- VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: probabilidad de que el individuo no padezca la enfermedad.

$$VPN = VN/(VN+FN) \times 100$$

Estos parámetros, a pesar de ser de enorme utilidad a la hora de tomar decisiones clínicas y transmitir a los pacientes información sobre su diagnóstico, presentan la limitación de que dependen en gran medida de lo frecuente que sea la enfermedad

a diagnosticar. Queda claro, por tanto, que los valores predictivos no pueden ser utilizados como índices a la hora de comparar dos métodos diagnósticos diferentes, ni tampoco a la hora de extrapolar resultados. Por ello, es necesario determinar otros índices que sean clínicamente útiles y no dependan de la prevalencia de la enfermedad en la población a estudiar. Se trata de: razón de verosimilitud, razón de probabilidad (RP) o *likelihood ratio* (García, 2000). La RP indica cuánto aumenta o disminuye la probabilidad de que esté presente la alteración a partir de un resultado de una prueba diagnóstico:

- La razón de probabilidad para un resultado positivo compara la proporción de verdaderos positivos entre el total de enfermos (sensibilidad), con la de falsos positivos, (1-especificidad). Tratándose de una medida de razón, expresa cuántas veces más (o menos), es probable que se encuentre un resultado positivo de una prueba en personas enfermas, en comparación con las no enfermas.

$$RP (+) = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{especificidad}}$$

Teóricamente, para un valor igual a la unidad, la RP indicaría que el resultado de la prueba a ese nivel puede ser igualmente probable que provenga de un enfermo que de un no enfermo. Un valor de 3, indicaría que ese resultado es tres veces más frecuente en personas enfermas que entre quienes no tienen la enfermedad. Los valores de la RP más alejados de la unidad procederán de niveles del resultado de la prueba que corresponderán a los individuos con la enfermedad; por otro lado, un valor menor que 1, en términos generales, refleja que es más probable que el resultado de la prueba corresponda a individuos sin la alteración.

- La razón de probabilidades para un resultado negativo, a su vez, compara la proporción de falsos negativos en relación con la de la especificidad de la prueba.

$$RP (-) = \frac{\text{Falsos negativos}}{\text{Especificidad}}$$

En este caso, en teoría, un valor de 1 reflejaría que un resultado a ese nivel puede ser igualmente probable que provenga de un enfermo no reconocido por la prueba, (sensibilidad igual a cero), como de un individuo sin la patología en estudio (máxima especificidad).

A modo de guía, el siguiente cuadro (**Tabla 7**) muestra cómo pueden interpretarse los valores de RP:

Valores de RP		Cambios entre la probabilidad preprueba y la posprueba
+	>10.0	Grandes, y a menudo concluyentes
-	< 0.1	
+	5.0-10.0	Moderados
-	0.1-0.2	
+	2.0-5.0	Pequeños, pero algunas veces importantes
-	0.5-0.2	
+	1.0-2.0	Pequeños, y rara vez importantes
-	0.5-1.0	

Tabla 7. Interpretación de los valores de la razón de probabilidades. (Adaptado de: Jaeschke R, Guyatt GH, Sackett DL. User's guide to the medical literature. III. How to use an article about a diagnostic test. B. What are the results and will they help me in caring for my patients? JAMA 1994; 271: 704)

La situación ideal a la hora de realizar un diagnóstico es que la sensibilidad y la especificidad del método elegido sean del 100%, pero no es así y los valores de salud y enfermedad se solapan, de modo que parte de los valores de salud entran en los valores de enfermedad (FP) y parte de los valores de enfermedad entran en los valores de salud (FN). Por tanto, se podrá hacer un corte diagnóstico según se desee ganar en sensibilidad o especificidad de tal modo que, generalmente, cuando se gana en sensibilidad se pierde en especificidad y viceversa:

Si se hace un corte diagnóstico ganando en sensibilidad, se aumenta el número de casos positivos gracias a un aumento de los falsos positivos; de ésta forma se

asegura la detección de personas enfermas o que podrían estarlo. Se emplea en los *screening* de población.

Si el corte diagnóstico se hace de modo que aumente la especificidad, se eleva el número de personas enfermas por detectar, aunque se sabe con seguridad qué personas están realmente enfermas. Se emplea en situaciones concretas como la determinación de los marcadores tumorales, para saber si hay que administrar un fármaco que conllevará efectos adversos para la persona.

Para determinar la relación existente entre la S y E de una prueba, en función del umbral de diagnóstico o punto de corte, se construyen las llamadas **CURVAS ROC** (*Receiver Operating Characteristic*) o CURVAS DE RENDIMIENTO DIAGNÓSTICO. En ellas se representa la S en ordenadas frente a $1 - E$ en abscisas, siendo el área bajo la curva (AUC) la que indica la potencia diagnóstica de la prueba (**Figura 10**). El punto de corte que mejor discriminará entre patología y no patología es aquel que está más cercano al eje de ordenadas y más alejado del eje de abscisas (Moratalla, 2015).

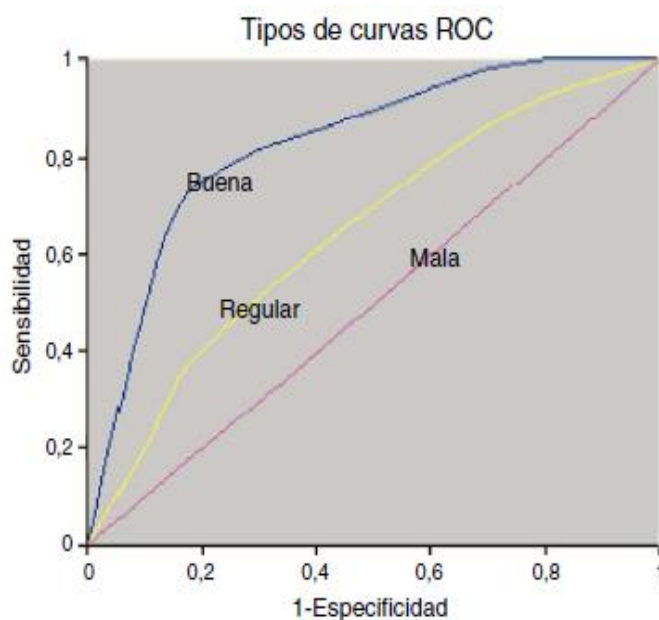


Figura 10. Ejemplo de construcción de curvas ROC. (Disponible en: http://www.hrc.es/bioest/roc_1.html)

1.3.2. Análisis de concordancia

La precisión de una prueba depende tanto del instrumento de medida como del proceso de medición. Para su control necesitamos comparar entre sí medidas repetidas de la misma variable y evaluar el grado de acuerdo entre ellas. Ese grado de acuerdo se denomina concordancia (**Figura 11**), y el análisis de la concordancia entre dos variables nos va a permitir evaluar la reproducibilidad o variabilidad de la medición (Gómez y Pérez, 2007).

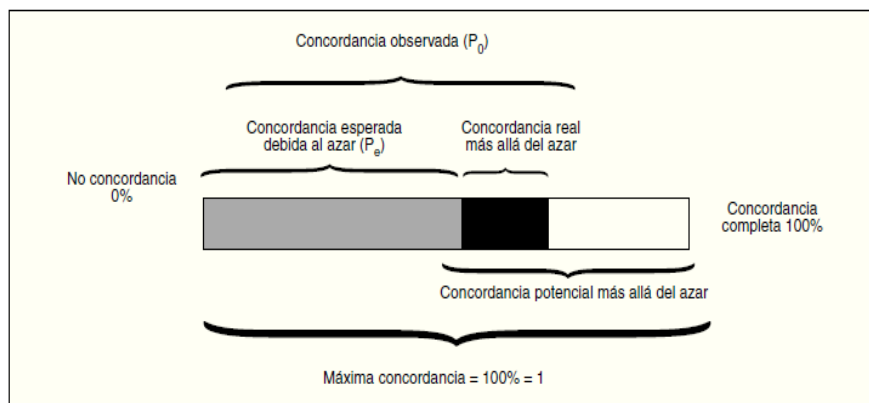


Figura 11. Concordancia. (Obtenida de: Gómez González C y Pérez Castán JF. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. SEMERGEN. 2007; 33(10): 519-19)

En los estudios de evaluación de pruebas diagnósticas las primeras medidas de comparación se basan en la fiabilidad y la reproducibilidad o precisión de las medidas.

La fiabilidad puede medirse con diversos estimadores: para variables categóricas con los índices kappa (según sean nominales u ordinales) y para variables continuas con el coeficiente de correlación intraclase (Zhou y cols, 2011).

El índice kappa es una medida de la concordancia entre distintas mediciones, y se calcula comparando en una tabla de $n \times n$ los resultados de las diferentes interpretaciones de medida. A modo de orientación, se presenta en las siguientes tablas (**Tabla 8a**, **Tabla 8b**) una lista de categorías para interpretación de los distintos índices:

Tabla 20. Grado de concordancia en función del índice kappa						
Índice kappa	< 0	0-0,2	0,2-0,4	0,4-0,6	0,6-0,8	0,8-1
Grado de concordancia	Sin acuerdo	Insignificante	Bajo	Moderado	Bueno	Muy bueno

(a)

Tabla 21. Grado de concordancia en función del coeficiente de correlación interclase					
R	< 0,31	0,31-0,50	0,51-0,70	0,71-0,90	> 0,90
Grado de concordancia	Mala o nula	Mediocre	Moderada	Buena	Muy buena

(b)

Tabla 8. (a) Grado de concordancia en función del índice kappa; **(b)** Grado de concordancia en función del coeficiente de correlación intraclase. (Obtenida de: Gómez González C y Pérez Castán JF. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. SEMERGEN. 2007; 33(10): 519-19)

El índice kappa es muy utilizado para el análisis de concordancia pues evita los problemas de interpretación de los simples porcentajes de concordancia respecto a los errores de éste en los datos marginales. También tiene sus problemas de aplicabilidad.

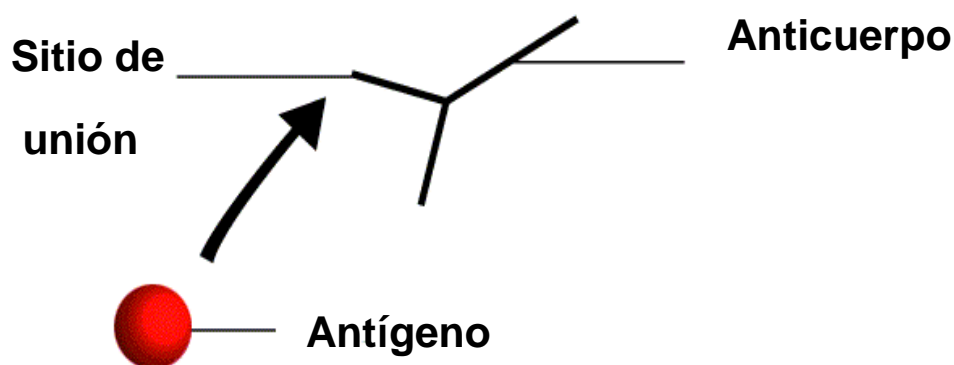
Como conclusión, es importante considerar que si un estudio aporta información sobre la fiabilidad de las mediciones en la prueba diagnóstica y en el estándar de referencia, incorpora sólidos argumentos para aceptar que sus resultados son válidos, al menos en el aspecto de la precisión de los test diagnósticos analizados.

1.4. El inmunoensayo

En el mercado existen multitud de técnicas de inmunoanálisis, pudiendo ser éstas clasificadas, por una parte, en función del efecto de la unión: inmunoanálisis homogéneos o heterogéneos y, por otra, en función de la disponibilidad del reactivo: inmunoanálisis competitivos y no competitivos o inmunométricos (Tietz, 2006; Henry, 2005).

1.4.1. Principio de medida y analítico

El inmunoensayo es una prueba que se realiza para cuantificar un analito, utilizando una reacción de unión antígeno-anticuerpo. En los inmunoensayos, el antígeno es el analito que se está midiendo. Los anticuerpos son ideales para su uso en los inmunoensayos, ya que pueden producirse para unirse a antígenos específicos, pudiendo emplearse tanto anticuerpos policlonales como monoclonales (Pineda y Ruiz, 2011).



En los tres métodos empleados para determinación de vitamina B12, el principio de medida es un ensayo **inmunoenzimático de tipo competitivo** asociado a quimioluminiscencia (excepto el analizador Elecsys que emplea la electroquimioluminiscencia ECLIA).

En los inmunoanálisis competitivos el analito del espécimen que se desea valorar, compite con un antígeno marcado por un número limitado de lugares de unión al anticuerpo. De esta forma se requieren tres componentes:

- Un antisuero con anticuerpos (Ac) específicos no marcados.
- Muestra del paciente con el analito, antígeno a valorar, no marcado (Ag)
- Antígenos marcados (Ag^*) con capacidad de unión con los citados anticuerpos.

Durante el proceso de incubación, la mezcla de Ag y Ag^* compiten por su unión al Ac, de tal forma que cuanto mayor sea la cantidad de Ag de la muestra, menor será el Ag^* ligado. La señal obtenida en este tipo de ensayos es por lo tanto inversamente proporcional a la concentración del analito del espécimen.

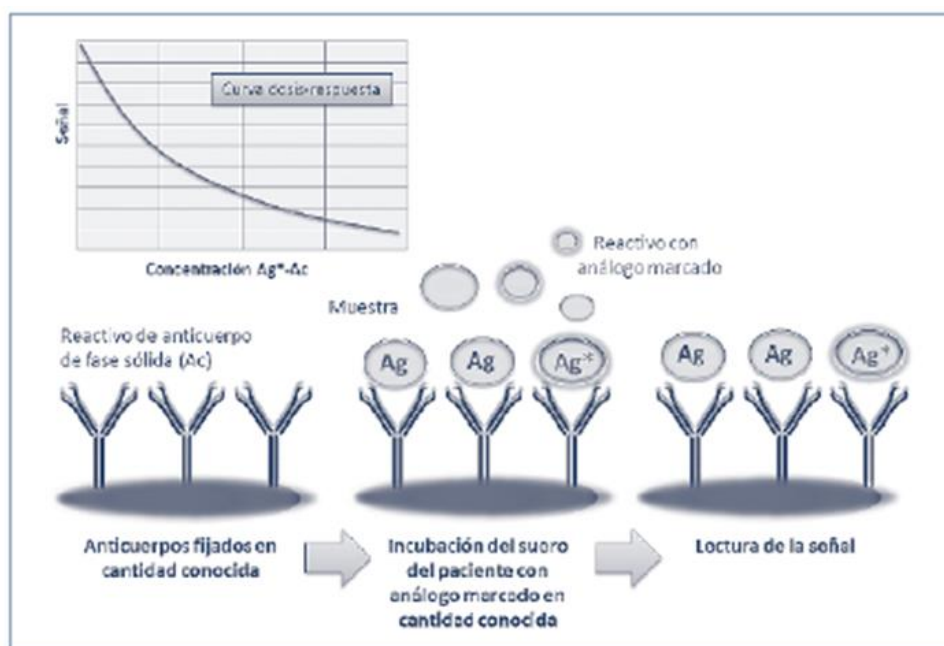


Figura 12. Inmunoensayo competitivo. (Obtenida de: Pineda Tenor D, Ruiz Martín G. El laboratorio clínico y la función hormonal. Preanalítica, analítica, postanalítica y calidad. Ed. LABCAM. 2011)

Los luminoimmunoanálisis se basan en la utilización de sustancias luminiscentes como marcadores para detectar la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Hoy en día las técnicas más empleadas en los laboratorios por las características implícitas son:

- La electroquimioluminiscencia, donde la emisión de luz tiene lugar como resultado de la oxidación de un compuesto marcador de tris-bipiridilo de rutenio en la superficie de un electrodo, en presencia de tripropilamida, para formar especies de rutenio (II) excitadas, las cuales vuelven a su estado basal emitiendo luz a 620 nm.
- El inmunoensayo magnético quimioluminiscente, donde se emplean micropartículas magnéticas con anticuerpos de captura de su superficie para ligar el Ag a determinar y anticuerpos marcados para el revelado de la reacción.

A continuación se muestra un esquema de esta técnica que emplea la casa comercial Roche Diagnostics® (**Figura 13**), técnica actualmente en uso en nuestro laboratorio:

2.2 Elecsys test principle

Competition principle. Total duration of assay: 27 minutes (37 °C).

1. During the first incubation step of the Elecsys Vitamin B₁₂ assay, the sample is incubated with the Pretreatment 1 and Pretreatment 2 reagents, releasing the bound vitamin B₁₂ from endogenous intrinsic factor (IF), which is immediately denatured at the high pH.
2. In the second step, the pretreated sample is incubated with the ruthenium labeled IF, and an B₁₂-binding protein complex is formed, the amount of which is dependent upon the analyte concentration in the sample.
3. In the third step, streptavidin-coated microparticles and vitamin B₁₂ labeled with biotin are added, and the still-vacant sites of the ruthenium labeled IF become occupied, with formation of a ruthenium labeled IF-vitamin B₁₂ biotin complex.

The entire complex becomes bound to the solid phase via interaction of biotin and streptavidin (figure 2).

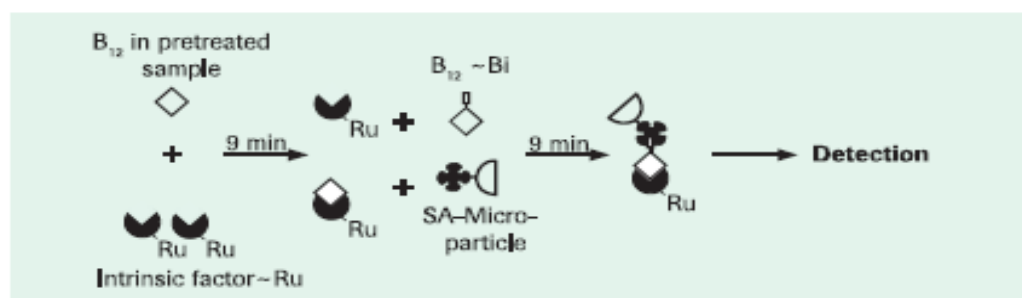


Fig. 2: Elecsys Vitamin B₁₂ test principle

Figura 13. Metodología que emplea el equipo Cobas® e411 (Roche Diagnostics®) para la determinación de vitamina B12.

1.4.2. Automatización del Inmunoanálisis

La automatización de los inmunoanálisis ha supuesto un “antes y un después” en los análisis realizados en los Laboratorios Clínicos. El número de analizadores de inmunoanálisis disponibles en el mercado es amplio. Asimismo, la variabilidad en el diseño, la capacidad y la versatilidad son extensas (Sokoll y Chan, 1999; Bock, 2000; Wheeler, 2001).

Ventajas de los inmunoanálisis automatizados

Mejora en la precisión

El riguroso control de tiempos, volúmenes y temperatura, inherente a los sistemas automáticos, y las mejoras en el sistema de cálculo debidas al software acompañante tienen como consecuencia una mejora en la precisión.

Mayor fiabilidad

El uso cada vez más extendido de tubo primario y códigos de barras, las conexiones online bidireccionales con los sistemas de información del laboratorio y, por último, un menor tiempo de almacenamiento de la muestra aumentan la fiabilidad de los resultados.

Menor tiempo de respuesta

La elevada velocidad de procesamiento de los analizadores posibilita informar resultados el mismo día y analizar muestras urgentes. Asimismo, es posible la generación de protocolos secuenciales desde el software del mismo analizador.

Mayor practicabilidad

Los analizadores automáticos requieren un fácil entrenamiento del personal, una mínima manipulación de la muestra y un mantenimiento sencillo, y además poseen características comunes en muchos fabricantes.

Menor coste económico

La reducción en el personal necesario con respecto a las técnicas manuales, el almacenamiento de la curva de calibración en la memoria del analizador, el procesado simple de las muestras y, por último, razones inherentes a la economía de mercado han tenido como consecuencia una disminución en los costes respecto a los métodos manuales.

Limitaciones de los inmunoanálisis automatizados

Los inmunoanálisis automatizados poseen las mismas limitaciones que los inmunoanálisis en general: efecto matriz, problemas relacionados con la especificidad de los anticuerpos, estandarización, interferencias relacionadas con el trazador, efecto hook,.... Adicionalmente, cabe señalar (Mauri y cols, 2005):

- Problemas derivados del diseño y las características del analizador, como cantidad mínima de muestra y/o volumen “muerto” necesarios.
- Interferencias propias del sistema de medida, como anticoagulantes, fármacos o metabolitos, iones u otras sustancias que pueden actuar como catalizadores o cofactores enzimáticos.
- Los autoanalizadores son sistemas cerrados en los que no es posible introducir modificaciones. Es obligado usar reactivos exclusivos del fabricante. A menudo, se desconocen las características últimas del sistema y de los reactivos.
- Poseen paneles limitados, con calidad desigual en las diferentes pruebas.

A continuación se muestran los tres métodos de determinación de vitamina B12 y folato séricos implantados en los laboratorios de Osakidetza de Bizkaia, con los valores de normalidad aportados por cada fabricante:



Valores teóricos de normalidad
IC95%:

- Vitamina B12: 180-914 pg/mL
- Folato: > 5.21 ng/mL

UniCel® DxI 800 Access® Immunoassay System (Beckman Coulter)



Valores teóricos de normalidad
IC95%:

- Vitamina B12: 191-663 pg/mL
- Folato: 4.6-18.7 ng/mL

Cobas® e411 (Roche Diagnostics®)



Valores teóricos de normalidad
IC95%:

- Vitamina B12: 211-911 pg/mL
- Folato: > 5.38 ng/mL

Advia Centaur® (Siemens Healthcare Diagnostics)

El inmunoanálisis es una de las técnicas más utilizadas en el laboratorio asistencial. El conocimiento de las características y limitaciones de los métodos utilizados es por tanto fundamental para interpretar resultados discordantes.

1.5. Justificación

Debido a las características del estilo de vida del siglo XXI, los suplementos alimenticios y el tema del aporte insuficiente de vitaminas están a la orden del día (Rizzo y cols, 2016; McNulty y Scott, 2008). El déficit de vitamina B12 es un problema de salud pública relativamente común (Stabler y Allen, 2004), siendo en su mayoría déficits subclínicos sin sintomatología clínica aparente. Así mismo, en los últimos años, el déficit de vitamina D se ha asociado con diferentes patologías.

El estatus vitamínico de estos pacientes se controla mediante medición de los niveles de vitamina B12 y folato, así como de vitamina D, con el objetivo de detectar niveles subóptimos y evitar complicaciones mayores. La falta de verdaderos rangos de referencia está provocando un falso aumento de déficits en la población de riesgo.

Como principal consecuencia han aumentado las determinaciones realizadas tanto para la vitamina D, como para la vitamina B12 y folato séricos en los Laboratorios Clínicos.

Para tratar de abarcar el mercado existente, recientemente se han lanzado nuevos equipos con distinta tecnología. El inmunoensayo es una técnica rutinaria en los laboratorios de análisis clínicos. El cambio metodológico constante al que están sometidos hoy día los laboratorios clínicos es una realidad y es competencia del personal actualizarse y trabajar para poder decidir cuál es la tecnología que mejor se adapta a sus necesidades.

