



## Pruebas bioquímicas para el diagnóstico de anemia megaloblástica\*



29 min.



Las anemias macrocíticas se pueden clasificar en dos subtipos: las megaloblásticas y las no megaloblásticas. Entre las causas comunes de la anemia macrocítica megaloblástica se encuentra la deficiencia de Vitamina B12 y Folato, mientras que para la anemia macrocítica no megaloblástica, la causa más frecuente es la presencia de cuadros hemolíticos, hemorragias abundantes o el consumo crónico de alcohol. A continuación le presentamos una revisión con las nuevas determinaciones de laboratorio y cuales son los estudios necesarios para un correcto diagnóstico del paciente con anemia macrocítica.



Héctor Claudio Merlo<sup>1</sup>, Silvia Mónica De Paula<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Bioquímico. Jefe de Laboratorio División Hematología. Hospital General de Agudos Dr. J. M. Ramos Mejía. Subcomisión de Bioquímica y Biología. Sociedad Argentina de Hematología.

<sup>2</sup> Bioquímica. Laboratorio División Hematología. Hospital General de Agudos Dr. J. M. Ramos Mejía. Subcomisión de Eritropatías. Sociedad Argentina de Hematología.

\* Subcomisión de Eritropatías, Sociedad Argentina de Hematología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

**Acta bioquím. clín. latinoam. vol.51 no.3 La Plata set. 2017**

**Recibido:** 30 de julio de 2016

**Aceptado:** 15 de julio de 2017

**CORRESPONDENCIA** Dr. Héctor Claudio Merlo, Dra. Silvia Mónica De Paula. Laboratorio División Hematología Hospital General de Agudos CABA, Buenos Aires  
E-mail: hematologiaramos@gmail.com



### Resumen

Es intención de este trabajo hacer un breve repaso sobre el metabolismo de la Vitamina B<sub>12</sub> y del Folato o Vitamina B9. Estas dos vitaminas hidrosolubles juegan un papel importante en el metabolismo celular. Son cofactores de reacciones metabólicas de transferencia de grupos monocarbonados, esenciales para el mantenimiento de la vida. Además se describen las nuevas determinaciones de laboratorio, se evalúan cuáles son los estudios necesarios para arribar a un correcto diagnóstico del paciente con Anemia Macroscítica (AM), su etiología y cómo muchas drogas de uso frecuente en medicina producen AM. Se realiza también la evaluación del conjunto de metodologías que se pueden efectuar como rutina en el laboratorio especializado en hematología y se propone un algoritmo para el diagnóstico del paciente con AM.

**Palabras clave:** Anemia megaloblástica; Deficiencia de vitamina B<sub>12</sub>; Deficiencia folato; Algoritmo de anemia macrocítica; Pruebas de laboratorio.

### Introducción

#### TRANSPORTE DE FOLATOS

El ácido fólico o vitamina B9 es una vitamina hidrosoluble que resulta de la unión del ácido ptericoico y de una o más moléculas

de ácido L-glutámico; su forma activa es el tetrahidrofolato (THF). Se encuentra en alimentos de origen vegetal (frutas, verduras, legumbres) o animal (hígado, riñón).

Los folatos y el ácido fólico (AF) se absorben en el duodeno y yeyuno; los poliglutamatos son hidrolizados por la glutamato carboxipeptidasa II del ribete estriado. Su absorción (mecanismo de transporte activo, saturable y pH dependiente) es mediada por el portador de folatos reducido (RFC) que funciona a pH neutro (codificado por el cromosoma 21) y el transportador de folato acoplado a protones (PCFT) que actúa a pH ácido (codificado por el cromosoma 17).

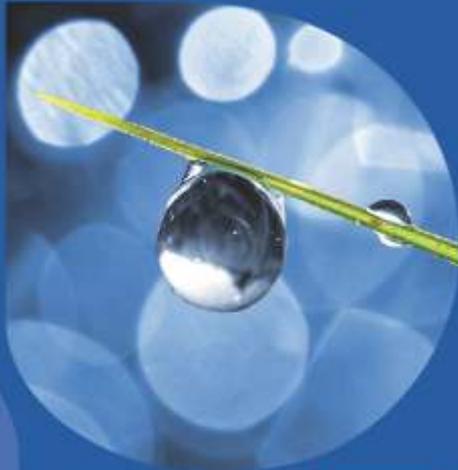
Una vez dentro de la célula la folil poliglutamato sintetasa adiciona residuos glutamato al C-terminal, aumenta su tamaño y evita su salida por las bombas exportadoras de folato. Luego es reducido y metilado a 5-metil-tetrahidrofolato (5-MTHF) que cruza la membrana basolateral del enterocito por un mecanismo de intercambio aniónico activo y entra a la circulación portal.

La membrana basolateral del hígado muestra también la característica de un proceso mediado dependiente del sodio; en el hepatocito es convertido en