Además de conocer las características y limitaciones de los métodos utilizados, los valores de referencia o valores límite asociados deben estar periódicamente revisados y ajustados a la población que abarca. En esta línea, no se está trabajando lo suficiente, dado que la mayoría se conforma con los valores aportados por los distintos fabricantes, sin importar la transferibilidad de resultados y el aumento de falsos positivos o negativos. De hecho, aunque las asociaciones recomiendan que cada laboratorio debe producir sus propios valores de referencia, muy pocos laboratorios siguen dicha recomendación. Aunque parece obvio, para dar solución a este entramado, los laboratorios y la industria deben colaborar

conjuntamente en la misma dirección. Queda claro que detrás de un simple valor que sale con un asterisco o marcado en negrita cuando está alterado, hay muchísimo más.

El equipo del Laboratorio del HGU, tiene amplia experiencia en la evaluación de nuevos equipos y técnicas, habiendo participado en estudios internacionales de comercialización de nuevos analizadores y reactivos, así como participado en varios proyectos multicéntricos de establecimiento de valores de referencia para diferentes parámetros de diagnóstico biológico.

El trabajo complementario sobre la vitamina D, nos ha ayudado mucho en el desarrollo sobre la problemática observada con el tema principal, la vitamina B12. Con este estudio pretendemos además mejorar el uso racional del gasto sanitario. Se podrá establecer el método con mejor rendimiento diagnóstico, lo que podrá valorarse en futuros concursos de obtención de material para estas determinaciones, realizándose las compras con un criterio objetivamente definido. Además, al realizar el estudio con todos los métodos actualmente en uso en los centros de la red sanitaria vasca, sus conclusiones podrán aplicarse en toda la población atendida por Osakidetza.

2. Hipótesis

2. Hipótesis:

1. Los diferentes inmunoensayos disponibles en el mercado para la determinación analítica de la vitamina D presentan diferente grado de exactitud frente al estándar oro, influyendo en la definición de hipovitaminosis.
2. Los valores de referencia de vitamina B12 séricos no están bien valorados para la población de la comarca interior de Bizkaia. Esto ocasiona que se estén sobrediagnosticando déficits provocando un aumento no justificado de la utilización de los servicios sanitarios.
3. Los valores de referencia de folato séricos no están bien valorados para la población de la comarca interior. Se están sobrediagnosticando déficits provocando un aumento no justificado de la utilización de los servicios sanitarios.
4. Los diferentes métodos presentes en el mercado y empleados en los distintos centros de Osakidetza presentan rangos de referencia no transferibles para vitamina B12 y folato, sobre todo en el punto de corte inferior. ¿Tienen la misma capacidad discriminatoria?
5. La variabilidad biológica explica la diferencia analítica observada en la comparación del resultado del paciente con el valor previo para los 3 parámetros analizados.
6. Los nuevos valores de referencia que obtengamos tras el estudio permitirán clasificar adecuadamente a nuestra población de riesgo, incluyendo tercera edad y pacientes con patología hematológica relacionada.
7. Con el establecimiento de los nuevos valores de referencia de vitamina B12 disminuirá la utilización de pruebas diagnósticas complementarias asociadas al estudio de un posible déficit de esta vitamina.

3. Objetivos

3. Objetivos:

1. Evaluar la exactitud de los diferentes inmunoensayos disponibles frente al estándar oro para la determinación analítica de la vitamina D, así como establecer el punto de corte que define la hipovitaminosis.
2. Establecer valores de referencia adecuados de vitamina B12 séricos para población sana de la comarca interior de Bizkaia, basados en parámetros biológicos más complejos y confirmados tras estudio clínico por el hematólogo, que actuará como estándar oro.
3. Establecer valores de referencia adecuados de folato séricos para población sana de la comarca interior de Bizkaia, basados en parámetros biológicos más complejos y confirmados tras estudio clínico por el hematólogo, que actuará como estándar oro.
4. Comparar la capacidad discriminadora de los tres métodos de determinación de vitamina B12 y folato séricos implantados en los laboratorios de Osakidetza: Elecsys (Roche), Advia Centaur (Siemens) y Access Dxi (Beckmann).
5. Estudiar la variabilidad biológica intra e interindividual de vitamina B12, folato y vitamina D séricas, así como calcular el valor real del cambio.
6. Validar los nuevos valores de referencia en nuestra población de riesgo, incluyendo tercera edad y pacientes con patología hematológica relacionada.
7. Valorar el efecto del establecimiento de los nuevos valores de referencia de vitamina B12 sobre la evolución de la utilización de las pruebas diagnósticas asociadas al estudio de un posible déficit de esta vitamina, con las que se pretende mejorar la gestión de la demanda.

4. Resultados

4.1. Artículo 1

“Lack of transferability between different immunoassays and LC-MS/MS for total 25-Hydroxyvitamin D measurement and disagreement defining deficiency”

I.Ajuria-Morentin, C. Mar-Medina, E. Bereciartua-Urbieta, F. Izquierdo-Quirce, C. Valladares-Gómez, E. Crespo-Picot, T. Jaume. *Scand J Clin Lab Invest* 2013; 73: 82-6.

Parte de los resultados de este capítulo fueron presentados en el V Congreso Nacional del Laboratorio Clínico; Málaga, 9-11 noviembre 2011 (póster premiado y comunicación oral).

RESUMEN

Introducción. El déficit de vitamina D ha estado, desde hace años, relacionado con problemas en el metabolismo mineral. Sin embargo, en la actualidad, se conoce además su relación con otras enfermedades (cánceres, enfermedades autoinmunes, etc...). La concentración de 25(OH)D circulante, ha sido aceptada como el mejor indicador del status vitamínico de un individuo, habiéndose desarrollado para su determinación distintos métodos inmunoquímicos.

Material y Métodos. Debido a la escasa estandarización nuestro objetivo fue evaluar y comparar dichos métodos frente al método de referencia, analizando además, su grado de acuerdo en relación con el diagnóstico de hipovitaminosis. Para ello, se seleccionaron de la rutina habitual 180 muestras. Fueron procesadas en los siguientes analizadores: Liaison ® (Diasorin), Cobas ® e411 (Roche Diagnostics), Architect (Abbott), Advia Centaur ® (Siemens Healthcare Diagnostics), IDS-iSYS (Vitro S.A.) y el método de referencia LC-MS/MS. Para detectar el estado subóptimo de 25(OH) D, se seleccionó un punto de corte de 20 ng/mL (50 nmol/L) para evaluar el grado de acuerdo (índice Kappa) entre métodos.

Resultados. Se consideró que un índice Kappa por encima de 0,8 indicaba un excelente grado de acuerdo. Con un valor de corte de 50 nmol/L Architect y Cobas fueron los únicos métodos capaces de identificar a los pacientes con deficiencias en concordancia con los hallazgos del método de referencia LC-MS/MS. Por otro lado, con un valor de corte de 37,5 nmol/L para Liaison y de 75 nmol/L para el IDS-iSYS, manteniendo el valor de 50 nmol/L para el método LC-MS / MS, se obtuvieron valores kappa de 0,80 y 0,83 respectivamente.

Conclusiones. Los diferentes métodos utilizados no son transferibles entre sí y, por tanto tampoco lo deberían ser sus puntos de corte, por lo que 50 nmol/L no puede considerarse punto de corte general para definir hipovitaminosis. Los límites de referencia para considerar que un paciente tiene un nivel insuficiente de vitamina D deberían establecerse en función del método utilizado por cada laboratorio.

Palabras clave: déficit, inmunoensayo, métodos, suero, valores de referencia, vitamina D

ABSTRACT

Background. Over the last few years, it has become much more common to measure concentrations of vitamin D, as its deficiency has been associated with an increasing number of health problems. Recently, a number of new immunoassays for measurement of total 25-hydroxyvitamin D (25OH-D) concentration have been released but their results may not be transferable.

Methods. Our main objective was to compare results from the Cobas ® e411 (Roche Diagnostics), Advia Centaur ® (Siemens), Architect (Abbott), IDS-iSYS (Vitro S.A.), and Liaison ® (Diasorin) immunoassay systems with each other and with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). We obtained 184 routine serum samples, covering the whole measuring range, for these methods.

Results. Kappa values above 0.8 were considered to indicate excellent agreement. With a cut-off of 50 nmol/L Architect and Cobas were the only immunoassay methods able to identify patients with deficiencies consistent with the findings of the reference method LC-MS/MS. On the other hand, using a cut-off of 37.5 nmol/L for Liaison and 75 nmol/L for IDS-iSYS, while maintaining the value of 50 nmol/L for the LC-MS/MS method, kappa values of 0.80 and 0.83 respectively were obtained.

Conclusions. Choosing the best method for each laboratory is challenging due to methodological differences between them and 50 nmol/L cannot be considered as a general cut-off for defining hypovitaminosis.

Key Words: Deficiency, immunoassay, methods, reference levels, serum, vitamin D

4.1.1. Introduction

Vitamin D is a group of fat-soluble seco-steroids, the most physiologically important forms being vitamins D2 (ergocalciferol) and D3 (cholecalciferol).

Due to low dietary intake and characteristics of our 21st century lifestyle that tend to limit exposure to sunlight, suboptimal vitamin D status is very common [1,2].

Consequently, there has been a rapid growth in laboratory testing of serum vitamin D concentrations in recent years [3]. Measurement of circulating 25-hydroxyvitamin D (25OH-D) concentration is accepted as the best clinical indicator of vitamin D status [4, 5]. On the other hand, substantial variability between results with different laboratory methods drives the need for improvements in 25OH-D testing [6].

What is widely regarded as the 'gold standard' reference method for 25OH-D measurement, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), is not a very practical method for routine assays because it is cumbersome and time consuming [7-9]. Immunoassay methods are much more suitable as they can be automated, they do not require highly trained staff, and the turnaround time is shorter [10]. They do, however, have certain disadvantages, for instance, they are not able to distinguish between

D2 and D3 and there is a lack of international standardization [11].

As a number of new immunoassays have recently been released, we decided to assess their accuracy in order to adopt the most reliable method in our laboratory. Our main objective was to compare the Cobas ® e411 (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany, www.roche.com), Advia Centaur ® (Siemens Healthcare Diagnostics, Munich, Germany, www.medical.siemens.com), Architect (Abbott Diagnostics, Wiesbaden, Germany, www.abbottdiagnostics.com), IDS-iSYS (Vitro, Sevilla, Spain, www.vitroweb.com) and Liaison ® (Diasorin, Saluggia, Italy, www.diasorin.com) immunoassay systems, with each other and with the reference method LC-MS/MS.

4.1.2. Methods

Routine serum samples from 182 patients were obtained within a period of 30 days, covering the whole measuring interval (10 – 227.5 nmol/L), for method comparison.

When the concentration of 25OH-D was higher than the upper limit of linearity range, samples were diluted with solvents given by the manufacturers. Precision with the Cobas ® e411, Advia Centaur ®, Architect and Liaison ® systems was assessed following the CLSI (formerly NCCLS) EP05-A2 guidelines.

The study was approved by the Ethics committee of clinical investigation of the hospital (CEIC-G). All measurements were performed once in each automated analyzer. Liaison, Cobas, Centaur and Architect systems were tested the day of sample collection and two more aliquots were frozen and stored at - 20 °C until they were sent for external analysis with an IDS-iSYS analyzer and by LC-MS/MS [12].

Measuring ranges and coefficients of variation (CV%) of compared immunoassays were respectively: Liaison: 10 – 375 nmol/L (8.8 – 13.9 %); Cobas: 7.5 – 175 nmol/L (2.1 – 10 %); Centaur: 9.25 – 375 nmol/L (6.74 – 8.12 %); Architect: 20 – 400 nmol/L (1.95 – 4.15 %); IDS-iSYS: 12.5 – 350 nmol/L (5.14 – 18 %).

For the LC-MS/MS method, samples were analyzed on a 1290 Infinity UPLC system connected to a 6430 Triple Quad LC/MS (both from Agilent Technologies) operating in positive atmospheric pressure chemical ionization mode (APCI) and multiple reaction monitoring (MRM) detection mode. An Agilent quaternary 1200 series pump was used to allow online sample purification. Trap column, chromatographic analytical column and reagents were purchased from Chromsystems GmbH as a kit branded MassChrom ® D3/D2. Tests were performed as recommended by the manufacturer. Values for 3PLUS1 ® calibrators are settled using NIST 972 reference material. Limit of quantification (LOQ) was 9.0 nmol/L for 25OH D3 and 5.8 nmol/L for 25OH-D2, intraassay CV was _ 4% and interassay

CV was _ 5% for 25OH-D3 and _ 5% and _ 6% for 25OH-D2 at two concentrations [69.1 nmol/L and 144.8 nmol/L for 25OH-D3 and 71.7 nmol/L and 147.1 nmol/L for 25OH-D2].

Statistical analysis

First of all, outliers were identified using the Cook distance method with a cut-off point of 1.25 nmol/L.

Pairwise linear regression models among the studied methods were developed by means of Passing-Bablok method. Correlation coefficients, beta values and 95% confidence intervals (CI 95%) of slopes and intercepts obtained from regression models were estimated.

Finally, Kappa coefficients were calculated to assess the level of agreement among different methods to identify clinically relevant hypovitaminosis (50 nmol/L) [13,14]. Values higher than 0.6 are considered to indicate acceptable agreement and values of more than 0.8 excellent agreement. A sensitivity analysis was considered for those methods with no acceptable kappa values in order to improve the agreement with the reference method.

All statistical analyses were performed using the SPSS Statistics vs. 19 statistical package.

4.1.3. Results

The results are summarized in **Table I**. Five outliers were identified and corresponded to four patients with chronic renal failure and one with rheumatoid arthritis. All of them were being treated with vitamin D or analogues thereof at the time of sample collection.

The different immunoassays studied are based on quite similar methodologies, except the Cobas system which uses labelled vitamin D-binding protein instead of an antibody against vitamin D.

As can be seen in the table, using the cut-off of 50 nmol/L the Architect and Cobas systems were the only immunoassay methods which had kappa values higher than 0.8 according to the reference method LC-MS/MS.

Considering differences between all the immunoassay methods, and taking into account that they do not measure exactly the same concentration of the analyte, we considered different cut-offs and their respective kappa values for Liaison and IDS-iSYS. Using a cut-off of 37.5 nmol/L for Liaison and 75 nmol/L for IDS-iSYS, while maintaining the value of 50 nmol/L for the LC-MS/MS method, we obtained kappa values of 0.80 and 0.83 respectively.

Table I. Passing-Bablok regression results for 178 samples. Results listed in each cell correspond (from top to bottom) to the correlation coefficient, slope (95% CI), intercept (95% CI) and kappa index for comparisons between all systems.

Reference method	Under study					
	LC MS/MS	Architect	Centaur	Cobas	Liaison	IDS-iSYS
LC-MS/MS						
r		0.900	0.874	0.847	0.839	0.917
slope		0.888 (0.820-0.948)	0.673 (0.614-0.740)	1.159 (1.070-1.260)	0.779 (0.714-0.857)	1.138 (1.057-1.215)
intercept		3.35 (2.20-4.40)	5.028 (3.855-6.024)	-1.525 (-2.926 to -0.097)	0.1 (-1.2-1.1)	4.85 (3.45-6.46)
kappa		0.861	0.724	0.827	0.633	0.548
Architect						
r	0.900		0.849	0.887	0.903	0.948
slope	1.127 (1.055-1.220)		0.787 (0.718-0.861)	1.323 (1.233-1.421)	0.938 (0.875-1.000)	1.331 (1.261-1.403)
intercept	-3.8 (-5.4 to -2.3)		2.388 (1.124-3.603)	-5.712 (-7.470 to -4.104)	-3.3 (-4.4 to -2.2)	0.97 (-0.51-2.21)
kappa	0.861		0.724	0.848	0.626	0.605
Centaur						
r	0.874	0.849 1.271 (1.161-1.393)		0.805	0.817	0.857
slope	1.487 (1.351-1630)	-3.04 (-5.02 to -1.31)		1.708 (1.548-1.889)	1.139 (1.042-1.269)	1.688 (1.543-1.856)
intercept	-75 (-9.8 to -5.2)	0.724		-10.026 (-13.379 to -7.446)	-5.5 (-7.5 to 3.8)	-3.60 (-6.44 to -0.88)
kappa	0.724			0.693	0.651	0.477
Cobas						
r	0.847	0.887	0.805		0.799	0.856
slope	0.863 (0.793-0.935)	0.756 (0.704-0.818)	0.586 (0.529-0.646)		0.682 (0.623-0.755)	1.022 (0.947-1.105)
intercept	1.3 (0.1-2.3)	432 (3.36-5.26)	0.871 (4.811-7.083)		0.8 (-0.3-2.1)	6.37 (4.62-7.55)
kappa	0.827	0.848	0.693		0.569	0.582
Liaison						
r	0.839	0.903	0.817	0.799		0.833
slope	1.286 (1.167-1400)	1.067 (1.000-1.143)	0.878 (0.788-0.960)	1.465 (1.324-1.604)		1.427 (1.327-1.540)
intercept	-0.1 (-1.5-1.4)	3.57 (2 54-440)	4.842 (3.695-5.941)	-1.178 (-3.297-0.428)		5.68 (3.92-6.78)
kappa	0.633	0.626	0.651	0.569		0.324
IDS-iSYS						
r	0.917	0.948	0.857	0.856	0.883	
slope	0.879 (0.823-0.946)	0.751 (0.713-0.793)	0.592 (0.339-0.648)	0.979 (0.905-1.056)	0.701 (0.649-0.753)	
intercept	4.3 (-6.1 to -2.8)	-0.73 (-1.76-0.36)	2.133 (0.571-3.469)	-6.230 (-7.970 to -4.180)	-4.0 (-5.1 to -2.5)	
kappa	0.548	0.605	0.477	0.582	0.324	

4.1.4. Discussion

As some of the reagents studied have been developed recently, there is little published data on them so far. During the past year some results have been reported comparing the different methods. As can be expected, intra- and inter-laboratory studies have found good correlations between results but also significant differences. Moreover, as has been previously noted, inter-laboratory variation within the same method groups makes it extremely difficult to apply standardized reference intervals or published clinical cut-off values and, accordingly, it is necessary for laboratories to develop site-specific reference intervals [15,16]. The

international Vitamin D Quality Assessment Scheme (DEQAS) for external quality assessment confirms that differences exist, as can be observed in method means and coefficients of variation.

Great differences among immunoassay methods have recently been published related to their different capacity to separate 25OH-D from vitamin D binding protein (DBP) and their ability to measure it [17,18]. In fact, this aspect could be partially the cause of the observed lack of transferability. Heijboer and colleagues have stated that the regression analysis revealed significant differences in results between various patient groups with different levels of DBP, whereas DBP concentrations in hemodialysis patients did not show a significant difference from the healthy individuals [17]. However, they concluded that not all assays are suitable for measuring 25(OH)-D in all patient groups.

In our sample set, to study whether there were differences due to the type of pathology, results were split into two groups: outpatients, including those with mild pathology or health check, and those with kidney disease.

Considering that not taking into account the concentration of DBP can be an important limitation in our study, in a further analysis of patients referred from the nephrology service (n=107) compared to a no-renal subgroup, no significant differences in terms of correlation were found (data not shown).

If the medical community is to make progress in detecting and addressing widespread hypovitaminosis D, the measurement of 25OH-D concentration needs to be standardized [6,19]. The lack of a recognized serum-based reference material has been the main barrier to improve the comparability of immunoassays. Wallace et al. [11] proposed that only the SRM 972 Level 1 pool should be used for standardization purposes in immunoassays. Most of the immunoassays we have compared, except Liaison, are referenced to this material, showing that standardization against the same reference material may not be sufficient for comparability.

Therefore, choosing the most suitable method for each laboratory is challenging. Our findings underline that 50 nmol/L should not, in general, be considered as the cut-off for hypovitaminosis.

4.1.5. References

- [1] Bischoff-Ferrari HF. "Vitamin D – why does it matter?" – Defining vitamin D deficiency and its prevalence. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2012; 243: 3-6.
- [2] Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med 2007; 357: 266-81.
- [3] Singh RJ. Are clinical laboratories prepared for accurate testing of 25-hydroxy vitamin D? Clin Chem 2008; 54: 221-3.
- [4] Binkley N, Krueger DC , Morgan S , Wiebe D. Current status of clinical 25-hydroxyvitamin D measurement: an assessment of between-laboratory agreement. Clin Chim Acta 2010; 411: 1976-82.
- [5] Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D and fluoride. National Academy Press, Washington DC, 1997.
- [6] Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, DeLuca HF, Drezner MK. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89: 3152-7.
- [7] El-Khoury JM, Reineks EZ, Wang S. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues. Clin Biochem 2011; 44: 66-76.
- [8] Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytfanghe K, Thienpont LM. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography – tandem mass spectrometry. Clin Chem 2011; 57: 441-8.
- [9] Kobold U. Approaches to measurement of Vitamin D concentrations – Mass spectrometry. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2012; 243: 54-9.
- [10] Ofenloch-Haehnle B. Approaches to measurement of Vitamin D concentrations – Immunoassays. Scand J Clin Lab Invest Suppl 2012; 243: 50-3.

- [11] Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids* 2010; 75: 477-88.
- [12] Wielders JP, Wijnberg FA. Preanalytical stability of 25(OH) - Vitamin D3 in human blood or serum at room temperature: solid as a rock. *Clin Chem* 2009; 55: 1584-5.
- [13] Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008; 122: 398-417.
- [14] Holick MF, Gordon CM. The Hormone Foundation's patient guide to vitamin D deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 1-2.
- [15] Yates AM, Bowron A, Calton L, Heynes J, Field H, Rainbow S, Keevil B. Interlaboratory variation in 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 is significantly improved if common calibration material is used. *Clin Chem* 2008; 54: 2082-4.
- [16] Moon HW, Cho JH, Hur M, Song J, Oh GY, Park CM, Yun YM, Kim JQ. Comparison of four current 25-hydroxyvitamin D assays. *Clin Biochem* 2012; 45: 326-30.
- [17] Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem* 2012; 58: 543-8.
- [18] Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography- tandem mass spectrometry methods . *Clin Chem* 2012; 58: 531-42.
- [19] Thienpont LM, Stepman HCM, Vesper HW. Standardization of measurements of 25-hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 2012; 243: 41-9.

4.2. Artículo 2

“Determination of Reference Values for Serum Folate and Vitamin B12 Using Three Different Immunoassays: Is it Worth Making an Effort to produce them in Our Laboratory?”

I. Ajuria-Morentin, C. Mar-Medina, E. Bereciartua-Urbieta, U. Aguirre-Larracoechea, J.M. Quintana-López, M.B. Ruiz-Larrea. *Clin Lab* 2014; 60:1135-1143.

RESUMEN

Introducción. A pesar de ser un concepto ampliamente estudiado, el intervalo de referencia es una herramienta fundamental en la práctica habitual para la correcta interpretación clínica. Como tal, es de vital importancia que estos límites estén correctamente establecidos y periódicamente revisados por el laboratorio clínico.

Material y Métodos. El tamaño muestral final de la población de referencia fue de 315 individuos sanos seleccionados *a priori* de la provincia de Bizkaia. Se enviaron muestras de sangre y suero al laboratorio para la determinación de vitamina B12 y folato utilizando tres métodos inmunoquímicos. Los valores de referencia se calcularon utilizando métodos no paramétricos.

Resultados. Los valores de referencia obtenidos para vitamina B12 y folato séricos fueron inferiores a los que estaban siendo utilizados, especialmente en el caso del límite inferior. El uso de los nuevos valores de referencia aumentó el índice kappa a pesar del bajo acuerdo existente en el caso de la vitamina B12 (0,4 - 0,62). Sin embargo, la precisión obtenida para la vitamina B12 (94,48 - 96,55%) y folato (95,77 - 97,18%) fue muy elevada. El coeficiente de correlación intraclase varió de 0.723 a 0.894. Además, los coeficientes de correlación del análisis de regresión Passing-Bablok fueron aceptables: de 0.75-0.94 para la vitamina B12 y 0.92-0.95 para el folato.

Conclusiones. Se estaban sobrediagnosticando déficits de vitamina B12 y folato, aumentando así el número de consultas innecesarias. La principal conclusión obtenida ha dado lugar a un cambio en los valores de referencia de nuestro laboratorio, con un aumento posterior de la capacidad para detectar con mayor precisión los posibles déficits. Además, dado que este estudio abarca todos los métodos actualmente en uso en la red sanitaria vasca, sus conclusiones pueden extrapolarse a toda la población atendida por Osakidetza, mejorando así el uso racional del gasto sanitario.

Palabras clave: folato, inmunoensayo, suero, valores de referencia, vitamina B12

SUMMARY

Background. Despite being a widely studied concept, the reference interval is the most widely used medical decision-making tool. As such, it is vital that these limits are correctly established and regularly reviewed in the clinical laboratory.

Methods. The reference population comprised 315 healthy individuals selected *a priori* from Bizkaia province. Blood and serum samples were sent for subsequent assay of vitamin B12 and folate using three immunochemical methods. Reference values were calculated using non-parametric methods.

Results. The new values obtained for serum vitamin B12 and folate were lower than the currently used values in all cases, especially the lower limit. Use of new reference values led to an increase in the kappa value despite the low agreement in the case of vitamin B12 (0.4 - 0.62). However, precision obtained for vitamin B12 (94.48 - 96.55%) and folate (95.77 - 97.18%) was very high. The intraclass correlation coefficient ranged from 0.723 to 0.894. Furthermore, a Passing-Bablok regression analysis gave acceptable correlation coefficients of 0.75 - 0.94 for vitamin B12 and 0.92 - 0.95 for folate.

Conclusions. Vitamin B12 and folate deficiencies are currently being over-diagnosed leading to an increase in the number of unnecessary consultations. The main conclusion that can be drawn from our study has resulted in a change in reference values in our laboratory, with a subsequent increase in our ability to accurately detect possible deficiencies. Furthermore, as this study involved all methods currently in use in the Basque healthcare network, its conclusions can be extrapolated to the whole population covered by Osakidetza, thereby improving the rational use of healthcare funding.

Keywords: folate, immunoassay, reference levels, serum, vitamin B12

4.2.1. Introduction

The answer to the proposed question of the title is “absolutely yes”. However, although this has been known and widely studied over many years, its application in most clinical laboratories is still incomplete today for several reasons. Furthermore, despite the fact that “the reference interval is the most widely used medical decision-making tool”, its practical utility is lower than it’s theoretical power [1].

Indeed, although the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) has recommended for many years that each laboratory must produce its own reference values [2-7], only a few laboratories follow this recommendation, mainly due to the fact that they often cannot meet the cost of generating reference values for all parameters. They can, however, review them as required by the International Organization for Standardization (ISO) standard 15189:2007: “Biological reference intervals shall be periodically reviewed. If the laboratory has reason to believe that a particular interval is no longer appropriate for the reference population, then an investigation shall be undertaken, followed, if necessary, by corrective action” [8].

Variability in laboratory measurement procedures has proved a major challenge in assessing nutritional folate and vitamin B12 status.

As both folate and vitamin B12 are involved in a large number of biochemical processes, it is vital to develop sensitive methods with accurate cut-off points, as well as appropriate reference values for the target population, in order to detect deficiencies in them at an early stage. Establishment of the appropriate limits is of particular importance when it comes to classifying patients as the population with a sub-clinical deficiency is asymptomatic. Furthermore, the lack of a gold standard complicates the diagnosis and subsequent decision-making, especially when, as in the case of a sub-clinical deficiency, diagnosis depends entirely on biomarkers [9]. The sensitivity and specificity problems associated with the vast majority of assays used to detect a vitamin B12 deficiency (cobalamine, methylmalonic acid, holotranscobalamine II, homocysteine, etc.) mean that at least two markers (one plasma-based and one functional) must be included in order to classify individuals correctly [10-12]. Despite being a late-stage and non-specific marker, the

determination of total vitamin B12 is commonly used to screen the risk population (the elderly, vegetarians, pregnant women, and patients with renal and intestinal disease) [13-15].

Although these are simple molecules, their characteristics (protein binding, multiple forms, low plasma concentration) mean that standardisation is incredibly difficult, with competitive immunoassays currently predominating in clinical laboratories [16]. Various techniques for assaying serum vitamin B12 and folate offered by various private laboratories are available on the market. However, the fact that each uses different cut-off points means that the results provided by them are not transferable.

Due to the growing requirement for accurate and specific diagnostic tests and their traceability to reference methods, it seems obvious that the problem of biological reference values should be shared by both clinical laboratories and the in vitro diagnostics industry. Our main objective was to establish appropriate serum vitamin B12 and folate reference values for the healthy population from the inner district of Bizkaia province. Furthermore, we aimed to compare the discriminatory capacity of the three methods for determining serum vitamin B12 and folate used in the Osakidetza laboratories in Bizkaia, namely Cobas® e411 (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany, www.roche.com), Advia Centaur® (Siemens Healthcare Diagnostics, Munich, Germany, www.medical.siemens.com) and Uni-Cel® DxI 800 Access® Immunoassay System (Beckman Coulter, Brea, California, USA, www.beckmancoulter.com).

4.2.2. Materials and methods

The production of health-related reference values and the subsequent estimation of reference intervals must be carried out in accordance with a well-defined protocol. Our study was based on document CLSI C28-A3c [17,18].

Reference population

In collaboration with the primary care services of the inner district of Bizkaia (300,000 inhabitants and 17 primary care units), a total of 415 apparently healthy subjects were recruited over the past three years in order to attempt to establish appropriate reference values for this population. To this end, we used direct sampling techniques in which reference individuals were selected from a reference population using specific, well-defined criteria that were applied prior to sample collection and analysis (*a priori*).

Subjects' health status was checked by way of a brief physical examination, laboratory tests (standard clinical chemistry profile, including vitamin B12 and folate, blood count, erythrocyte sedimentation rate (ESR), iron, kidney and liver profile, and C-reactive protein (CRP) and by a brief questionnaire-based medical interview.

Inclusion criteria

Healthy individuals older than 18 years of age who attended their primary care centre and were willing to participate in this study, signed an informed consent form.

Exclusion criteria

Persons unwilling or without the mental capacity required to sign the informed consent form. Patients presenting a concomitant disease such as liver disease, advanced renal failure, neurological symptoms, etc. Patients taking vitamin supplements and/or drugs that may interfere with vitamin B12 and folate levels (colchicine, ranitidine, proton pump inhibitors, etc.).

After analysing the medical records, those subjects who presented analytical alterations that could indicate disease (for example altered profiles, low hemoglobin, high mean corpuscular volume, vitamin B12 or folate out-of-range, hyper- or hypoglycaemia, high creatinine levels, etc.) were excluded from the analysis. The normal ranges used for the various parameters studied in our laboratory were as follows: glucose 76 - 110 mg/dL; urea 10 - 50 mg/dL; creatinine 0.5 - 1.1 mg/dL in women and 0.6 - 1.3 mg/dL in men; transaminases > 40 U/L; gamma-GT 7 - 32 U/L;

total bilirubin 0.1 - 1 mg/dL; total proteins 6 - 8.3 g/dL; PCR 0 - 5 mg/dL; VSG 2 - 35 mm/hour; iron 37 - 145 mcg/dL; ferritin 20 - 200; leukocytes 4000 - 11,000/mm³; red blood cells 3.8 - 5.4 x 10⁶/mm³; hemoglobin 12 - 17 g/dL in women and 13 - 18 mg/dL in men; VCM 80 - 98 fL; vitamin B12 180 - 914 pg/mL; folate 2.5 - 20 ng/mL.

After the first serum vitamin B12 and folate analysis, the lower 25th percentile of the previously studied healthy population (n = 47 subjects) attended the Clinical Analysis Service at the Galdakao-Usansolo Hospital (HGU) to provide a new blood sample for vitamin B12, folate, and homocysteine analysis and a blood count. As before, all subjects with values outside these ranges or with homocysteine > 15.0 µmol/L were excluded from the study.

The final sample size was 315 healthy subjects.

Specimen collection and handling

After being informed of their selection by their primary care physician, and having signed the informed consent form, whole blood (BD Vacutainer® K2E) and serum (BD Vacutainer® SST II) samples were extracted, appropriately labelled and sent, together with the consent form, to the HGU laboratory.

The specific biochemistry panel was performed within six hours post-extraction in all cases. Aliquots of serum were frozen at -80°C for subsequent vitamin B12 and folate analysis using the three methods described above.

All patient data were included in the laboratory programme.

Methods, reagents and instruments

Vitamin B12 and folate were determined in our laboratory using a chemiluminescence-based method with the Advia Centaur® analyser (method used at Cruces Hospital) and by enzyme-based immunoanalysis using a Cobas® e411 (method used at Basurto Hospital) and a UniCel® Dxl 800 Access® (method used at the HGU) analyser.

The reagents used were Access Vitamin B12 (theoretical normality values 95% CI: 180 - 914 pg/mL) and Access Folate (> 5.21 ng/mL) for the UniCel® Dxl 800 Access® analyser, vitamin B12 (191 - 663 pg/mL) and folate III (4.6 - 18.7 ng/mL)

for the Cobas® e411 analyser and VB12 (211 - 911 pg/mL) and FOL (> 5.38 ng/mL) for the ADVIA Centaur® analyser.

The reference values established by each hospital were similar to the theoretical values established by the respective manufacturers (HGU: vitamin B12 180 - 914 pg/mL (133 - 675 pmol/L), folate 2.5 - 25.6 ng/mL (5.7 - 58.0 nmol/L); Basurto Hospital: vitamin B12 191 - 663 pg/mL, folate 3.1 - 17.5 ng/mL; Cruces Hospital: vitamin B12 220 - 980 pg/mL, folate 3.4 - 20 ng/mL). All measurements were performed on the same day once with each automated analyser for method comparison. Precision was assessed following the CLSI (formerly NCCLS) EP05-A2 guidelines [19].

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee at our hospital (CEIC-G).

Calculation

Dixon's test [20] was initially applied to the pooled vitamin B12 and folate data collected by each instrument.

Once outliers had been detected and rejected, an exploratory data analysis of the sample studied (mean and standard deviations, and median and interquartile ranges for values of vitamin B12 and folate values measured by each instrument assessed, and frequencies and percentages for categorical variables) was performed. The non-parametric Wilcoxon test for independent samples was used to evaluate the relationship between the sociodemographic variables and vitamin B12 and folate values. This was done for each instrument.

Agreement between instruments was tested by means of the intraclass correlation coefficient (ICC) for quantitative readings and the kappa coefficient, with 95% confidence intervals (CI), for the overall sample on the basis of the old reference values established by the manufacturers and the hospital. A kappa coefficient greater than 0.70 was considered to indicate good reproducibility [21].

A Passing-Bablok regression analysis (to give intercept and slopes), and Bland-Altman difference plots, which provide biases with 95% limits of agreement for each

analyte, were also conducted. In addition, accuracy was defined as the proportion of corrected values classified by each pair of methods compared.

Furthermore, new reference values were calculated for each instrument using non-parametric methods, computing the 2.5th and 97.5th percentile and their 90% CI. Pairwise agreement of the new established values was evaluated by means of the kappa coefficient. Accuracy was also calculated.

Finally, the reference change value (RCV) and individuality index (II) [22] values were calculated for vitamin B12 and folate.

All statistical analyses were performed using the SAS Systems statistical package (version 9.2). A p-value of less than 0.05 was deemed to indicate statistical significance.

4.2.3. Results

Descriptive data for the population studied using each analyser (mean, standard deviation (SD), median, 25th and 75th percentiles and statistical significance (p-value)) can be found in **Table 1**. After discarding the outliers, the study population was reduced to 290 subjects for vitamin B12 and 284 for folate.

No statistically significant differences in terms of age or gender were observed for vitamin B12. In contrast, although age and gender were not considered to be sources of variability for the variables studied [23], gender-based differences ($p < 0.05$) were observed for folate, with the values for males being slightly lower than those for females.

The inaccuracy was acceptable at all levels. Coefficients of variation (CVs) of 5.4 - 5.9% for folate and 6.2 - 8.6% for vitamin B12 were obtained with the UniCel® Dxl 800 Access®, with values of 4.3 - 8.9% and 7.2 - 7.7%, respectively, for the Cobas® e411 analyser and 5.2 - 8.3% and 4.8 - 7.9%, respectively, for the ADVIA Centaur® analyser.

Table 1. Descriptive analysis of the sample studied.

	INSTRUMENTS								
	UniCel® DxI 800 Access®		p-value	Advia Centaur®		p-value	Cobas® e411		p-value
	\bar{X} (SD)	Me (P ₂₅ -P ₇₅)		\bar{X} (SD)	Me (P ₂₅ -P ₇₅)		\bar{X} (SD)	Me (P ₂₅ -P ₇₅)	
Vitamin B12 (pg/mL) (n = 290)									
Gender			0.12			0.41			0.47
Male (n = 84)	302.21 (107.10)	284.50 (228.50 - 344.50)		342.85 (122.56)	335.50 (239.50 - 405.50)		390.21 (149.94)	369.65 (284.85 - 486.15)	
Female (n = 206)	330.88 (135.39)	310.50 (245.0 - 384.0)		364.15 (144.46)	333.50 (262.0 - 435.0)		408.52 (178.13)	394.55 (284.0 - 484.0)	
Age			0.72			0.88			0.94
≤ 65 (n = 235)	319.34 (120.22)	297.0 (245.0 - 379.0)		358.56 (140.88)	333.0 (252.0 - 435.0)		401.40 (162.04)	386.30 (284.0 - 479.5)	
> 65 (n = 55)	336.44 (158.91)	313.0 (235.0 - 397.0)		355.51 (129.62)	341.0 (270.0 - 420.0)		410.96 (203.76)	368.40 (272.20 - 498.70)	
Global	322.58 (128.32)	298.0 (236.0 - 380.0)		357.98 (138.60)	333.5 (257.0 - 434.0)		403.21 (170.39)	385.55 (284.0 - 484.0)	
Folate (ng/mL) (n = 284)									
Gender			0.002 [*]			0.02 [*]			0.001 [*]
Male (n = 84)	5.25 (1.97)	5.2 (3.65 - 6.55)		6.77 (2.34)	6.64 (5.22 - 8.19)		7.70 (2.25)	7.42 (6.01 - 9.28)	
Female (n = 200)	6.81 (3.72)	5.75 (4.15 - 8.50)		8.36 (4.58)	7.45 (5.27 - 10.69)		9.30 (3.74)	8.74 (6.46 - 11.73)	
Age			0.06			0.43			0.11
≤ 65 (n = 230)	6.19 (3.31)	5.4 (3.7 - 7.6)		7.81 (4.05)	6.70 (5.13 - 9.70)		8.68 (3.41)	8.02 (6.09 - 10.46)	
> 65 (n = 54)	6.99 (3.57)	6.0 (4.7 - 8.3)		8.23 (4.36)	7.01 (5.75 - 9.71)		9.43 (3.56)	8.89 (7.09 - 11.5)	
Global	6.35 (3.37)	5.5 (3.9 - 7.79)		7.89 (4.11)	6.99 (5.25 - 9.71)		8.83 (3.44)	8.1 (6.23 - 10.7)	

\bar{X} (SD): Values shown as mean (standard deviation); Me (P₂₅ - P₇₅): Values shown as median (25th percentile - 75th percentile).
p-value: p-values obtained from the non parametric Wilcoxon test for independent samples (* p < 0.05).

The results of the agreement between different instruments, on the basis of the manufacturer and hospital reference values, can be found in **Table 2**. The ICC values for the quantitative readings ranged from 0.723 to 0.894, thus indicating that the various techniques studies are well correlated, as can also be seen from **Figures 1-2**, which shows the results of the regression analysis.

Table 2. Agreement among different raters of the old reference values, according to the vitamin B12 and folate.

	ICC (95% CI)	Manufacturer's reference values		Hospital's reference values	
		Kappa (95% CI)	Accuracy (%)	Kappa (95% CI)	Accuracy (%)
Vitamin B12 (n = 290)					
Global	0.766 (0.714 - 0.809)				
DxI 800 vs., Advia Centaur	0.755 (0.701 - 0.80)	0.38 (0.22 - 0.55)	87.59	0.41 (0.25 - 0.56)	87.24
DxI 800 vs., Cobas e411	0.843 (0.807 - 0.873)	0.25 (0.09 - 0.41)	85.86	0.25 (0.09 - 0.41)	85.86
Advia Centaur vs., Cobas e411	0.723 (0.663 - 0.773)	0.60 (0.45 - 0.75)	92.01	0.55 (0.40 - 0.69)	90.34
Folate (n = 284)					
Global	0.862 (0.829 - 0.889)				
DxI 800 vs., Advia Centaur	0.894 (0.868 - 0.915)	0.94 (0.90 - 0.98)	97.18	0.40 (0.19 - 0.60)	92.61
DxI 800 vs., Cobas e411	0.842 (0.805 - 0.873)	0.17 (0.09 - 0.25)	63.38	0.23 (-0.01 - 0.47)	94.01
Advia Centaur vs., Cobas e411	0.893 (0.867 - 0.914)	0.15 (0.08 - 0.23)	60.56	0.35 (0.15 - 0.56)	92.25

ICC (95% CI): Intraclass correlation coefficient with their 95% confidence intervals.

Kappa (95% CI): Kappa value with their 95% confidence intervals.

Accuracy (%): Proportion of corrected values classified by each pair of methods compared.

The correlation coefficients (R) for folate were higher than 0.9 in all cases. In contrast, although the inter-method correlations for vitamin B12 were good in all cases, a clearly better correlation was obtained for the UniCel® DxI 800 Access® and Cobas® e411 analysers.

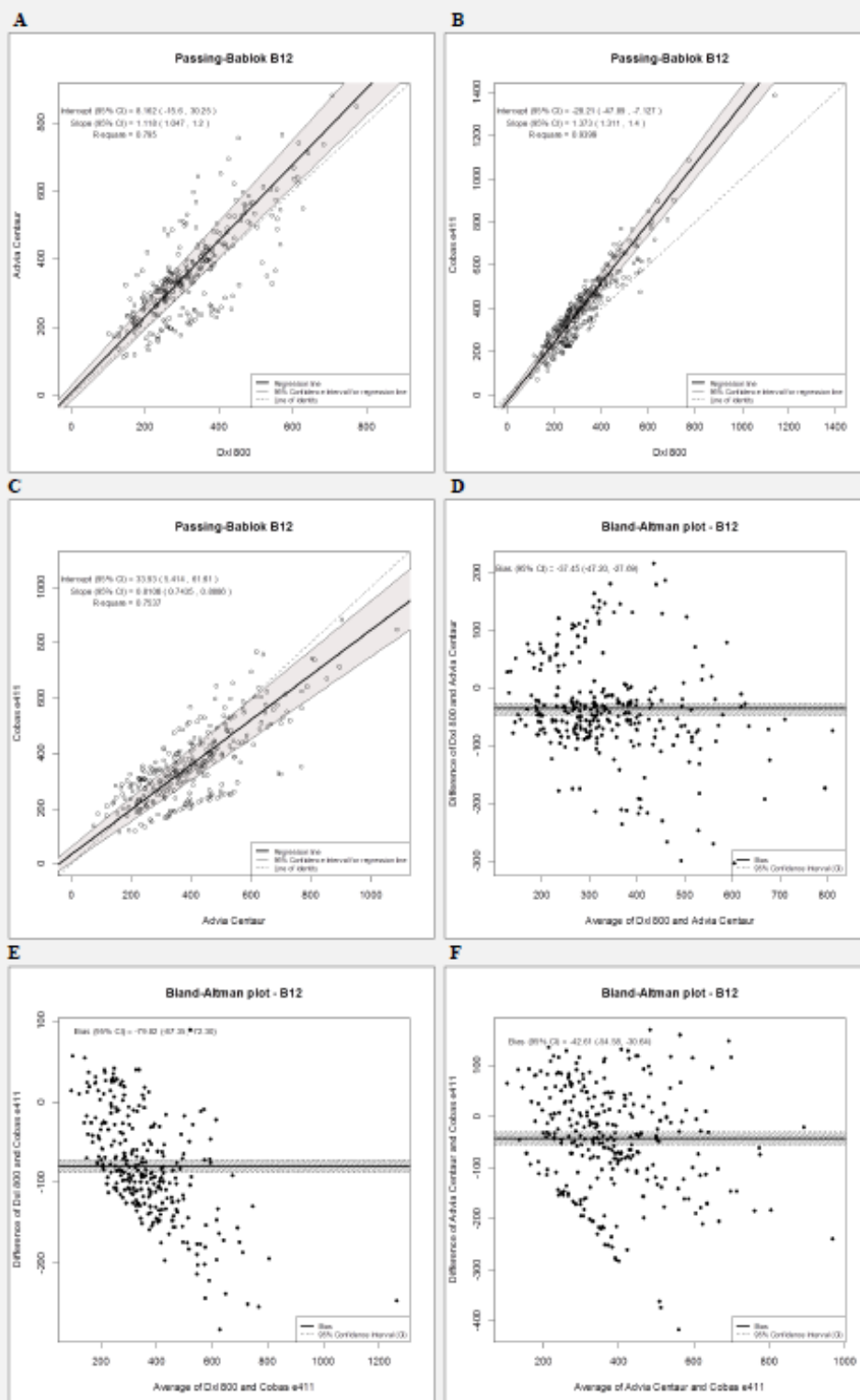


Figure 1. Passing-Bablok and Bland-Altman plots for comparison of the studied methods for vitamin B12.

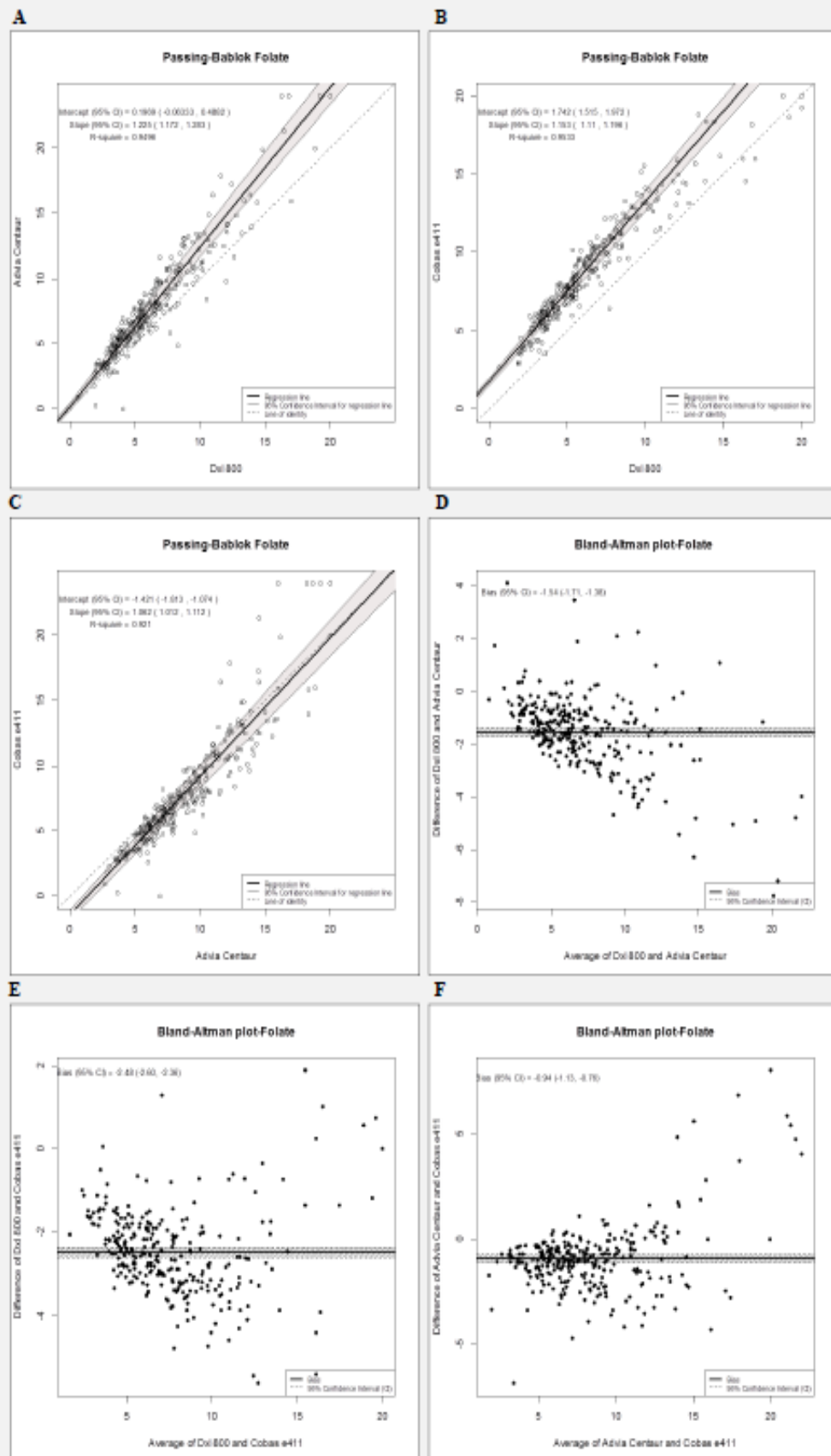


Figure 2. Passing-Bablok and Bland-Altman plots for comparison of the studied methods for folate.

The degree of agreement between the currently used reference values showed the opposite, with the kappa value of less than 0.4 obtained in almost all cases suggesting a lack of agreement. This finding supports our reason for undertaking this study. The new reference values obtained for vitamin B12 and folate are listed in **Table 3**. The new values obtained are lower than the currently used values in all cases, especially the lower limit, as a deficiency in these compounds is the main cause of concern for physicians.

Table 3. New non-parametric reference values (90% confidence interval) and their respective Kappa values (95% confidence interval) and accuracies with respect to other manufacturers.

Reference values (90% CI)	Vitamin B12 (n = 290)		Folate (n = 284)	
	P _{2.5}	P _{97.5}	P _{2.5}	P _{97.5}
DxI 800	146 (125.39 - 151.25)	614 (568.26 - 686.1)	2.1 (1.88 - 2.34)	16.24 (13.63 - 18.89)
Advia Centaur	159 (119.88 - 173.62)	696 (637.88 - 758.12)	2.74 (0.79 - 2.89)	19.85 (16.23 - 24.0)
Cobas e411	149.8 (112.77 - 167.76)	787 (723.36 - 896.62)	3.71 (2.99 - 3.86)	18.16 (15.8 - 18.92)
Kappa values and Accuracies				
	Kappa (95% CI)	Accuracy (%)	Kappa (95% CI)	Accuracy (%)
DxI 800 vs., Advia Centaur	0.47 (0.24 - 0.71)	95.17	0.70 (0.50 - 0.90)	97.18
DxI 800 vs., Cobas e411	0.62 (0.41 - 0.84)	96.55	0.70 (0.50 - 0.90)	97.18
Advia Centaur vs., Cobas e411	0.40 (0.16 - 0.64)	94.48	0.55 (0.33 - 0.78)	95.77

P_{2.5}: 2.5th percentile; P_{97.5}: 97.5th percentile.

90% CI: Confidence intervals at 90% level. Kappa (95% CI): Kappa value with their 95% confidence intervals.

Accuracy (%): Proportion of corrected values classified by each pair of methods compared.

Once the new reference values had been computed using non-parametric methods, the agreement between the new classifications was evaluated by means of kappa coefficients. The resulting kappa values ranged from 0.40 to 0.62 for vitamin B12 and 0.55 to 0.70 for folate. All computed accuracies were higher than 94%.

Finally, the analytical (CVa) and intra- (CVi) and inter- subject (CVg) coefficients of variation applied in the HGU laboratory (CVi = 6.93%, CVg = 31.09% for vitamin B12; CVi = 11.28%, CVg = 22.75% for folate) led to an individuality index of 0.22 for vitamin B12 and 0.50 for folate. These values gave RCVs of 28.86% for vitamin B12 and 38.44% for folate after application of the corresponding formula.

4.2.4. Discussion

Reference intervals for healthy subjects are important benchmarks for the clinical interpretation of laboratory test values [24]. The production of reference values is expensive and requires a significant effort by the laboratory. Furthermore, it is often difficult to obtain reference individuals which allow an appropriate reference range to be established. Although laboratories are solely responsible for establishing and reviewing these values, we believe that this problem should be shared by both clinical laboratories and the in vitro diagnostics industry, especially when multi-centre reference values are required [25,26].

As noted in ISO 15189:2003 [8], if a laboratory has reason to believe that a particular reference interval is inappropriate, this should be investigated and the appropriate corrective measures taken.

Despite being widely studied analytes, we noted that the hematology and digestive consultations at the HGU were becoming saturated with patients diagnosed with vitamin B12 deficiencies that were subsequently ruled out after more exhaustive analysis. This observation led us to propose this study, the principal conclusion of which has been a change in the reference values. As a result, replacement of the previously used reference values with those obtained herein led to a marked increase in accuracy, thereby allowing our population to be better classified.

A further important question is that if these values more closely resemble those already published in the literature, why weren't they being used? [27,28].

As could be expected from the excellent agreement found in the method comparison, reference values can be correctly transferred provided the population

and the pre-analytical conditions are also comparable. This type of transfer is increasingly common for most of the reference interval assignments currently used in clinical laboratories [17,29].

Obviously, we are fully aware that one of the main drawbacks of this study is that the population is not uniformly divided: there are many more women and, logically, the majority of the population considered to be “healthy” is aged 65 years or less. Furthermore, despite the existence of significant differences in the case of folate, we have not separated the reference intervals due to the low sample size; the current literature does not support this [23,30]. In spite of these limitations, we believe that the design proposed ensures the internal and external validity of our project.

The challenge for the future remains the development of intraindividual reference values. Thus, although we observed differences between the vitamin B12 and folate levels when determinations were repeated in the 25th percentile, the significance of this change remains unknown.

The individuality index (II) is less than, or close to, 0.6 in both cases, thus highlighting the fact that both parameters vary markedly from one individual to the next and, therefore, a comparison based exclusively on population-based reference intervals is of limited value. A comparison based on the RCV values is, however, of great utility for these parameters [22,31,32].

Another important factor in the current economic climate is that demand can now be managed more appropriately as inappropriate vitamin B12 testing can now be avoided [33].

Although a large number of publications on the topic of reference intervals already exist, it is clear that much work is needed to reach an optimal situation [34,35].

This effort is, however, worthwhile as it will lead to improvements in clinical practice and therefore will ultimately benefit patients themselves.

4.2.5. Conclusion

Although producing reference values for each laboratory is expensive and requires a significant effort, it can also lead to a better classification of patients, avoiding unnecessary medical appointments, treatments or diagnosis techniques. As this is not always possible and is not useful for daily work, it is important to investigate, from time to time, if changes have been published, and if necessary, take the appropriate corrective actions.

4.2.6. References

1. Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. Clin Chim Acta 2003; 334: 5-23.
2. Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry. International Committee for Standardization in Haematology. 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.
3. PetitClerc C, Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individual for the production of reference values. J Clin Chem Clin Biochem 1987; 25: 639-44.
4. Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry. International Committee for Standardization in Haematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. J Clin Chem Clin Biochem 1987; 25: 645-56.
5. Dybkaer R, Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry. International Committee for Standardization in Hematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. J Clin Chem Clin Biochem 1987; 25: 657-62.

6. Solberg HE, PetitClerc C. International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of the specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 593-8.
7. Solberg HE, Stasman D. International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 531-5.
8. International Organization for Standardization. Medical laboratories - particular requirements for quality and competence. ISO15189. Geneva: ISO; 2007.
9. Bock JL, Eckfeldt JH. Advances in standardization of laboratory measurement procedures: implications for measuring biomarkers of folate and vitamin B-12 status in NHANES. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(1): S332-6.
10. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, et al. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(1): S313-21.
11. Valente E, Scott JM, Ueland PM, Cunningham C, Casey M, Molloy AM. Diagnostic accuracy of holotranscobalamin, methylmalonic acid, serum cobalamin, and other indicators of tissue vitamin B12 status in the elderly. *Clin Chem* 2011; 57(6): 856-63.
12. Yetley EA, Coates PM, Johnson CL. Overview of a roundtable on NHANES monitoring of biomarkers of folate and vitamin B-12 status: measurement procedure issues. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(1): S297-302.
13. Herrmann W, Obeid R. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. *Dtsch Arztebl Int* 2008; 105(40): 680-5.
14. Clarke R, Sherliker P, Hin H, et al. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. *Clin Chem* 2007; 53(5): 963-70.
15. Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency - an update. *Haematologica* 2006; 91(11): 1506-12.

16. Vogeser M, Lorenzl S. Comparison of automated assays for the determination of vitamin B12 in serum. *Clin Biochem* 2007; 40(16-17): 1342-5.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline - Third Edition*. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
18. Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline Makes the Task Manageable. *Lab Med* 2009; 40: 75-6.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline - Second Edition*. CLSI document EP05-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004.
20. Dixon WJ. Processing data for outliers. *Biometrics* 1953; 9: 74-89.
21. Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. 2nd ed. New York: John Wiley; 1981.
22. Ricós C, Perich C, Doménech M, et al. Variación biológica. Revisión desde una perspectiva práctica. *Rev Lab Clin* 2010; 3(4): 192-200.
23. Young DS. *Effects of preanalytical variables on clinical laboratory tests*. 2nd ed. Washington: AACC 1997.
24. Klee GG. Clinical interpretation of reference intervals and reference limits. A plea for assay harmonization. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(7): 752-57.
25. Fuentes-Arderiu X, Mas-Serra R, Alumà-Trullàs A, Martí-Marcet MI, Dot-Bach D. Guideline for the production of multicenter physiological reference values using the same measurement system. A proposal of the Catalan Association for Clinical Laboratory Sciences. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(7): 778-82.
26. Rustad P, Felding P, Lahti A. Proposal for guidelines to establish common biological reference intervals in large geographical areas for biochemical quantities measured frequently in serum and plasma. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42(7): 783-91.

27. Ferré-Masferrer M, Fuentes-Arderiu X, Gomà-Llongueras M, et al. Regional reference values for some quantities measured with the ADVIA Centaur analyser. A model of co-operation between the in vitro diagnostic industry and clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39(2): 166-9.
28. Fuentes-Arderiu X, Ferrer-Masferrer M, González-Alba JM, et al. Multicentric reference values for some quantities measured with the Elecsys 2010 analyser. *Clin Chim Acta* 2001; 304: 143-6.
29. Ceriotti F. Prerequisites for use of common reference intervals. *Clin Biochem Rev* 2007; 28(3): 115-21.
30. Wahlin A, Bäckman L, Hultdin J, Adolfsson R, Nilsson LG. Reference values for serum levels of vitamin B12 and folic acid in a population-based sample of adults between 35 and 80 years of age. *Public Health Nutr* 2002; 5(3): 505-11.
31. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 758-64.
32. Petersen PH, Fraser CG, Sandberg S, Goldschmidt H. The index of individuality is often a misinterpreted quantity characteristic. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37: 655-61.
33. McHugh J, Afghan R, O'Brien E, Kennedy P, Leahy M, O'Keeffe D. Impact of the introduction of guidelines on vitamin B12 testing. *Clin Chem* 2012; 58(2): 471-2.
34. Ceriotti F, Hinzmann R, Panteghini M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* 2009; 46: 8-17.
35. Siest G, Henny J, Gräsbeck R, et al. The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(1): 47-64.

4.2.7. Resultados adicionales derivados del estudio

4.2.7.1. Introducción

Tal y como se ha descrito en el apartado Material y Métodos del artículo previamente citado, se planteó analizar exhaustivamente el percentil 25 de la población para definir adecuadamente el límite inferior de la vitamina B12.

Tras analizar las muestras correspondientes al percentil 25 de la población estudiada, observamos que muchos de estos pacientes, en esta segunda determinación, ya no pertenecían a dicho grupo debido a que se había modificado sustancialmente su nivel de vitamina B12. Ante este hecho, decidimos estudiar la variabilidad biológica intra e interindividual de ambos parámetros, así como calcular el VRC, para intentar explicar el cambio observado.

4.2.7.2. Material y métodos

Se reclutaron 18 sujetos sanos (2 hombres, 16 mujeres) del Hospital Galdakao-Usansolo, con edades comprendidas entre 29 y 60 años, que mantuvieron su estilo de vida normal durante el periodo de recogida de muestras. A cada individuo se le realizaron 4 extracciones durante 2 semanas, en las mismas condiciones, a la misma hora y por el mismo personal extractor. Las muestras de suero y plasma EDTA obtenidas fueron centrifugadas, alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su posterior análisis (Ricos y cols, 2009).

Además de los parámetros de interés, se analizaron también las siguientes determinaciones: vitamina B12, folato, 25-OH vitamina D y NT-proBNP séricos (Cobas e 411, Roche Diagnostics); gastrina sérica (Immulite 2000, Siemens Healthcare Diagnostics); holotranscobalamina sérica (Architect plus i2000, Abbott Diagnostics); eritropoyetina y anticuerpos anti-factor intrínseco séricos (UniCel Dxl 800 Access); procalcitonina ultrasensible y copeptina CT pro-AVP séricas y proadrenomedulina plasmática (Kryptor Compact Plus, Brahms).

El análisis de las muestras se realizó en una serie analítica simultáneamente en cada analizador y de forma aleatorizada, controlando la variabilidad biológica analítica intercalando múltiples alícuotas de control de calidad de cada analito (Fraser y Harris, 1989).

En cuanto al análisis estadístico, para la detección de outliers se utilizó el método de Dixon. Una vez detectados y eliminados de la muestra total, se llevó a cabo un análisis descriptivo de la muestra. Los coeficientes de variación (CV) de interés – CV total (CV_T), CV intraindividual (CV_{WS}), CV interindividual (CV_{BS}) y CV analítico (CV_A) – se obtuvieron haciendo uso del análisis de varianza, considerando los sujetos como efectos aleatorios. Este método se realizó mediante el procedimiento PROC MIXED en el software estadístico SAS System v9.2.

Además de los mencionados parámetros, se hallaron el coeficiente de fiabilidad (R), el índice de individualidad (II) y el valor de referencia del cambio (VRC) (Fraser y Harris, 1989; Widjaja y cols, 1999).

Todos los cálculos estadísticos se hallaron mediante el paquete estadístico SAS System v9.2.

4.2.7.3. Resultados

Los resultados se muestran a continuación (**Tabla 4**) y fueron presentados en el VI Congreso Nacional de Laboratorio Clínico (2012):

Tabla 4. Coeficientes de variación, fiabilidad, índice de individualidad y valor de referencia del cambio de los diferentes parámetros analizados en nuestro laboratorio.

	\bar{x}	SD	CV _T (%)	CV _{BS} (%)	CV _{WS} (%)	CV _A (%)	R	II	RCV	
Biomarker	Vitamin B12 (pg/mL)	424,740	123,561	31,21	31,085	6,931	7,769	0,899	0,223	28,859
	Folate (ng/mL)	10,740	2,625	24,436	22,747	11,280	8,069	0,729	0,496	38,442
	25-OH Vitamin D (ng/mL)	24,392	10,910	46,481	46,609	7,625	6,194	0,957	0,164	27,230
	NT-proBNP (pg/mL)	64,056	44,270	69,274	65,609	33,254	1,992	0,795	0,507	92,342
	Gastrin (pg/mL)	43,589	33,137	76,027	73,187	38,546	9,435	0,773	0,527	109,998
	Erythropoietin (mUI/mL)	9,827	3,338	33,974	25,346	23,561	3,425	0,531	0,930	65,991
	Anti Intrinsic Factor antibody (UA/mL)	1,040	0,030	2,956	-	-	2,290	-	-	6,348
	Holotranscobalamin (pmol/L)	72,435	41,949	57,913	56,469	17,021	2,930	0,914	0,301	47,873
	Proadrenomedullin (nmol/L)	0,429	0,078	18,263	18,155	6,796	1,575	0,871	0,374	19,337
	us Procalcitonin (µg/L)	0,048	0,015	33,042	17,430	26,842	2,644	0,295	1,540	74,762
Copeptin (pmol/L)	5,738	4,510	78,639	80,598	25,530	1,763	0,908	0,317	70,933	

x: Mean; SD: Standard Deviation; CV_T (%): Total Coefficient Variation; CV_{BS} (%): Between-subject coefficient variation; CV_{WS} (%): Within-subject coefficient variation; CV_A (%): Analytic coefficient variation; R: Reliability coefficient; II: Individuality index; RCV: Reference Change Value. -: No available

4.2.7.4. Conclusiones

Tal y como hemos mencionado en la discusión del trabajo realizado, los laboratorios clínicos deberían tener en cuenta la variabilidad biológica de los parámetros que informan. La producción de dichos CV es muy laboriosa y por tanto, imposible de realizar para todos aquellos analitos; por ello, actualmente se dispone de bases de datos en las cuales aparecen los CV publicados junto con las especificaciones de la calidad (<http://www.seqc.es>).

La mayoría de los CV obtenidos en este estudio son novedosos ya que no hemos encontrado referencias en la literatura actual. Sin embargo, en el caso del folato sérico y la NT-proBNP, los resultados no son similares a los existentes en las bases de datos. Esto puede deberse a muchísimas razones, entre las que se encuentran los criterios de selección de sujetos, técnicas de determinación, metodología empleada, etc.

De nuestros resultados claramente se concluye que la mayoría de los parámetros empleados en el laboratorio muestran una fuerte individualidad ($II < 0.6$), por lo que la comparación del resultado del paciente con el valor previo (RCV), debería sustituir a los rangos de referencia ampliamente utilizados en la práctica diaria (Ricos y cols, 2009). Para estas magnitudes resulta de gran ayuda y utilidad la comparación aplicando el RCV (Fraser, 2004; Petersen y cols, 1999; Ricós y cols, 2010). Únicamente en los casos de la eritropoietina y la procalcitonina sería recomendable utilizar los valores de referencia convencionales.

De este modo, el RCV puede considerarse una herramienta útil a la hora de evaluar el significado clínico de las diferencias observadas en resultados seriados de un mismo individuo, definiendo así la probabilidad de encontrar un cambio significativo (Plebani y Lippi, 2012). Debido a la marcada individualidad de los parámetros de interés, mediante la utilización de los valores de referencia individuales o específicos se mejora la información aportada por el laboratorio clínico, contribuyendo así a un mejor manejo del paciente.

Este hallazgo permite también justificar la repetición de las determinaciones de vitamina B12 y folato séricos (McHugh y cols, 2012), antes de iniciar un estudio más exhaustivo de los parámetros relacionados con hipovitaminosis, asegurando que las pruebas solicitadas se basan en la evidencia.

4.3. Artículo 3

LETTER TO THE EDITOR

“Change in the Reference Values for serum Vitamin B12: Impact on the Clinical Laboratory”

I. Ajuria-Morentin, C. Mar-Medina, U. Aguirre-Larracochea, J.M. Quintana-López, B. Ruiz-Larrea, C. Cortés-Fernández.
Clin Lab 2016; 62: 2469-2471.

4.3.1. To the Editor:

At the beginning of 2012, our laboratory received a grant from the Government of the Basque Country to reassess the reference ranges for vitamin B12. We had previously observed errors in the classification of patients with suspected vitamin B12 deficiency, and hence, we decided to investigate this issue. As required by the International Organization for Standardization (ISO) standard 15189:2007, “Biological reference intervals shall be periodically reviewed. If the laboratory has reason to believe that a particular interval is no longer appropriate for the reference population, then an investigation shall be undertaken, followed, if necessary, by corrective action”. Establishment of the appropriate limits is of particular importance when it comes to classifying patients as individuals with asymptomatic subclinical deficiencies [1,2].

Our main objective was to establish appropriate serum vitamin B12 and folate reference values for the healthy population from the inland district of Bizkaia province.

Blood and serum samples were sent for subsequent assay of vitamin B12 and folate, using three immunochemical methods. At the end of 2012, after analyzing samples from 315 apparently healthy individuals, the previously used reference values (lower limit: 180 pg/mL) were replaced, with a new lower limit (150 pg/mL), calculated using non-parametric methods (P2.5, 90% confidence interval). This led to a marked increase in accuracy, allowing our population to be better classified, as reported in this journal some months later [3].

During the 3 years following the change, we validated these reference values in 65 patients referred to the hematology unit with suspected vitamin B12 deficiency. We carried out all relevant tests in accordance with the protocol for diagnosing this type of deficiency to study the characteristics of the corresponding parameters, in particular, analysing the power of each parameter for classifying patients as having or not having a deficiency. The lack of a clear gold standard complicates the diagnosis and subsequent decision-making; in this work, the final decision was left to the clinical judgement of the hematologist.

The results are summarised in **Table 1**. We observed that the parameter that best classifies our patients a priori is the serum B12 level with a lower reference limit of 150 pg/mL. Moreover, the positive likelihood ratio is 27.32, indicating that the pre- to post-test changes in probability are large and often conclusive. Despite both vitamin B12 and holotranscobalamin being significant for classifying patients as having or not having a deficiency ($p < 0.05$), there is a marked difference in their results, holotranscobalamin performing less well in all cases, and this is consistent with findings reported elsewhere [4].

I. Ajuria-Morentin et al.

Table 1. Sensitivity, specificity, predictive values and likelihood ratios of the parameters analysed for the classification of vitamin B12 deficiency.

	N = 65							
	Se	Sp	PPV	NPV	ACCURACY	LR+	LR-	p-value
Homocysteine	64.71	61.54	42.31	80	62.5	1.68	0.57	0.0869
Methylmalonic acid	0	94.59	0	67.31	64.82	0	1.06	0.3286
Vitamin B12 (≤ 150 pg/mL)	66.67	97.56	92.31	86.96	88.14	27.32	0.34	< 0.0001
Medium corpuscular volume	33.33	85.37	50	74.47	69.49	2.28	0.78	0.1582
Gastrin	33.33	68.29	31.58	70	57.63	1.06	0.98	0.902
Holotranscobalamin	38.89	89.74	63.64	76.09	73.68	3.79	0.68	0.0256
Anti-intrinsic factor antibodies	*	*	*	*	69.49			*
Anti-parietal cell antibodies	16.67	92.68	50	71.7	69.49	2.28	0.9	0.3567
Vitamin B12 (< 180 pg/mL)	72.22	85.37	68.42	87.5	81.36	4.94	0.33	< 0.0001

Se - Sensitivity (%), Sp - Specificity (%), PPV - positive predictive value, NPV - negative predictive value, LR+ - positive likelihood ratio, LR- - negative likelihood ratio, p-value - statistical significance.

In addition, we monitored the number of vitamin B12 tests performed between 1 January 2012 and 31 December 2015, as well as the associated parameters (methylmalonic acid, folic acid, homocysteine, anti-gastric parietal cell antibodies, and intrinsic factor antibodies) to explore the consequences of the changes in reference ranges and efforts made to raise awareness among clinicians.

The number of vitamin B12 tests per year has remained relatively stable over this period (47,577 in 2012), even increasing slightly (50,646 in 2015), and this indicates that clinicians tend to repeat vitamin B12 tests, as recommended by guidelines, rather than request all the relevant tests available [5]. Indeed, there has been a notable decrease in requests for associated testing, with progressive reductions in the number of tests for methylmalonic acid (by 65%; from 398 in 2012 to 138 in 2015) and intrinsic factor antibody (by 54%; from 694 in 2012 to 319 in 2015).

An important achievement in the current economic climate is that demand can now be better managed, inappropriate vitamin B12 testing having been minimized [6]. Under the current conditions, it is more important than ever that clinical laboratories are involved in ensuring that testing is evidence based.

4.3.2. References

1. Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol* 2014; 166(4): 496-513 (PMID: 24942828).
2. Bock JL, Eckfeldt JH. Advances in standardization of laboratory measurement procedures: implications for measuring biomarkers of folate and vitamin B-12 status in NHANES. *Am J Clin Nutr* 2011; 94(1): 332S-336S (PMID: 21562088).
3. Ajuria-Morentin I, Mar-Medina C, Bereciartua-Urbieta E, Aguirre-Larracochea U, Quintana-López JM, Ruiz-Larrea MB. Determination of Reference Values for serum folate and vitamin B12 using three different immunoassays: Is it worth making an effort to produce them in our laboratory? *Clin Lab* 2014; 60(7): 1135-43 (PMID: 25134382).
4. Carmel R. Subclinical cobalamin deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28(2): 151-8 (PMID: 22241075).
5. Shipton MJ, Thachil J. Vitamin B12 deficiency - A 21st century perspective. *Clin Med (Lond)* 2015; 15(2):145-50 (PMID: 25824066).
6. McHugh J, Afghan R, O'Brien E, Kennedy P, Leahy M, O'Keeffe D. Impact of the introduction of guidelines on vitamin B12 testing. *Clin Chem* 2012; 58(2): 471-2 (PMID: 22140213).

4.3.3. Resultados adicionales derivados del estudio

Desde la fecha de la publicación del artículo hasta el presente escrito, hemos realizado diferentes comprobaciones sobre la validación de los nuevos rangos de referencia, así como actualizaciones en los datos que avalan un uso racional de las distintas pruebas de laboratorio.

A pesar de que tanto la vitamina B12 como la holotranscobalamina son significativas a la hora de clasificar a los pacientes como déficit o no déficit ($p < 0.05$), existe una marcada diferencia entre sus resultados: la holotranscobalamina tiene un rendimiento menor en todos los casos y esto es consistente con los hallazgos reportados en la literatura (Carmel, 2012). Revisiones publicadas recientemente concluyen que el inmunoensayo de la holotranscobalamina no puede utilizarse como parámetro para medir el estatus vitamínico de la B12 o para predecir el inicio de un déficit metabólico (Golding, 2016).

Además, se ha realizado un seguimiento del número de determinaciones de vitamina B12 realizados en el periodo comprendido entre 01/01/2012 - 31/12/2016, así como de los parámetros asociados (ácido metil malónico, ácido fólico, homocisteína, anticuerpos anti célula parietal gástrica, anticuerpos anti factor intrínseco, gastrina) para valorar la repercusión del cambio de los valores de referencia y del esfuerzo realizado en concienciar a los clínicos. El número de determinaciones de vitamina B12 realizadas anualmente se ha mantenido a lo largo de los años (47.588 determinaciones en el 2012), incluso ha aumentado (50.855 en el 2016), lo que constata que los clínicos tienden a repetir la determinación de vitamina B12 en vez de pedir todas las pruebas del catálogo, tal y como recomiendan las guías (McHugh y cols, 2012). Por el contrario, ha habido un notable descenso del resto de pruebas asociadas, llegando incluso a una reducción progresiva del 71% en las determinaciones de ácido metil malónico (398 determinaciones realizadas durante el 2012 a 114 realizadas durante el 2016) y 54% en las determinaciones de anticuerpos anti factor intrínseco.

A continuación se muestra la tendencia/evolución anual (**Tabla 2**) de los diferentes parámetros que componen el perfil estudiado:

	2016	←			2012
Ácido fólico	50.853	50.642	52.124	48.227	47.585
Vitamina B12	50.855	50.643	52.143	48.229	47.588
Acido metil malónico ==>	114	138	275	253	398
Homocisteína	650	621	759	714	1.072
Ac.Anti Factor Intrínseco ==>	320	319	504	463	696
Ac Célula parietal gástrica	345	359	510	481	717
Gastrina ==>	232	237	293	350	412

Tabla 2. Número de determinaciones al año realizadas en el Laboratorio de los parámetros relacionados con el déficit de vitamina B12 (seguimiento realizado desde el 1/01/2012 al 31/12/2016).

Un factor importante en la actual situación económica es que la demanda ahora se puede manejar de manera más apropiada ya que se pueden evitar las pruebas innecesarias de vitamina B12 (McHugh y cols, 2012). En la situación actual, es fundamental que los laboratorios clínicos se impliquen asegurando que las pruebas solicitadas se basan en la evidencia.

5. Discusión

Discusión global

Nuestros resultados muestran que los métodos actualmente en uso no son transferibles y, por tanto tampoco lo deberían ser sus puntos de corte (Akin y cols, 2014). Los coeficientes de correlación, a pesar de ser válidos, muestran que en algunos casos no se está midiendo el mismo analito, constatándose la falta de transferibilidad. El reto de cada laboratorio es elegir la metodología que mejor se ajuste a sus necesidades.

En conjunto, las características técnicas de los métodos estudiados se pueden considerar aceptables. Sin embargo, los límites de referencia para considerar que un paciente tiene un nivel insuficiente de vitamina deberían establecerse en función del método utilizado por cada laboratorio.

Fortalezas y Aplicabilidad

A pesar de que la producción de los valores de referencia es muy costosa y supone un enorme esfuerzo para el laboratorio clínico, en ocasiones el establecimiento adecuado de los mismos puede suponer una gran mejoría a la hora de clasificar a nuestros pacientes como supuestos déficits.

A pesar de tratarse de analitos ampliamente utilizados, desde el punto de vista del laboratorio es importante investigar, actualizarse, comparar y si es necesario, corregir. De la rutina diaria también surgen trabajos importantes, tal y como podemos ver en nuestro estudio, donde la principal conclusión ha sido sustituir los valores de referencia que estaban siendo utilizados. Este hecho ha supuesto un marcado aumento en la exactitud a la hora de clasificar a nuestros pacientes como posibles déficits.

Al tratarse de un estudio multidisciplinar y multicéntrico, las conclusiones pueden generalizarse. Además, el trabajo en equipo facilita el manejo diagnóstico-clínico, siendo el paciente el principal beneficiado. En la práctica clínica, el uso de las recomendaciones y los protocolos, ayuda a unificar criterios y a trabajar de forma consensuada. Se ha elaborado una guía en la que, además de una revisión bibliográfica, se exponen las **RECOMENDACIONES PARA EL DIAGNOSTICO DEL DÉFICIT DE VITAMINA B12 Y FOLATO** (Ver Anexo I). Con la publicación de dicho protocolo en Osakidetza se pretende mejorar el uso racional del gasto sanitario y optimizar los recursos.

En nuestro caso, la monitorización de las determinaciones anualmente realizadas tanto para vitamina B12 y folato, así como para los parámetros asociados a déficit, ha arrojado información relevante para poder analizar las consecuencias del cambio y del esfuerzo realizado. En la situación actual, es muy importante que el laboratorio clínico se implique activamente en que las solicitudes realizadas estén basadas en la evidencia.

Debilidades y Limitaciones

Una de las limitaciones del estudio referente a la vitamina D es que a pesar de cubrir la mayor parte del rango de referencia, existen pocas muestras a concentraciones elevadas (> 60 ng/mL), debido a que en nuestro entorno encontramos pocos sujetos con dichos niveles. Esta falta de uniformidad puede alterar en parte los resultados de la regresión. Sin embargo, dado que la importancia clínica recae en la hipovitaminosis, no lo consideramos un sesgo importante.

En cuanto al estudio principal sobre los valores de referencia de la vitamina B12 y folato, la limitación fundamental es la falta de un estándar oro, lo que complica el diagnóstico y la consecuente toma de decisiones. Además, somos completamente conscientes de que la población incluida en el estudio no está dividida de manera uniforme: hay más mujeres y lógicamente la población considerada como sana es ≤ 65 años.

A pesar de dichas limitaciones y variables, consideramos que el diseño propuesto asegura la validez interna y externa de nuestro proyecto.

Perspectivas de futuro

Podemos concluir que desde el laboratorio clínico se debe seguir investigando en esta línea, fundamentalmente en la detección precoz de déficits vitamínicos, para mejorar la práctica clínica, de forma que los hallazgos repercutan positivamente en el paciente. Para ello, es imprescindible el desarrollo de estándares internacionales (Thorpe y cols), perfiles unificados, consensuar criterios, desarrollar conceptos como el VRC (Bugdayci y cols, 2015; Walz y Fierz, 2015) y elaborar guías clínicas y nuevas recomendaciones consensuadas.

Por último reseñar que desde finales de 2016 nuestro equipo ha sido incluido en un estudio multicéntrico a nivel estatal, para el cual nuestro trabajo ha servido como referente: “Estudio multicéntrico de valores de referencia de folato sérico en España”.

6. Conclusiones

6. Conclusiones:

1. A pesar del grado de acuerdo existente entre los diferentes métodos para la determinación de vitamina D, las diferencias metodológicas estudiadas hacen que no sea posible establecer un punto de corte global para definir la hipovitaminosis. Esto hace que sea imprescindible conocer las características del método utilizado en cada laboratorio.
2. Se han establecido nuevos valores de referencia de vitamina B12 para la población sana de la comarca interior de Bizkaia, habiendo hecho especial hincapié en el punto de corte inferior (sustitución de 180 pg/mL por 150 pg/mL como nuevo límite inferior). Los valores de referencia séricos que estaban siendo utilizados para la vitamina B12 no eran adecuados para nuestra población, estando sobrediagnosticados los déficits, con el consiguiente aumento de la utilización de los recursos sanitarios.
3. Se han establecido nuevos valores de referencia de folato para la población sana de la comarca interior de Bizkaia. Los valores de referencia séricos que estaban siendo utilizados para el folato tampoco eran adecuados para nuestra población, hecho que hace aumentar el porcentaje de falsos positivos.
4. Los diferentes métodos presentes en el mercado y empleados en los distintos centros de Osakidetza no tienen la misma capacidad discriminatoria. Los métodos presentan una buena correlación entre sí, pero los rangos de referencia no son transferibles. Por lo tanto, una vez más, es fundamental conocer las características asociadas al método empleado en cada laboratorio.

5. Hemos visto que la variabilidad biológica influye notablemente en las determinaciones estudiadas, por lo que debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Debido a la marcada individualidad de los parámetros de interés, el RCV puede considerarse una herramienta útil a la hora de evaluar el significado clínico de las diferencias observadas en resultados seriados de un mismo individuo, definiendo así la probabilidad de encontrar un cambio significativo y contribuyendo a un mejor manejo del paciente.
6. La sustitución de los valores de referencia de vitamina B12, especialmente el nuevo límite inferior, ha supuesto un cambio realmente significativo. Los nuevos valores no solamente han demostrado clasificar mejor a la población de riesgo (tercera edad y pacientes con patología hematológica relacionada), sino que han evitado el aumento innecesario de la utilización de los distintos servicios sanitarios.
7. Con el establecimiento de los nuevos valores de referencia y la influencia de la introducción de las recomendaciones elaboradas para el diagnóstico del déficit de la vitamina B12, se ha conseguido mejorar notablemente la gestión de la demanda. El número de determinaciones de vitamina B12 realizadas anualmente se ha mantenido a lo largo de los años desde la sustitución de los valores, disminuyendo considerablemente la utilización de pruebas diagnósticas complementarias asociadas al estudio de un posible déficit vitamínico.

7. Referencias bibliográficas

- **A**kin F, Yavuz H, Bodur S, Kiyici A. Vitamin B12 levels of subjects aged 0-24 year(s) in Konya, Turkey. *J Health Popul Nutr* 2014; 32: 615-22.
- Allen LH. How common is vitaminB12 deficiency? *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 693S–696S.
- Andrès E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, Noblet-Dick M, Maloisel F, Schlienger JL, Blicklé JF. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 2004; 171: 251-9.
- Aparicio-Ugarriza R, Palacios G, Alder M, González-Gross M. A review of the cut-off points for the diagnosis of vitamin B12 deficiency in the general population. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53: 1149-59.
- Aytekin M, Emerk K. Accurate Reference Intervals are required for Accurate Diagnosis and Monitoring of Patients. *EJIFCC* 2008; 19: 137–141.
- **B**erg RL, Shaw GR. Laboratory Evaluation for Vitamin B12 Deficiency: The Case for Cascade Testing. *Clin Med Res* 2013; 11: 7–15.
- Bock JL, The new era of automated immunoassay. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 628-46.
- Bock JL, Eckfeldt JH. Advances in standardization of laboratory measurement procedures: implications for measuring biomarkers of folate and vitamin B-12 status in NHANES. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 332S-336S.
- Brito A, Hertrampf E, Olivares M, Gaitán D, Sánchez H, Allen L, y cols. Folatos y vitamina B12 en la salud humana. *Rev Med Chile* 2012; 140: 1464-1475.
- Bugdayci G, Oguzman H, Arattan HY, Sasmaz G. The use of reference change values in clinical laboratories. *Clin Lab* 2015; 61: 251-7.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Elsevier Health Sciences, 2012. USA. Capítulo 9: 205-223.
- **C**armel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2011; 94: 348S-358S.
- Carmel R. Subclinical cobalamin deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 2012; 28: 151-8.

- Clarke R, Sherliker P, Hin H, Nexo E, Hvas AM, Schneede J, y cols. Detection of vitamin B12 deficiency in older people by measuring vitamin B12 or the active fraction of vitamin B12, holotranscobalamin. *Clin Chem* 2007; 53: 963-70.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline – Second Edition Clinical and Laboratory Standards Institute, 2004. CLSI document EP05-A2.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline – third edition. Wayne (PA): CLSI; 2008. CLSI document C28-A3.
- Comisión valores de referencia de la SEQC. Producción y utilización de valores de referencia. *Quím Clín* 1991; 6: 49-68.
- **D**ali-Youcef N, Andrés E. An update on vitamin B12 deficiency in adults. *Q J Med* 2009; 102: 17-28.
- Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol* 2014; 166: 496-513.
- Dybkaer R, Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry. International Committee for Standardization in Hematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 657-62.
- **F**edosov SN, Brito A, Miller JW, Green R, Allen LH. Combined indicator of vitamin B12 status: modification for missing biomarkers and folate status and recommendations for revised cut-points. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53: 1215-25.
- Forrellat-Barrios M, Gomis-Hernandez I, Gautier-Du Defaix H. Vitamina B12: metabolismo y aspectos clínicos de su deficiencia. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 1999; 15: 159-174.
- Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 409-3.

- Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Amer. Assoc. for Clinical Chemistry, 2001.
- Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. Clin Chem Lab Med 2004; 42: 758-64.
- Fraser CG. Reference change values. Clin Chem Lab Med 2011; 50: 807-12.
- Fuentes-Arderiu X. Aproximación a los valores de referencia. Anal Clín 2007; 32: 57-58.
- **G**arcía JJ. Significado y empleo de la razón de probabilidades en la práctica clínica. Rev Mex Pediatr 2000; 67: 188-191.
- Golding PH. Holotranscobalamin (HoloTC, Active-B12) and Herbert's model for the development of vitamin B12 deficiency: a review and alternative hypothesis. Springerplus 2016; 5: 668.
- Gómez González C, Pérez Castán JF. Capítulo 8: Pruebas diagnósticas. Concordancia. SEMERGEN. 2007; 33: 519-19.
- González de la Presa B, Canalias Reverter F, Esteve Poblador S, Gella Tomás FJ, Izquierdo Álvarez S, López Martínez R, y cols. Procedimiento para la transferencia y revisión de intervalos de referencia biológicos. Documentos de la SEQC, 2016.
- **H**annibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen AL, Behringer S, Grünert SC, Spiekerkoetter U, y cols. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. Front Mol Biosci 2016; 3: 27.
- Henny J, Petclerc C, Fuentes-Arderiu X, Hyltoft Petersen P, Queraltó JM, Schiele F, y cols. Need for revising the concept of reference values. Clin Chem Lab Med 2000; 38: 589-95.
- Henry JB. El laboratorio en el diagnóstico clínico. Ed. Marban. 2005. Madrid. Capítulo 3: 60-78.
- Herrmann W, Obeid R. Causes and early diagnosis of vitamin B12 deficiency. Dtsch Arztebl Int. 2008; 105: 680-5.
- Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. Clin Chim Acta 2003; 334: 5-23.
- Hvas AM, Nexø E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency--an update. Haematologica 2006; 91: 1506-12.

- **I**nternational Organization for Standardization (ISO). Medical laboratories - particular requirements for quality and competence. Geneva: ISO; 2012. ISO 15189.
- **K**aplan LA, Pesce AJ. Química Clínica. Técnicas de Laboratorio. Fisiopatología. Métodos de Análisis. Editorial Medica Panamericana, 1991, Buenos Aires. Capítulo 34: 804-809.
- **M**auri M, Alfayate R, Navarrete JM, Lorenzo S. Técnicas de Laboratorio en Endocrinología Clínica. Endocrinol Nutr 2005; 52: 260-6.
- McCadden A. Vitamin B12 in neurology and ageing: Clinical and genetic aspects. Biochimie 2013; 95: 1066-76.
- McHugh J, Afghan R, O'Brien E, Kennedy P, Leahy M, O'Keeffe D. Impact of the introduction of guidelines on vitamin B12 testing. Clin Chem 2012; 58: 471-2.
- McNulty H, Scott JM. Intake and status of folate and related B-vitamins: considerations and challenges in achieving optimal status. Br J Nutr 2008; 99: S48-54.
- Moratalla Rodriguez G. Lectura crítica de artículos de pruebas diagnósticas II: análisis de resultados. Radiologia. 2015; 57: 22-28.
- Morrison AS. Screening in chronic disease (2nd ed). Oxford University Press, New York, 1992. Capítulo 3.
- **N**ielsen MJ, Rasmussen MR, Andersen CB, Nexø E, Moestrup SK. Vitamin B12 transport from food to the body's cells--a sophisticated, multistep pathway. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012; 9: 345-54.
- **P**alacios G, Sola R, Barrios L, Pietrzik K, Castillo MJ, González-Gross M. Algorithm for the early diagnosis of vitamin B12 deficiency in elderly people. Nutr Hosp 2013; 28: 1447-1452.
- Patel KV. Epidemiology of anemia in older adults. Semin Hematol 2008; 45: 210-7.
- Petersen PH, Fraser CG, Sandberg S, Goldschmidt H. The index of individuality is often a misinterpreted quantity characteristic. Clin Chem Lab Med 1999; 37: 655-61.

- PetitClerc C, Solberg HE. International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individual for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987; 25: 639-44.
- Pineda-Tenor D, Ruiz-Martín G. El laboratorio clínico y la función hormonal. Preanalítica, analítica, postanalítica y calidad. Ed. LABCAM. 2011. Capítulo 1: 26-48.
- Pita Fernández S, Pértegas Díaz S. Pruebas diagnósticas: sensibilidad y especificidad. *Cad Aten Primaria* 2003; 10: 120-124.
- Plebani M, Lippi G. Improving the post-analytical phase. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48: 435-6.
- Plebani M, Lippi G. Biological variation and reference change values: an essential piece of the puzzle of laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 2012; 50: 189-90.
- Remacha AF, Sardà MP, Canals C, Queraltò JM, Zapico E, Remacha J, Carrascosa C. Role of serum holotranscobalamin (holoTC) in the diagnosis of patients with low serum cobalamin. Comparison with methylmalonic acid and homocysteine. *Ann Hematol* 2014; 93: 565-9.
- Reynolds E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *Lancet Neurol* 2006; 5: 949–60.
- Ricós C, Domenech M, Perich C. Analytical quality specifications for common reference intervals. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 858-62.
- Ricós C, Perich C, Minchinela J, Álvarez V, Simón M, Biosca C, y cols. Application of biological variation – a review. *Biochemia Medica* 2009; 19: 250-9.
- Ricós C, Perich C, Doménech M. Variación biológica. Revisión desde una perspectiva práctica. *Rev Lab Clin* 2010; 3: 192-200.
- Ricós C. Laboratorio Clínico y Calidad. Comité de Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios de la SEQC y Fundació pel Control de la Qualitat dels Laboratoris Clínics. Barcelona, 2012.
- Rizzo G, Laganà AS, Rapisarda AM, La Ferrera GM, Buscema M, Rossetti P, y cols. Vitamin B12 among Vegetarians: Status, Assessment and Supplementation. *Nutrients* 2016; 8: 767.

- http://www.seqc.es/es/Sociedad/7/51/102/Base_de_datos_de_Variacion_biologica_%7C_Bases_de_datos_y_documentos_del_Comite_de_Garantia_de_la_Calidad_y_Acreditacion_%7C_Comite_de_Garantia_de_la_Calidad_y_Acreditacion.
- **Shane B.** Folate and vitamin B12 metabolism: Overview and interaction with riboflavin, vitamin B6 and polymorphisms. *Food Nutr Bull* 2008; 29: 5-16.
- **Shipton MJ, Thachil J.** Vitamin B12 deficiency - A 21st century perspective. *Clin Med* 2015; 15: 145-50.
- **Siest G, Henny J, Gräsbeck R, et al.** The theory of reference values: an unfinished symphony. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 47-64.
- **Snow CF.** Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1289-98.
- **Sokoll LJ, Chan DW.** Clinical analyzers. Immunoassays. *Anal Chem* 1999; 71: R356-62.
- **Solberg HE.** International Federation of Clinical Chemistry. International Committee for Standardization in Haematology. Approved recommendation (1986) on the theory of reference values. Part 1. The concept of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987a; 25: 337-42.
- **Solberg HE.** International Federation of Clinical Chemistry. International Committee for Standardization in Haematology. Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987b; 25: 645-56.
- **Solberg HE, PetitClerc C.** International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of the specimens for the production of reference values. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 593-8.
- **Solberg HE, Stasman D.** International Federation of Clinical Chemistry. Approved recommendation on the theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1991; 29: 531-5.

- Solomon LR. Disorders of cobalamin (Vitamin B12) metabolism: Emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Reviews* 2007; 21: 113–130.
- Stabler SP, Allen RH. Vitamin B12 deficiency as a worldwide problem. *Annu Rev Nutr.* 2004; 24: 299-326.
- Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. *N Eng J Med* 2013; 368: 149-60.
- **T**ate JR, Yen T, Jones G. Transference and Validation of Reference Intervals. *Clin Chem* 2015; 61: 1012-1015.
- Thorpe SJ, Rigsby P, Roberts G, Lee A, Hamilton M, Craig D. An International Standard for holotranscobalamin (holoTC): international collaborative study to assign a holoTC value to the International Standard for vitamin B12 and serum folate. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54: 1467-72.
- **V**alente E, Scott JM, Ueland PM, Cunningham C, Casey M, Molloy AM. Diagnostic accuracy of holotranscobalamin, methylmalonic acid, serum cobalamin, and other indicators of tissue vitamin B12 status in the elderly. *Clin Chem* 2011; 57: 856-63.
- Van Oijen MG, Vlemmix F, Laheij RJ, Paloheimo L, Jansen JB, Verheugt FW. Hyperhomocysteinaemia and vitamin B12 deficiency: the long-term effects in cardiovascular disease. *Cardiology* 2007; 107: 57-62.
- Vogeser M, Lorenzl S. Comparison of automated assays for the determination of vitamin B12 in serum. *Clin Biochem* 2007; 40: 1342-5.
- **W**alz B, Fierz W. The concept of reference change values (RCV). Will it supersede reference intervals? *Ther Umsch* 2015; 72: 130-5.
- Wheeler MJ. Automated immunoassay analysers. *Ann Clin Biochem* 2001; 38: 217-29.
- Widjaja A, Morris RJ, Levy JC, Frayn KN, Manley SE, Turner RC. Within- and between-subject variation in commonly measured anthropometric and biochemical variables. *Clin Chem* 1999; 45: 561-6.
- **Y**etley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, Bailey RL, Blackmore S, Bock JL, y cols. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011a; 94: 313S-321S.

- Yetley EA, Coates PM, Johnson CL. Overview of a roundtable on NHANES monitoring of biomarkers of folate and vitamin B-12 status: measurement procedure issues. *Am J Clin Nutr.* 2011b; 94: 297S-302S.
- **Z**hou XH, Obuchowski NA, McClish DK. *Statistical Methods in Diagnostic Medicine.* Second Edition. New York: Wiley & Sons, 2011.

8. Anexos

8.1. ANEXO I

DIAGNOSTICO DEL DÉFICIT DE VITAMINA B12 Y FOLATO. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y RECOMENDACIONES (OSAKIDETZA)



DIAGNOSTICO DEL DÉFICIT DE VITAMINA B12 Y FOLATO.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y RECOMENDACIONES.

Diciembre de 2015



EQUIPO DE TRABAJO:

- Carmen Mar Medina, coordinadora, Laboratorio, Hospital Galdakao-Usansolo
- Pedro Aranegi Lasuen Medicina Interna Hospital Universitario Donostia
- Jose Luis Balentziaga Muñoz, Médico de Familia, Centro de Salud Landako, Durango
- Ricardo San Vicente Blanco, Médico de Familia, Centro de Salud Zumarraga
- Jose Ramón Furundarena Salsamendi, Hematología Hospital Universitario Donostia
- José Asua Batarrita, Evaluación de Tecnologías Sanitarias, Osteba. Departamento de Salud, Gobierno Vasco
- Gustavo Cilla Eguiluz, Microbiología Hospital Universitario Donostia
- Miguel Sanchez Fernandez, Urgencias Hospital Galdakao-Usansolo
- Jose Luis Mirabel Gil, Laboratorio Hospital Universitario Araba

REVISORES EXTERNOS:

- Mikel Aldamiz-Echebarria San Sebastian. Medicina Interna, Hospital Universitario Araba.
- Juan Carlos García Moncó. Neurología, Hospital Galdakao-Usansolo
- Beatriz Arrizabalaga Amutxastegi. Hematología, Hospital Universitario Cruces.
- Juan Ignacio Arenas Ruiz Tapiador. Digestivo, Hospital Universitario Donostia.
- Pilar Sierra Polo. Endocrinología, Hospital Universitario Araba.

Versión Diciembre de 2015

Revisión prevista: diciembre 2018

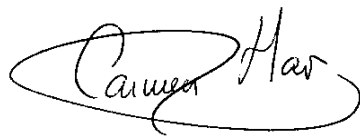
Galdakao, a 18 de enero de 2016

Como coordinadora del grupo de trabajo sobre gestión de la demanda, dentro del Plan Director de Laboratorios de Osakidetza, cuyo cometido es la elaboración de recomendaciones sobre el uso de pruebas analíticas,

Yo, Carmen Mar Medina, quiero reseñar que Iratxe Ajuria Morentin, ha colaborado en la revisión de la guía “Diagnostico del déficit de vitamina B12 y folato. Revisión bibliográfica y recomendaciones” con recomendaciones sobre el uso de pruebas analíticas dirigidas al diagnóstico del déficit de vitamina B12 y folato y publicada en la web de Osakidetza:

<https://www.osakidetza.eus/sites/Intranet/es/comunicacion/publicaciones/corporativas/Paginas/Gu%C3%ADas.aspx>

Atentamente,



Fdo: Carmen Mar Medina

Índice

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCIÓN	4
2. OBJETIVO	4
3. METODOLOGÍA	4
3.1. Búsqueda de la Evidencia:	5
3.2. Reuniones de trabajo y revisión externa:	5
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	6
5. RECOMENDACIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

En el año 2009 Osakidetza puso en marcha el Plan Director de Laboratorios. Posteriormente se creó un “Grupo de Trabajo para la Gestión de la Demanda”, que tiene como misión analizar los aspectos relacionados con las solicitudes de pruebas analíticas y las evidencias que las soportan y establecer recomendaciones para realizar una práctica clínica efectiva y eficiente.

Este equipo ha establecido un plan de trabajo por el que se abordan una a una las pruebas de laboratorio consideradas prioritarias de analizar. Este es el tercer documento de recomendaciones, tras los publicados en diciembre 2012 sobre “Utilización de las pruebas de función tiroidea en la práctica clínica” (<https://www.osakidetza.eus/sites/Intranet/es/referencia-documental/Documentos>) y sobre “Indicaciones para la determinación de niveles séricos de vitamina D” en enero del 2015. (<https://www.osakidetza.eus/sites/Intranet/es/referencia-documental/Documentos%20compartidos/RecomendacionesVitD.pdf>).

La utilización de las determinaciones de Vitamina B12 y Folato en suero ha experimentado un notable incremento en los últimos 5 años, habiéndose duplicado el número de pruebas informadas desde el 2009. Esto implica que a lo largo del 2014 se solicitaron en Osakidetza cerca de 600.000 determinaciones, suponiendo un gasto en reactivos aproximado de 700.000 €

2. OBJETIVO

Efectuar unas recomendaciones sobre las pruebas analíticas dirigidas al diagnóstico del déficit de vitamina B12 y folato basadas en una revisión exhaustiva de la literatura científica.

No se incluyen recomendaciones sobre el manejo clínico y el tratamiento aunque se han incorporado algunos comentarios relacionados por tener influencia en las peticiones de pruebas analíticas.

3. METODOLOGÍA

Una vez definido el objetivo de este proyecto, durante 2014, el equipo multidisciplinar estableció un reparto de tareas, de manera que se elaboró una propuesta de trabajo que fue discutida y posteriormente aprobada por el grupo. Se identificaron las frecuencias de demanda de estas pruebas

diagnósticas en Osakidetza y cuantificó su repercusión económica. Se definieron las áreas de incertidumbre estableciendo las preguntas PICO para cada una de las cuestiones y poder así perfeccionar las búsquedas bibliográficas.

3.1. Búsqueda de la Evidencia:

Se ha realizado una búsqueda en las bases bibliográficas UpToDate, Ovid MEDLINE y Cochrane Library empleando los términos "B12 deficiency", "Cobalamine deficiency" y "Folate deficiency". Se han filtrado los trabajos publicados entre Enero de 2000 y octubre de 2014 en lengua inglesa. Se han elegido aquellos trabajos publicados como guías, revisiones y actualizaciones. Se ha incluido alguna cita anterior al año 2000 por ser muy referenciada en los demás trabajos y alguna otra referencia rescatada desde los trabajos revisados. Se ha incluido algún trabajo canadiense en francés por su interés. Se han rechazado aquellos trabajos que no contemplaban el diagnóstico.

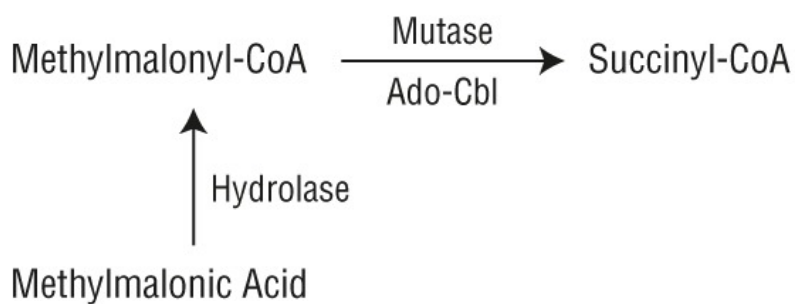
3.2. Reuniones de trabajo y revisión externa:

Se realizaron reuniones periódicas del grupo, con el fin de discutir y elaborar recomendaciones. Posteriormente el documento se sometió a revisión externa por pares, lo que permitió afinar aún más sus conclusiones y recomendaciones para la práctica clínica habitual.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

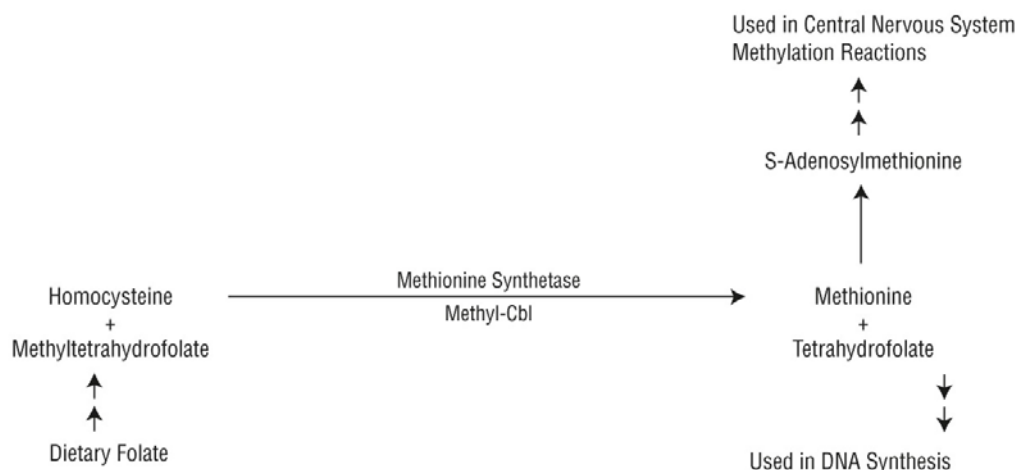
Reacciones metabólicas en las que participan la vitamina B12 y el folato

La cobalamina o vitamina B12 participa en dos reacciones metabólicas. Una es la conversión de metilmalonil-CoA a succinil-CoA donde la adenosil-cobalamina actúa de cofactor. Por ello un déficit de B12 conlleva un aumento de metilmalonil-CoA y de su producto de hidrólisis el ácido metilmalónico (ver figura extraída de la Ref 3).



La segunda reacción es la síntesis de metionina a partir de homocisteína gracias a la metionina sintetasa y a la metil-cobalamina como cofactor. En esta misma reacción el metiltetrahydrofolato es transformado a tetrahydrofolato que es necesario para la síntesis de DNA (ver figura extraída de la Ref 3). Un déficit de B12 o de folato producirá un aumento de homocisteína. A partir de la metionina se forma la S-Adenosinmetionina (SAM) que es muy importante para el sistema nervioso central donde participa en reacciones de metilación. Esto explica las manifestaciones neurológicas del déficit de B12. Aunque parece que el déficit de folato también debería afectar a la síntesis de SAM las complicaciones neurológicas son muy raras en el déficit de folato.

A diferencia del folato de la dieta el folato administrado en comprimidos es reducido directamente a tetrahydrofolato lo que explica que en pacientes con déficit de cobalamina pueda mejorar los parámetros hematológicos y persistir los problemas neurológicos.



Pruebas analíticas para diagnosticar un déficit de cobalamina o de folato

Recientemente en el año 2014 el BCSH (British Committee for Standards in Haematology) ha publicado una guía muy completa sobre diagnóstico y tratamiento del déficit de vitamina B12 y folato (4). En Canadá hay algunas guías publicadas (5,6,7,8). En una reciente revisión Stabler (9) ha referido que la Sociedad Americana de Hematología (ASH) no tiene ninguna guía para el diagnóstico y tratamiento del déficit de vitamina B12. La Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia (SEHH) tampoco dispone de ninguna.

La guía inglesa (4) en su introducción señala que en la mayoría de las situaciones las recomendaciones sobre el diagnóstico y el manejo de los déficit de vitamina B12 y de folato están basadas principalmente en el juicio clínico y el consenso más que en datos objetivos de laboratorio, no existiendo estudios randomizados controlados.

Volumen Corpuscular Medio (VCM) y morfología de sangre periférica

Un VCM normal no puede ser empleado para rechazar una determinación de nivel de cobalamina ya que hasta un 25 % de casos con manifestaciones neurológicas cursan con un VCM normal (4).

La identificación de neutrófilos hipersegmentados y de macrocitos ovales puede sugerir un déficit de cobalamina o folato pero no son hallazgos muy sensibles para un diagnóstico temprano y tampoco son específicos (4).

En una serie de pacientes con déficit de cobalamina sólo un 29 % tenían anemia y sólo un 36 % tenían un VCM > 100 fl (10).

Cobalamina sérica (nivel de B12)

Es el test diagnóstico rutinario inicial estándar (4,9,11,12). Cuantifica en un único valor la cobalamina sérica inactiva (unida a las transcobalaminas I y III y conocida como halohaptocorrina, que representa aproximadamente el 80 % de la cobalamina circulante) y la activa (unida a la transcobalamina II y conocida como holotranscobalamina, que representa el 20 % de la cobalamina circulante). Es un test ampliamente disponible, de bajo coste y automatizado. Sin embargo presenta algunas limitaciones:

- Existencia de varias técnicas y ausencia de un *gold standard* por lo que hay diferentes límites de referencia (10).
- Variación intraindividual muy alta (dos determinaciones en la misma persona pueden dar valores de cobalamina diferentes).
- Carece de la sensibilidad y especificidad requerida para un test diagnóstico robusto.
- Algunas técnicas pueden dar falsos resultados normales en presencia de niveles altos de anticuerpos anti-FI (2,8,11). Sería conveniente incluir muestras control con anticuerpos anti-FI para evitar errores de medición (13).
- Un déficit subclínico (niveles bajos de cobalamina y cambios bioquímicos moderados sin síntomas ni macrocitosis ni neutrófilos hipersegmentados) es un problema exasperante sobre todo en ancianos. El revisor de UpToDate (10) es partidario de iniciar tratamiento aunque los beneficios están poco claros.
- La mayoría de los autores citan tres niveles: uno con alta probabilidad de déficit, otro con baja probabilidad de déficit y una zona gris.
- Puede haber niveles bajos de cobalamina sérica sin déficit real de vitamina B12 en el embarazo, déficit de folato, déficit de transcobalamina I (con frecuencia de origen genético), toma de anticonceptivos orales, mieloma, anemia ferropénica e infección VIH (11,3,13,14,15).
- Puede haber niveles falsamente normales o altos de cobalamina en casos de elevación de transcobalamina I como en los síndromes mieloproliferativos crónicos, presencia de anticuerpos contra la transcobalamina II (a menudo tras tratamientos intramusculares con hidroxicobalamina), elevaciones moderadas en la insuficiencia renal, en la raza negra, en algunos polimorfismos genéticos, hepatopatía, déficit congénito de transcobalamina II, sobrecrecimiento bacteriano intestinal y administración previa de cobalamina (3,13,15).

Según la guía inglesa (4) se debe medir simultáneamente los niveles de cobalamina y de folato debido a su estrecha relación en el metabolismo (Grado 1A). Un nivel de cobalamina sérica inferior a 148 pmol/l (200 ng/l) u otro nivel derivado de unos intervalos de referencia locales debe ser usado como evidencia de un déficit de cobalamina en presencia de una alta sospecha clínica (Grado 2B).

La OMS publicó en 2008 (16) las conclusiones de un grupo técnico consultado sobre el déficit de cobalamina y folato. El grupo reconoció que no existen unos umbrales universalmente reconocidos para definir el déficit de ambas vitaminas y expresaron la necesidad de un consenso. El grupo consultado llegó a un consenso sobre los puntos de corte que había que utilizar cuando se hacen estudios del estado nutricional de poblaciones. Los puntos de corte están basados en el estudio US NHANES III (National health and nutrition examination survey) que utiliza la concentración de ambas vitaminas por debajo de la cual se elevan el nivel de ácido metilmalónico para la cobalamina y de homocisteína para el folato. El punto de corte que indicaría un déficit de cobalamina sería de 150 pmol/L (203 pg/mL).

Según la revisión de UpToDate (10) los resultados de nivel de cobalamina sérica pueden ser interpretados en general de la siguiente manera:

- > 300 pg/mL (> 221 pmol/L). Resultado normal. Déficit de cobalamina muy improbable (probabilidad del 1-5 %).
- Entre 200 y 300 pg/mL (entre 148 y 221 pmol/L). Resultado borderline. El déficit de cobalamina es posible.
- < 200 pg/mL (< 148 pmol/L). Resultado bajo compatible con déficit de cobalamina (especificidad del 95-100 %).

En una reciente revisión Stabler (9) ha referido que un nivel < 200 pg/ml (o límite inferior establecido por cada laboratorio) tiene una sensibilidad del 65-95 % para detectar un déficit clínico comprobado y de un 50 % para nivel elevado de ácido metilmalónico. La especificidad es del 50-60 % en cuanto a respuesta clínica y del 80 % para niveles elevados de ácido metilmalónico.

Remacha y cols en una ponencia del congreso español de Hematología del 2013 (11) expusieron que un resultado < 150 pmol/L no significa necesariamente que exista un déficit de B12. Por otro lado por encima del umbral mínimo teórico de los valores de referencia existe una zona gris entre 150 y 200-250 pmol/L en la que puede existir un déficit de esta vitamina en aproximadamente el 25-50 % de los casos sobre todo en ancianos, pacientes con problemas tromboembólicos o pacientes neuropsiquiátricos (demencia).

Hvas y Nexø (12) en su revisión recomendaron la siguiente estrategia:

- Un nivel de cobalamina sérica < 125 pmol/L para un límite de referencia mínimo de 156 pmol/L (25 % menor que el límite bajo normal de referencia dado por el fabricante) confirmaría un déficit de vitamina B12.
- Un nivel de cobalamina sérica > 250 pmol/L descarta el déficit de B12.
- Un nivel de cobalamina sérica entre 125 y 250 pmol/L sería la zona gris.

La asociación de médicos de Columbia Británica en Canadá (8) comenta las limitaciones de la medición de cobalamina sérica por lo que su resultado debe ser interpretado siempre junto a los datos clínicos. Aconsejaron efectuar esta interpretación:

Nivel cobalamina sérica (pmol/L)	Probabilidad de déficit sintomático
< 75	Alta
15-150	Moderada
150-220	Baja
> 220	Raro

Un panel de expertos de Ontario en Canadá realizó una revisión de la literatura publicada entre los años 2000 y 2012 sobre las pruebas diagnósticas de déficit de vitamina B12 (17). Identifican tres guías: dos están publicadas en revistas médicas (18,19) con una revisión sistemática de la literatura describiendo la metodología y dando unas recomendaciones y otra revisión que no está basada en una revisión sistemática de la literatura (8). Observaron que el test de vitamina B12 sérica tiene una baja precisión diagnóstica. Las tres guías que revisan el diagnóstico de déficit de B12 revelan una evidencia muy limitada que soporte las recomendaciones.

Willis y un panel de expertos de Australia (20) realizaron una revisión sistemática de la literatura publicada entre 1990 y 2009 y posteriormente un meta-análisis para comprobar el rendimiento diagnóstico de la medición de cobalamina sérica en pacientes que se pueden beneficiar de un tratamiento con B12. Identificaron 2.878 estudios de los que incluyen 54. La calidad metodológica en la mayoría no fue buena.

Según estos autores la sensibilidad del test de cobalamina sérica es baja cuando se le compara con la medición de ácido metilmalónico como método de referencia: 0.52 (0.39-0.65) y la especificidad es alta: 0.81 (0.70-0.89). Las cifras son similares cuando se le compara con el nivel de homocisteína como método de referencia con una sensibilidad de 0.40 (0.27-0.54) y una especificidad de 0.84 (0.73-0.90).

Los métodos de medición de cobalamina sérica varían entre los diferentes estudios pero en todos se confirmaron similares resultados de sensibilidad y especificidad.

Por último aplicando el criterio de respuesta clínica los resultados son similares a los obtenidos cuando se utilizaron los métodos de referencia ya citados.

Snow (3) en su guía sobre diagnóstico de déficit de vitamina B12 y folato refirieron que el límite inferior normal de cobalamina sérica es variable según la técnica utilizada, siendo generalmente usada la cifra de 148 pmol/L (200 pg/mL). La sensibilidad y especificidad del test para diagnosticar un déficit de

vitamina B12 varían mucho entre las publicaciones debido a que no hay un gold standard para el diagnóstico y a los diferentes diseños de los estudios.

Andrés y cols (19) realizaron una revisión basada en artículos publicados entre 1990 y 2003 sobre déficit de cobalamina especialmente en ancianos. Basándose en una publicación y en un trabajo propio utilizaron como definición de déficit de vitamina B12 en ancianos los siguientes criterios:

- Niveles de cobalamina sérica < 150 pmol/L en dos ocasiones separadas.
- Nivel de cobalamina sérica < 150 pmol/mL en una ocasión y niveles elevados de homocisteína (> 13 μ mol/L) o ácido metilmalónico (> 0.4 μ mol/L) en ausencia de déficit de fólico, vitamina B6 o insuficiencia renal.

En las publicaciones del Ministerio de Sanidad español hay un trabajo de J. Bilbao (21) revisando el déficit de vitamina B12, folatos y otras anemias carenciales. Dicho autor refiere como criterios diagnósticos de déficit de B12 los utilizados por Andrés (19).

Carmel en su revisión (13) refirió que en los déficits clínicos se ha demostrado que un nivel < 148 pmol/L (< 200 ng/L) tiene una sensibilidad diagnóstica del 95 % en las anemias megaloblásticas (90 % en un trabajo que tenía como criterio diagnóstico un descenso del 50 % en el nivel de AMM tras el tto). Sin embargo la sensibilidad para diagnosticar un déficit subclínico con ese cut-off fue del 38-39 % utilizando como criterio una elevación del AMM o de la homocisteína. El valor predictivo positivo fue del 58-78 %, si bien la especificidad no ha sido bien establecida ya que el *gold standard* siempre es un parámetro bioquímico y todos ellos tienen limitaciones.

Folato sérico

Es el test diagnóstico rutinario inicial estándar. Es un test ampliamente disponible, de bajo coste y automatizado. Sus principales ventajas y desventajas se resumen en los siguientes puntos:

- El nivel de folato sérico refleja el estatus y aporte recientes de folato (3,4,10,22). Unos días de hospitalización con una dieta normal o una transfusión pueden normalizar los niveles. Unos días con aportes pobres de folato pueden hacer descender el nivel de folato sérico con unos depósitos normales.
- No hay un consenso claro sobre el nivel de folato que indica déficit.
- Una muestra hemolizada libera el folato intraeritrocitario y puede elevar los niveles de folato sérico (3).

Según la guía inglesa (4) de forma convencional los clínicos utilizan un umbral de 7 nmol/l (3 µg/l) ya que por debajo de este nivel aumenta mucho el riesgo de anemia megaloblástica (grado 1B). Sin embargo hay una zona indeterminada que se sitúa aproximadamente entre 7 y 10 nmol/l (3 y 4.5 µg/l). Por tanto un nivel bajo de folato sérico debe considerarse como sugestivo de déficit más que como un test diagnóstico muy sensible.

En un trabajo que la OMS publica en 2008 (16) el punto de corte que indicaría un déficit de folato sería de 10 nmol/L (4 ng/mL).

SL Schrier ha referido en UpToDate (10) que con frecuencia coexiste un déficit de folato y de cobalamina por lo que conviene medir ambos niveles. Este documento recoge una referencia que sugiere utilizar el folato sérico como test de screening inicial y según el resultado:

- Si el nivel es > 4 ng/ml (9.1 nanomol/L) se descarta el déficit de folato.
- Si el nivel es < 2 ng/ml (4.5 nanomol/L) en ausencia de anorexia o ayuno reciente es diagnóstico de déficit de folato.

J. Bilbao (21) en su revisión señaló que la mejor manera de demostrar un déficit de folato es demostrar niveles de folato sérico < 4 ng/mL.

Snow (3) en su guía sobre diagnóstico de déficit de B12 y folato cita que los valores de referencia del folato sérico varían dependiendo de factores técnicos pero en general el límite inferior utilizado es de 6.8 nmol/L (3 ng/mL).

¿Cuándo se recomienda solicitar un test analítico de vitamina B12 o de folato sérico?

Hvas y Nexø (12) han referido que hay que sospechar un posible déficit de vitamina B12 en pacientes con anemia inexplicada, síntomas neuropsiquiátricos inexplicados y/o manifestaciones gastrointestinales como lengua dolorida, anorexia y diarrea. Hay que poner mayor atención en pacientes con mayor riesgo como ancianos debido a que presentan una incidencia más elevada de gastritis atrófica, así como en vegetarianos, veganos, pacientes con problemas intestinales o, enfermedades autoinmunes como Graves, tiroiditis y vitíligo, y tomadores de medicaciones como inhibidores de la bomba de protones, antagonistas del receptor de la histamina y biguanidas (metformina) durante largos periodos.

Los autores no son partidarios de efectuar cribado de déficit de vitamina B12 para la detección de casos subclínicos ya que los test diagnósticos no son lo suficientemente específicos lo que podría conllevar un sobrediagnóstico a gran escala cuando en realidad un déficit subclínico de vitamina B12 no es un problema clínico severo y el beneficio del tratamiento en dichos pacientes es cuestionable.

El Instituto canadiense INESSS ha publicado recientemente (5) unas recomendaciones revisadas por un Comité de expertos sobre el uso racional de 14 parámetros analíticos entre los cuales se encuentra la vitamina B12. El Comité de expertos ha efectuado las siguientes recomendaciones (no tienen grados de evidencia) sobre las indicaciones para hacer peticiones de niveles de vitamina B12:

- Anemia macrocítica, macrocitosis aislada o pancitopenia.
- Presencia de síntomas neurológicos inexplicados como parestesias, entumecimiento, déficit de coordinación motriz, problemas de memoria o cognitivos y cambios de personalidad.
- Personas de edad que padecen una enfermedad autoinmune que reciben metotrexate en asociación con suplementos de ácido fólico.

En cambio la medición del nivel de vitamina B12 no está indicada en personas asintomáticas, sin factores de riesgo de déficit de B12 o en los que están recibiendo suplementos de B12.

La Asociación de médicos de Columbia Británica en Canadá (8) ha efectuado unas indicaciones muy similares. Además refiere que habrá que considerar hacer una determinación en ancianos (> 75 años), pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino delgado, resección de estómago o de intestino delgado, personas que siguen dieta vegetariana o sin carne ni pollo, así como personas con uso prolongado de medicamentos inhibidores de receptores H2, inhibidores de la bomba de protones o metformina. En pacientes con déficit no nutricional de vitamina B12 aconsejan un control analítico anual de cobalamina sérica.

Smellie et al (18) han publicado unas recomendaciones de expertos de varias especialidades de laboratorio sobre varias pruebas de laboratorio incluyendo la vitamina B12 y el folato.

Estos autores refirieron que hay indicación para medir niveles de cobalamina y folato en pacientes con anemia macrocítica, macrocitosis aislada > 110 fL y síntomas neuropsiquiátricos. Si coexisten talasemia o ferropenia la macrocitosis puede quedar enmascarada. Los síntomas neuropsiquiátricos pueden cursar sin anemia ni macrocitosis y en ese caso se solicitará medición de cobalamina pero no de folato.

También señalaron que algunos pacientes con déficit de vitamina B12, folato o hierro pueden desarrollar úlceras orales severas sin cambios en el hemograma. En personas que están recibiendo tratamiento únicamente se medirán niveles en caso de sospecha de incumplimiento del tratamiento o recurrencia de la anemia.

La guía inglesa también refiere que no hace falta medir niveles durante el tratamiento con vitamina B12 (4).

Un panel de expertos de Ontario en Canadá hizo una revisión de la literatura publicada entre los años 2000 y 2012 sobre las pruebas diagnósticas de déficit de B12 (17). Los pacientes con síntomas o signos de anemia por déficit de B12 (anemia macrocítica) deben ser estudiados con un test de B12 sérica. No está claro si otras subpoblaciones deben ser testadas (por ejemplo pacientes con anomalías neuropsiquiátricas). No está claro con qué frecuencia hay que medir niveles a los pacientes.

En la revisión de Andrés et al (19) sobre déficit de vitamina B12 en ancianos defienden que hay que medir niveles de B12 en todas las personas mayores de 65 años malnutridos, en todas las personas ingresadas en instituciones y hospitales psiquiátricos y en personas con manifestaciones hematológicas o neuropsiquiátricas sugestivas de déficit de B12.

Hunt (14) en su revisión aconseja solicitar estudio analítico de posible déficit de cobalamina en las siguientes situaciones: anemia, macrocitosis > 100 fl, síntomas clínicos de déficit de B12, enfermedad gastrointestinal conocida que se asocia a déficit de B12 y en veganos.

Pacientes en tratamiento con metformina

La metformina se usa en el tto de la diabetes de tipo II y puede asociarse a niveles disminuidos de cobalamina sérica. La toma de este medicamento disminuye la absorción de cobalamina por mecanismos no bien conocidos. Según la guía inglesa (3) no se puede establecer definitivamente la periodicidad con la que se deben determinar niveles de cobalamina sérica en pacientes en tratamiento con metformina pero se recomienda solicitar niveles cuando haya alta sospecha clínica de déficit (Grado 2B).

Pacientes en tratamiento hormonal sustitutivo y toma de anticonceptivos orales

En un estudio transversal se ha visto que los anticonceptivos orales pueden producir un descenso de cobalamina y holotranscobalamina séricas pero sin alterar los indicadores bioquímicos de alteración del metabolismo de la cobalamina como el ácido metilmalónico y la homocisteína (4). Se sugiere solicitar niveles de cobalamina únicamente en caso de alta sospecha clínica de déficit teniendo en cuenta el reto que supone interpretar los resultados (4).

Embarazo

Durante el tercer trimestre del embarazo se produce un descenso del 30 % en los niveles de cobalamina.

Según la guía inglesa (4) si durante el embarazo tenemos una alta sospecha de déficit debemos administrar un tratamiento breve empírico con hidroxicobalamina oral dejando el estudio completo para después del parto (Grado 2C). Durante el embarazo la holotranscobalamina es más fiable que la cobalamina para determinar si hay déficit y se recomienda como test de elección si se encuentra disponible (Grado 1B).

Vegetarianos

Según la guía inglesa (4) los vegetarianos, particularmente los veganos estrictos, se deben considerar para monitorizar niveles de cobalamina junto a una valoración clínica (Grado 2C). Se deben considerar suplementos orales principalmente en el embarazo y la lactancia (4,10).

Malabsorción debido a cirugía gástrica

La prevalencia de déficit de cobalamina es alta en pacientes sometidos a cirugía gástrica. Según la guía inglesa (4) los pacientes sometidos a cirugía bariátrica deben ser monitorizados en cuanto a niveles de cobalamina sérica y probablemente necesitarán suplementos de cobalamina por una vía de administración que dependerá del tipo de cirugía (Grado 1B). En la revisión de UpToDate (10) recomiendan suplementos con altas dosis diarias de cianocobalamina oral en pacientes sometidos a cirugía gástrica.

Malabsorción debido a enfermedad gástrica o afectación pancreática

Hay un grupo de alteraciones conocidas como malabsorción de la vitamina B12 unida a los alimentos (*food-bound cobalamin malabsorption*) que se caracterizan por hipoclorhidria gástrica debida a atrofia gástrica en relación a la edad o debido a la toma de medicamentos inhibidores de la bomba de protones o inhibidores de receptores H2. En estos casos la cobalamina no puede separarse de las proteínas del alimento y por tanto no puede unirse al factor intrínseco. Se asocia a un 30-40 % de casos de déficit subclínico de cobalamina. La guía inglesa (4) dice que los pacientes con malabsorción de la vitamina B12 unida a los alimentos pueden beneficiarse de suplementos orales de cobalamina a bajas dosis (Grado 2C).

Una enfermedad pancreática que afecte a su función exocrina impedirá que la cobalamina se libere de la haptocorrina en el duodeno pudiendo producir déficit de cobalamina. Esta situación es bastante rara y no se pueden dar recomendaciones concretas.

Infancia

Un déficit verdadero de cobalamina con problemas clínicos significativos es raro en la infancia en los países desarrollados y los datos sobre su prevalencia

son muy limitados. Niveles bajos de cobalamina sérica en la infancia en presencia de síntomas clínicos deben ser tratados de forma temprana para prevenir secuelas neurológicas (Grado 1A).

En caso de sospecha clínica de déficit de cobalamina aún en presencia de un nivel normal de cobalamina sérica la guía inglesa (4) recomienda solicitar pruebas analíticas de bioquímica como la homocisteína y el ácido metilmalónico (grado 1B). El papel de la holotranscobalamina en este contexto no está definido. Estudios adicionales para descartar anomalías genéticas deben ser referidos a centros de referencia.

Datos bioquímicos de déficit de cobalamina serían relativamente comunes en niños con lactancia exclusivamente materna. Sin embargo se desconoce el significado clínico y no se conoce si es necesario algún tipo de suplemento (4).

Se han comunicado algunos casos raros de defectos hereditarios de absorción y de incorporación celular de cobalamina que pueden producir déficit de cobalamina.

Exposición al óxido nitroso

En la revisión de UpToDate (10) se refiere que el óxido nitroso inactiva a la cobalamina y su uso como anestésico puede precipitar un deterioro neuropsiquiátrico en pacientes con déficit de cobalamina. Por ello aconsejan medir niveles séricos de cobalamina antes de usar este anestésico.

Déficit subclínico

Remacha y col (11) definieron a este grupo como aquellos pacientes que no presentan sintomatología típica del déficit clínico de vitamina B12 pero el estudio de laboratorio demuestra la presencia de déficit.

Hasta un 5-15 % de las personas mayores tiene un nivel de cobalamina sérica baja o en la zona gris (entre 150 y 200 pmol/L) y en esa misma franja de edad la anemia perniciosa supone un 2 %. Muchos serán casos de déficit subclínico (hasta la mitad de los casos presentan malabsorción de la vitamina B12 unida a los alimentos, otros tomarán medicamentos como la metformina u omeprazol, *Helicobacter pylori*, etc.). Es esencial hacer un estudio de los metabolitos para diferenciar si se trata de un déficit subclínico o de una cobalamina sérica baja o borderline sin déficit real. Un problema añadido es que muchas personas mayores tienen insuficiencia renal que eleva tanto la homocisteína como el ácido metilmalónico, aunque en menor medida. Probablemente el uso de diferentes puntos de corte diagnósticos en caso de insuficiencia renal podría solventar en parte este problema.

Carmel en su revisión (13) ha referido que cada vez se diagnostican más pacientes asintomáticos con cambios bioquímicos y ello nos plantea importantes interrogantes: ¿dichos pacientes deben ser tratados, monitorizados o ignorados? ¿sí son tratados con qué dosis, durante cuánto

tiempo y con qué objetivo final?. El uso de cobalamina oral sin un diagnóstico preciso confunde tanto a los médicos como a los pacientes. La pérdida de las pruebas diagnósticas de absorción de la cobalamina ha contribuido a este escenario.

En la mayoría de los casos con déficit subclínico de cobalamina la absorción de dicha vitamina es normal. En aproximadamente el 30-50 % de los casos hay malabsorción moderada limitada a la vitamina B12 unida a los alimentos que ocasionalmente responde a un tratamiento antibiótico. El tiempo de latencia del déficit subclínico suele ser muy largo y puede evolucionar a la normalización espontánea o a un déficit clínico.

Solomon en su revisión (15) refirió que el déficit subclínico es prevalente en ancianos y se ha asociado a malabsorción de la cobalamina unida a los alimentos. Su significado clínico y pronóstico son inciertos. En algunos estudios no controlados algunos pacientes han mejorado con el tratamiento con vitamina B12 pero otros no. Sin embargo otros estudios sugieren que esta alteración no suele progresar y que el tratamiento no aporta ningún beneficio.

Enfermedad tromboembólica

Remacha y cols (9) refirieron que entre un 20 y un 25 % de los pacientes con enfermedad tromboembólica (ETE) presentan niveles elevados de homocisteína. Se han tratado miles de estos pacientes con dosis altas de vitamina B12 oral y no parece haber disminuido la incidencia de ETE aunque en recientes metaanálisis parece observarse cierto efecto protector sobre el accidente vascular cerebral.

Se han publicado estudios retrospectivos y prospectivos que demuestran una relación entre ETE y déficit de vitamina B12.

Queda por determinar cuál es realmente su posible papel en la ETE pues dada la prevalencia del déficit de vitamina B12 en la ETE se precisaría un número muy elevado de casos para demostrar su efecto protector.

En cuanto a la anemia por déficit de folato las causas más frecuentes son la dieta pobre, el alcoholismo severo y algunas enfermedades gastrointestinales (puede ser la forma de presentación de una enfermedad celiaca).

Durante el embarazo y la lactancia aumentan las necesidades maternas de folato. Teniendo en cuenta que a las embarazadas se les dan suplementos de folato no hace falta pedir niveles de folato sérico excepto en circunstancias especiales como dieta pobre, sospecha de malabsorción, hiperemesis o presencia de anemia macrocítica.

También aumentan las necesidades de folato en las anemias hemolíticas crónicas.

En las hemodiálisis se medirá el nivel de folato sérico previo a su realización.

Se pueden detectar niveles bajos de folato sérico en pacientes tomadores crónicos de medicación anticonvulsivante y en pacientes homocigotos para un

polimorfismo del gen *MTHFR* (HGNC:7436) que codifica el enzima 5,10-metilenetetrahidrofolato reductasa que participa en el metabolismo del folato.

Según la guía inglesa (4) los niveles de folato sérico generalmente se miden en situaciones clínicas similares a los de déficit de cobalamina (Grado 1A).

El Instituto canadiense INESSS en la publicación que hemos citado previamente (5) da las siguientes recomendaciones sobre las peticiones de ácido fólico:

- La medición de ácido fólico está indicada para la evaluación de una anemia macrocítica, de una macrocitosis aislada, de una pancitopenia o cuando la información clínica sugiere un déficit de folato. También está indicado en los casos de síndrome de malabsorción (enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn), malnutrición grave, alcoholismo y pacientes en tratamiento con ciertos medicamentos (trimetoprim, salazopirina).
- La medición de ácido fólico no está indicada en personas asintomáticas o con hemograma normal o en aquellos que están recibiendo suplementos de ácido fólico.

Pruebas de confirmación en caso de resultados dudosos o inesperados en el nivel de cobalamina sérica o de folato sérico

Homocisteína plasmática total

Las principales características de esta prueba son las siguientes:

- Es un test sensible ya que aumenta de forma temprana en caso de déficit de cobalamina y de folato (ver esquema de reacciones metabólicas).
- Es un test poco específico ya que su nivel se eleva también en otras situaciones (3,4,9,12,13,22): déficit de folato, déficit de vitamina B6 (piridoxina), insuficiencia renal, hipotiroidismo, hipovolemia, toma de medicaciones (isoniazida), psoriasis y alteraciones metabólicas congénitas.
- El manejo preanalítico de la muestra es clave para este test ya que la muestra debe mantenerse en frío y debe centrifugarse separando el plasma de los eritrocitos antes de las 2 horas de la extracción (4,13,14).

En la revisión de UpToDate (10) se refiere que las determinaciones de homocisteína y de ácido metilmalónico estarían indicados en casos de alta sospecha de déficit de cobalamina y/o folato y resultados borderline de niveles de cobalamina y/o folato séricos y también en caso de síntomas neurológicos o macrocitosis inexplicadas.

La revisión cita un estudio (23) de 434 episodios con déficit documentado de cobalamina en los que el nivel de homocisteína y de ácido metilmalónico estaba elevado en el 96 % y 98 % respectivamente. En el mismo estudio se recogen datos de 123 episodios de déficit de folato de los cuales un 91 % presentaba nivel elevado de homocisteína y sólo un 12 % nivel elevado de ácido metilmalónico, en todos ellos excepto en un caso, debido a insuficiencia renal.

Los niveles elevados de homocisteína y de ácido metilmalónico se normalizan tras el tratamiento lo que puede ser una evidencia más que demuestre el déficit de vitamina.

En una reciente revisión de 2013 de Stabler (9) se indica que los niveles de homocisteína total se encuentran muy elevados (nivel > 21 $\mu\text{mol/L}$) en el 96 % de pacientes con déficit clínico de vitamina B12 incluyendo a los pacientes con síntomas neurológicos pero sin anemia.

Hasta un 50 % de los pacientes con niveles bajos de cobalamina sérica sin respuesta hematológica ni neurológica al tratamiento con vitamina B12 presentan niveles normales de estos dos metabolitos indicando que el nivel bajo de cobalamina sérica es un falso negativo.

Teniendo en cuenta las limitaciones de la medición de cobalamina sérica en los pacientes con sospecha clínica de déficit de vitamina B12 puede estar justificado medir niveles de homocisteína total y de ácido metilmalónico o de administrar tratamiento empírico estableciendo unos claros parámetros para medir la respuesta clínica.

Según la guía inglesa (4) se puede medir la homocisteína plasmática para confirmar un déficit de folato sólo en circunstancias especiales; un nivel superior a 15 $\mu\text{mol/l}$ puede ser indicativo de un déficit de folato pero siempre se deben tener en cuenta los niveles de referencia locales (Grado 2B).

Ácido metilmalónico plasmático

Las principales características de esta prueba son las siguientes:

- Es un test de alto coste y complejo (espectrometría de masas y cromatografía de gases) y está disponible sólo en muy pocos laboratorios (4,11).
- Su nivel se eleva en el déficit de cobalamina (ver esquema de reacciones metabólicas) pero también puede elevarse en personas con insuficiencia renal, sobrecrecimiento bacteriano intestinal, edad > 65 años, en caso de hemoconcentración y alteraciones metabólicas congénitas. Puede disminuir por la toma de antibióticos que reduzcan la flora intestinal (3,4,9,13).

Según la guía inglesa (4) la determinación de homocisteína plasmática total y/o de ácido metilmalónico plasmático (AMM), dependiendo de su

accesibilidad, pueden considerarse como pruebas analíticas suplementarias para saber si hay déficit de cobalamina sérica en casos de sospecha clínica y un nivel indeterminado de cobalamina sérica (Grado 2B). Aunque la homocisteína es un marcador sensible el ácido metilmalónico es más específico.

En la revisión de Stabler del 2013 (9) se dice que los niveles de AMM se encuentran muy elevados (> 400 nmol/L) en el 98 % de los pacientes con déficit clínico de vitamina B12 incluyendo a los pacientes con síntomas neurológicos pero sin anemia. Casi todos los pacientes tienen niveles de ácido metilmalónico > 500 nmol/L y un 86 % niveles > 1.000 nmol/L. Es una elevación razonablemente específica aunque puede haber aumentos moderados con valores entre 300 y 700 nmol/L en la insuficiencia renal.

Hvas y Nexø (12) recomiendan medir el nivel de AMM cuando el nivel de cobalamina sérica está en la zona gris entre 125 y 250 pmol/L. Los valores de referencia para el AMM son de 0.08-0.28 $\mu\text{mol/L}$. Según su resultado tendríamos:

- < 0.29 $\mu\text{mol/L}$. Se descarta déficit de vitamina B12.
- > 0.75 $\mu\text{mol/L}$. Se confirma déficit de vitamina B12.
- Entre 0.29 y 0.75 $\mu\text{mol/L}$. Zona gris.

En la guía publicada por Snow (3) se hace referencia a la posible utilidad del ácido metilmalónico y de la homocisteína para confirmar el diagnóstico de un déficit de vitamina B12 o de folato. Sus valores de referencia son variables dependiendo de cada laboratorio.

Esta guía hace referencia a un trabajo de Savage et al (23) sobre pacientes con déficit de cobalamina con alteraciones hematológicas en el que la sensibilidad diagnóstica de un nivel elevado de AMM y de homocisteína (3 DS por encima de la media) fue del 98 % y 96 %. Hubo unos pocos casos en los cuales se elevaba sólo uno de los dos parámetros.

La sensibilidad diagnóstica de estas pruebas analíticas en caso de déficit moderado de vitamina B12 no se conoce bien. Es muy probable que su nivel se eleve antes de que aparezcan las alteraciones hematológicas y el descenso de la cobalamina sérica. En cuanto a la especificidad de estas pruebas analíticas es difícil hacer una estimación.

Carmel en su revisión (13) ha referido que una elevación del nivel de AMM tendría una sensibilidad del 95 % para el diagnóstico de déficit de B12 en casos de anemia perniciosa. El nivel aumentaría mucho, habitualmente hasta miles de nmol/L. Sin embargo en estas situaciones sería una técnica que superaría poco al test de cobalamina sérica. En el déficit subclínico el nivel de AMM raramente superaría los 800 nmol/L y al igual que todos los biomarcadores tendría una sensibilidad diagnóstica menor.

Carmel refiere asimismo que en los estudios de investigación el diagnóstico de déficit de vitamina B12 debería estar basado en la combinación de dos pruebas analíticas con diferentes limitaciones y que se complementen. La mejor combinación sería la medición de cobalamina sérica y de AMM siendo diagnóstico únicamente en los casos en que el nivel de ambos parámetros estuviera alterado.

Holotranscobalamina

Las principales características de esta prueba son las siguientes:

- Es una medida de la fracción activa de la cobalamina sérica. No necesita preparación preanalítica.
- Hacen falta más estudios para determinar la utilidad clínica de la holotranscobalamina en la detección de un déficit de cobalamina (4,9,11,12,14,22).
- Se puede elevar según polimorfismos genéticos comunes, insuficiencia renal y hepatopatía lo que limita de forma considerable su utilidad (20). Se ha sugerido que pueden influir en los niveles la toma de anticonceptivos orales, mielodisplasia y otras patologías hematológicas, patología de los histiocitos, trastornos del folato y el alcoholismo (13).

Según la guía inglesa (4) esta prueba presenta una zona gris más pequeña y una mayor sensibilidad y especificidad que la cobalamina sérica. Los valores de normalidad en individuos sanos serían de 35-171 pmol/l variando según diferentes estudios los niveles inferiores entre 19 y 42 pmol/l y los niveles superiores entre 134 y 157 pmol/l. Puede servir para reducir los casos con resultados indeterminados sobre todo en personas con más de 65 años. También puede usarse en el embarazo o en las mujeres que toman anticonceptivos orales ya que no presenta el descenso fisiológico habitual de la cobalamina.

Según esta guía (4) parece un candidato firme para ser la determinación de primera elección en el estudio del déficit de cobalamina en el futuro, sobre todo si los costes disminuyen.

En una revisión de Stabler del 2013 (9) se refiere que esta medición ha supuesto una mejora en la especificidad con respecto a la medición de cobalamina sérica.

Para Hvas y Nexø (12) la holotranscobalamina ha demostrado en algunos trabajos ser un marcador temprano de déficit de B12 pero hacen falta más estudios para saber lo que realmente puede aportar de valor añadido a las pruebas analíticas previas.

Willis y un panel de expertos de Australia (20) en su revisión sistemática con respecto a la holotranscobalamina refirieron que aunque hay algún estudio con un gran número de pacientes en el que la holotranscobalamina se mostró más eficaz que la cobalamina sérica para diagnosticar déficit de vitamina B12 (área bajo la curva de 0.85 y 0.76 respectivamente) hay que tener en cuenta sus limitaciones.

Carmel en su revisión (13) ha señalado que es un parámetro cuya valoración clínica aún es limitada. Cuando se le compara con el nivel de cobalamina sérica el área bajo la curva es ligeramente mejor para la holotranscobalamina. En cuanto a la especificidad el resultado cuando se le compara con el AMM es poco claro.

Folato eritrocitario

Es un indicador del estado del folato tisular durante un plazo más largo teniendo en cuenta la vida media de los eritrocitos.

Un nivel de folato eritrocitario menor a 340 nmol/l (150 µg/l) se considera indicativo de un déficit clínico de folato. En una revisión se concluye que el nivel de folato sérico nos da una información similar. Se ha sugerido que medir el folato eritrocitario puede ser útil en aproximadamente un 5 % de pacientes con macrocitosis y folato sérico normal.

Las técnicas actuales pueden verse afectadas por variables preanalíticas y analíticas por lo que no es una medición robusta (3,4).

La guía inglesa (4) refiere que no es necesario medir de rutina el folato eritrocitario ya que el folato sérico es suficiente en la mayoría de los casos (Grado 1A). En caso de alta sospecha clínica de déficit de folato a pesar de tener un nivel de folato sérico normal, se puede solicitar un nivel de folato eritrocitario siempre que se haya descartado un déficit de cobalamina (Grado 2B).

Según UpToDate (10) la medición de folato eritrocitario se reservaría para pacientes con valores borderline de folato sérico (entre 2 y 4 ng/mL), pacientes con sospecha de déficit combinado de cobalamina y de folato y pacientes con difícil interpretación del resultado (comida hospitalaria reciente o anorexia reciente).

Pruebas diagnósticas para determinar la etiología del déficit de cobalamina

Anticuerpos anti-factor intrínseco (anti-FI)

Su resultado es positivo en el 40-60 % de las anemias perniciosas (2,8) y se obtiene un 1-2 % de falsos positivos. Por tanto es un test con baja sensibilidad y alta especificidad para el diagnóstico de la anemia perniciosa.

Según la guía inglesa (4) en todos los pacientes con anemia, neuropatía o glositis y sospecha de anemia perniciosa debe hacerse un estudio de anti-FI independientemente del nivel de cobalamina (2). En los pacientes en los cuales se detecta un nivel bajo de cobalamina sérica en ausencia de anemia y que no presentan malabsorción u otras causas de déficit debe hacerse el estudio de anti-FI para aclarar si hay una anemia perniciosa precoz/latente (Grado 2A).

Títulos altos de anti-FI pueden dar falsos niveles normales de cobalamina. Si hay alta sospecha clínica de déficit de cobalamina se podría solicitar estudio de anti-FI.

Anticuerpos anti-células parietales gástricas

Son positivos en el 80 % de los pacientes con anemia perniciosa pero también son positivos en el 10 % de las personas sin esta patología. Por ello la guía inglesa (3) no aconseja el estudio de anticuerpos anti-células parietales gástricas para el diagnóstico de anemia perniciosa (Grado 1A).

Según la revisión de Uptodate (10) la sensibilidad de este test es mayor que la de anticuerpos anti-FI pero la especificidad es baja por lo que su utilidad es muy cuestionada.

Wickramasinghe (22) refiere que los anticuerpos anti-células parietales gástricas son positivos en el 50-90 % de los casos de los pacientes con anemia perniciosa pero también en un 16 % de las personas de más de 60 años y en mayores porcentajes en algunos grupos de pacientes con otras patologías. Por ello cree que esta prueba analítica no ayuda a establecer la causa de la anemia perniciosa.

Otros

Ya no se dispone del test de Schilling en el Reino Unido (4) ni en EEUU (10) ni en muchos países. Tampoco se dispone de él en la Comunidad Autónoma del País Vasco.

Según la guía inglesa (4) en pacientes con anemia perniciosa que desarrollan también una anemia ferropénica (indicativa de gastritis crónica atrófica) se debe hacer una endoscopia debido a que presentan un riesgo aumentado de carcinoma gástrico pero no se recomiendan las endoscopias como vigilancia.

Según la revisión de UpToDate (10) niveles elevados de gastrina sérica, niveles bajos de pepsinógeno I y un ratio disminuido de pepsinógeno I versus pepsinógeno II tienen una sensibilidad del 90-92 % para el diagnóstico de anemia perniciosa pero con una baja especificidad. Podrían tener indicación para el diagnóstico de anemia perniciosa en los casos con anticuerpos anti-FI negativos.

Para Hvas y Nexo (12) una vez diagnosticado el déficit de vitamina B12 no hacen falta más pruebas analíticas en caso de que por la historia clínica la causa sea por una dieta vegetariana o por una resección gástrica o ileal. Tampoco les parece que haya que hacer más pruebas analíticas en ancianos en los que por los datos clínicos y las pruebas analíticas de laboratorio de primera línea se haya demostrado un déficit obvio de vitamina B12.

En el resto de pacientes consideran importante hacer más pruebas analíticas para llegar a saber la causa del déficit de B12 especialmente anticuerpos anti-FI que pueden ser positivos hasta en el 70 % de los pacientes con anemia perniciosa.

El pepsinógeno y la gastrina aumentan en la atrofia gástrica pero son pruebas analíticas con baja especificidad. Los anticuerpos anti-células parietales pueden estar presentes en la anemia perniciosa pero tienen una especificidad muy baja. No se pueden dar recomendaciones concretas sobre el uso de estas pruebas analíticas.

El test de Schilling ya no es accesible en muchos países. Recientemente los autores de la revisión han publicado algunos trabajos proponiendo un método alternativo llamado CobaSorb. En dicho método se administra una dosis oral de cobalamina no radiactiva y si se demuestra un aumento en el nivel sérico de holotranscobalamina se considera que hay una buena absorción de la cobalamina. Se ha probado en sujetos sanos y pacientes con defectos congénitos que alteran la absorción pero aún se ha probado en muy pocos pacientes con déficit adquirido de B12.

Hvas y Nexo refieren que la mayoría de los expertos recomiendan endoscopias de vigilancia cada 5 años en pacientes con anemia perniciosa debido al riesgo aumentado de cáncer gástrico.

Snow (3) en su guía refirió que el nivel de gastrina sérica está elevado en el 80-90 % de los pacientes con anemia perniciosa (la atrofia gástrica con hipoclorhidria se acompaña de una hiperplasia antral de células G con hipergastrinemia). Los niveles también tienden a ser elevados en pacientes con menor grado de atrofia gástrica con malabsorción de vitamina B12 unido a las proteínas de los alimentos. El test tendría una sensibilidad y especificidad limitada para el diagnóstico de anomalías gástricas subclínicas.

Aproximación clínica a la investigación de las alteraciones relacionadas con la cobalamina

La guía inglesa (4) resume las recomendaciones en dos algoritmos que se pueden consultar en dicha guía:

- Algoritmo 1: pacientes con alta sospecha de déficit de cobalamina con datos objetivos como anemia, glositis o parestesias.
- Algoritmo 2: pacientes con niveles bajos de cobalamina sérica pero sin anemia u otros datos objetivos significativos (cobalamina baja de

significado incierto). Se trata principalmente de pacientes mayores en los que se ha pedido la analítica por síntomas inespecíficos (astenia, síntomas neuropsiquiátricos, chequeo...). Puede tratarse de pacientes con una anemia perniciosa latente o ser un descenso por alguna de las causas citadas al hablar de la determinación de cobalamina sérica.

En la revisión de UpToDate (10) recomiendan evaluar los resultados de las pruebas analíticas de la siguiente manera: si los niveles de folato sérico son > 4 ng/mL y de cobalamina > 300 pg/mL (> 221 picomoles/L) el déficit es muy improbable y no está indicado hacer más pruebas analíticas.

Si los niveles son borderline o discordantes con los datos clínicos se solicitarán niveles de homocisteína total y de ácido metilmalónico. Según sus resultados:

- Si el nivel de ambos es normal es muy improbable que haya un déficit de alguna de las dos vitaminas. Si de todas maneras persiste la sospecha clínica se iniciará tratamiento con cobalamina 1.000 µg subcutáneo 1 vez por semana durante 1-3 semanas y se medirá la respuesta según reticulocitos, hemoglobina, macrocitosis y neutrófilos hipersegmentados.
- Si el nivel de ambos está elevado se confirma un déficit de cobalamina con una sensibilidad y especificidad del 94 y 99 % respectivamente. Si los resultados están en los límites puede repetirse la medición en otra muestra. No podemos descartar que haya también un déficit de folato.
- Cuando el nivel de la homocisteína está elevado pero el nivel de ácido metilmalónico es normal debemos sospechar un déficit de folato con una sensibilidad y especificidad del 86 y 99 % respectivamente.

Snow (3) en su guía también presenta unos algoritmos diagnósticos diferenciando los pacientes con alteraciones hematológicas y los pacientes que sólo presentan alteraciones neurológicas. Podemos destacar lo siguiente:

- Pacientes con alteraciones hematológicas sugestivas de déficit de B12 o folato.
 - Nivel de cobalamina sérica < 74 pmol/L (100 pg/mL). Probable déficit de vitamina B12.
 - Nivel de cobalamina entre 74 y 221 pmol/L (100-300 pg/mL). Posible déficit de vitamina B12. Medir niveles de AMM y de homocisteína.
 - Nivel de cobalamina sérica > 221 pmol/L (300 pg/mL). Es improbable que haya un déficit de vitamina B12. Ver nivel de folato y si también es normal pensar en otras causas para las alteraciones hematológicas.
- Pacientes que sólo presentan alteraciones neurológicas. En estos pacientes hay que tener en cuenta que el déficit de folato raramente provoca síntomas neurológicos, el tratamiento con vitamina B12 es poco tóxico y un retraso en el tratamiento puede hacer que las

secuelas neurológicas sean permanentes por lo que en estos pacientes el binomio riesgo-beneficio sería favorable a tratar en caso de duda de si hay déficit. La falta de respuesta no demuestra que no se tratara de un déficit. Puede ser útil hacer un seguimiento del VCM ya que aunque inicialmente sea normal con el tratamiento puede observarse un descenso significativo en caso de que haya respuesta.

5. RECOMENDACIONES

Pruebas analíticas para diagnosticar un déficit de cobalamina o de folato

Volumen Corpuscular Medio (VCM) y morfología de sangre periférica

Un valor de hemoglobina o VCM normales no pueden ser empleados para rechazar una determinación de nivel de cobalamina o de folato.

La identificación de neutrófilos hipersegmentados y de macrocitos ovoides puede sugerir un déficit de cobalamina o folato pero no son hallazgos muy sensibles para un diagnóstico temprano y tampoco son específicos.

Cobalamina sérica (nivel de vitamina B12)

Es la prueba diagnóstica rutinaria estándar para el diagnóstico de déficit de vitamina B12. Los resultados del nivel de cobalamina sérica serán interpretados dependiendo de los valores de referencia de cada laboratorio y siempre teniendo también en cuenta los datos clínicos de sospecha de déficit de vitamina B12.

Pueden ser causas de un nivel bajo de cobalamina sérica sin déficit real los siguientes factores: déficit de folato, embarazo, toma de anticonceptivos orales, mieloma, anemia ferropénica y VIH.

Folato sérico

Es la prueba diagnóstica rutinaria estándar para el diagnóstico de déficit de folato. Los resultados del nivel de folato sérico serán interpretados dependiendo de los valores de referencia de cada laboratorio y siempre teniendo también en cuenta los datos clínicos de sospecha de déficit de folato. El nivel de folato sérico refleja el estatus y aporte recientes de folato en la dieta. Unos días de hospitalización con dieta normal o una transfusión pueden normalizar los niveles. Unos días con aportes pobres de folato pueden hacer descender el nivel de folato sérico con unos depósitos normales. Una muestra

hemolizada libera el folato intraeritrocitario y puede elevar los niveles de folato sérico.

¿Cuándo se recomienda solicitar determinación de vitamina B12 o de folato sérico?

Se recomienda solicitar ambas pruebas analíticas a la vez (vitamina B12 o cobalamina sérica y folato sérico) en los siguientes casos:

- Anemia macrocítica o macrocitosis aislada. Si coexisten ferropenia o talasemia la macrocitosis puede quedar enmascarada.
- Pancitopenia.
- Glositis y/o úlceras orales en población de riesgo de padecer déficit.

Se recomienda solicitar un test de vitamina B12 o cobalamina sérica sin incluir folato sérico en los siguientes casos:

- Presencia de síntomas neurológicos inexplicados como parestesias, entumecimiento, déficit de coordinación motriz, problemas de memoria o cognitivos y cambios de personalidad independientemente de los resultados del hemograma.

¿Cuándo NO se recomienda solicitar una determinación de vitamina B12 o de folato sérico?

No se recomienda solicitar ninguna de ambas pruebas en los siguientes casos:

- Personas asintomáticas con hemograma normal.
- Personas sin factores de riesgo de déficit.
- Personas que están recibiendo suplementos de vitamina B12 o folato, salvo sospecha de abandono del tratamiento.

Factores de riesgo de déficit de vitamina B12

- Edad avanzada. Los ancianos presentan una mayor incidencia de gastritis atrófica.
- Dieta vegetariana.
- Resección de estómago o de intestino delgado.
- Enfermedad inflamatoria del intestino delgado.
- Enfermedades autoinmunes como Graves, tiroiditis y vitiligo.
- Tratamiento crónico con inhibidores de la bomba de protones, antagonistas de receptores H2 de la histamina o biguanidas (metformina).

Factores de riesgo de déficit de folato

- Síndrome de malabsorción (enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn).
- Malnutrición grave.
- Alcoholismo.
- Tratamiento crónico con ciertos medicamentos (trimetoprim, salazopirina, anticonvulsivantes).
- Hiperconsumo: anemias hemolíticas crónicas.

¿Qué pruebas se pueden solicitar para determinar la etiología del déficit de cobalamina?

Si por la historia clínica la etiología está clara (vegetarianos, cirugía gástrica, etc..) no hacen falta más estudios.

Sospecha de anemia perniciosa

- Anticuerpos anti-factor intrínseco (anti-FI). Se recomienda solicitar esta prueba analítica en caso de sospecha de anemia perniciosa. Tiene una sensibilidad baja pero una gran especificidad: su resultado es positivo en el 40-60 % de las anemias perniciosas y ocasiona un 1-2 % de resultados falsos positivos.
- Anticuerpos anti-células parietales gástricas. Con los datos disponibles es una prueba diagnóstica de recomendación dudosa ya que su utilidad está en entredicho debido a que a pesar de ser más sensible es poco específico: su resultado es positivo en el 50-90 % de los pacientes con anemia perniciosa pero también en el 10 % de las personas sin ella.
- Otras pruebas. No se recomienda medir niveles de gastrina ni de pepsinógeno. El test de Schilling ya no está disponible. A parte de las pruebas de laboratorio en algunas publicaciones recomiendan hacer una gastroscopia con biopsias al diagnóstico.

En caso de resultados dudosos en el nivel de cobalamina sérica o de folato sérico ¿Qué pruebas de confirmación se pueden solicitar?

En caso de resultados dudosos en los niveles de cobalamina sérica o de folato sérico o que no sean coherentes con los datos clínicos se recomienda consultar con los especialistas, quienes valorarán la necesidad de iniciar un tratamiento empírico y/o ampliar el estudio analítico con parámetros especiales como:

- Dudas de déficit de vitamina B12: homocisteína plasmática total, ácido metilmalónico plasmático y/o holotranscobalamina.

- Dudas de déficit de folato: folato intraeritrocitario y/o homocisteína plasmática total.

¿Qué analíticas de control se deben solicitar durante el tratamiento?

En los pacientes que inician tratamiento con cobalamina o folato se recomiendan las siguientes analíticas de control:

- Hemogramas periódicos: de forma orientativa mensual hasta la normalización y posteriormente anual. Si en 2 meses no se objetiva mejoría en la anemia o en la macrocitosis remitir al especialista.
- En el caso de déficit de cobalamina vigilar electrolitos en las primeras semanas del inicio del tratamiento debido a que puede aparecer hipokaliemia.
- No hace falta vigilar niveles de cobalamina sérica o de folato sérico. Sólo estarán indicadas estas pruebas de control en caso de que reaparezca una anemia o se sospeche un incumplimiento del tratamiento.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Utilización de las pruebas de función tiroidea en la práctica clínica. Recomendaciones. <https://www.osakidetza.net/sites/Intranet/es/salud-apoyo/plan-director-laboratorios/proyectos/Paginas/default.aspx>
2. Indicaciones para la determinación de niveles séricos de vitamina D. Enero 2015 <https://www.osakidetza.eus/sites/Intranet/es/referencia-documental/Documentos%20compartidos/RecomendacionesVitD.pdf>
3. Snow, C.F. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. Archives of Internal Medicine 1999; 159: 1289–1298.
4. Devalia V., Hamilton M.S. and Molloy A.M. on behalf of the British Committee for standards in haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. Br J Haematol 2014; 166(4): 496-513.
5. Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Usage judicieux de 14 analyses biomédicales. Rapport rédigé par Faiza Bougrassa et Alicia Framarin avec la collaboration du Comité d'experts sur la pertinence-OPTILAB. Montréal, Québec: INESSS; 2014. 33 p.
6. British Columbia Ministry of Health (BCMh). Folate deficiency - Investigation & management. BC Medical Association. Victoria, BC : Guidelines and Protocols Advisory Committee; 2012. Disponible à : <http://www.bcguidelines.ca/pdf/folate.pdf>.
7. Ontario Association of Medical Laboratories (OAML). Guidelines for folate testing. Community laboratory guidelines. Toronto, ON : OAML;

2009. Disponible à:
<http://www.oaml.com/PDF/2009/OAML%20Folate%20Guideline%20FINAL%20September%202009.pdf>.
8. British Columbia Ministry of Health (BCMH). Cobalamin (vitamin B12) deficiency - Investigation & management. Victoria, BC : Guidelines and Protocols Advisory Committee 2013. Disponible à :
<http://www.bcguidelines.ca/pdf/cobalamin.pdf>.
 9. Stabler, S.P. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. *New England Journal of Medicine* 2013; 368: 149–160.
 10. Schrier S.L. Diagnosis and treatment of vitamin B12 and folate deficiency. *UpToDate*. Last updated: Jun 25, 2014.
 11. Remacha A.F., Zapico E., Sarda P., Remacha J., Queraltó J.M. Diagnóstico del déficit de vitamina B12-folato: papel de la homocisteína, el ácido metilmalónico y la holotranscobalamina. LV Congreso Nacional de la SEHH, Sevilla 2013. Programa educacional: 2-6.
 12. Hvas, A.M. & Nexø, E. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency—an update. *Haematologica* 2006; 91: 1506–1512.
 13. Carmel, R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *American Journal of Clinical Nutrition* 2011;94: 348S–358S.
 14. Hunt A. Vitamin B12 deficiency. *BMJ* 2014; 349: g5226.
 15. Solomon L.R. Disorders of cobalamin (vitamin B12) metabolism: emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood reviews* 2007; 21: 113-130.
 16. de Benoist B. Conclusions of a WHO Technical Consultation on folate and vitamin B12 deficiencies. *Food Nutr Bull* 2008;29(2 Suppl):S238–44.
 17. Qualité des services de santé Ontario. Serum vitamin B12 testing: A rapid review. Toronto, ON : Health Quality Ontario; 2012. Disponible à :
<http://www.hqontario.ca/Portals/0/Documents/eds/rapid-reviews/vitamin-b12-121212-en.pdf>.
 18. Smellie WS, Wilson D, McNulty CA, Galloway MJ, Spickett GA, Finnigan DI, et al. Best practice in primary care pathology: Review 1. *J Clin Pathol* 2005;58(10):1016-24.
 19. Andres E, Loukili NH, Noel E, Kaltenbach G, Abdelgheni MB, Perrin AE, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. *Can Med Assoc J.* 2004;171(3):251-9.
 20. Willis CD, Elshaug AG, Milverton JL, Watt AM, Metz MP, Hiller JE. Diagnostic performance of serum cobalamin tests: A systematic review and meta-analysis. *Pathol.* 2011;43(5):472-81.
 21. Bilbao J. Anemias carenciales II: anemia megaloblástica y otras anemias carenciales. *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud* 2006; 30: 67-75.

22. Wickramasinghe S.N. Diagnosis of megaloblastic anaemias. Blood reviews 2006; 20: 299-318.
23. Savage DG, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. Am J Med 1994; 96:239.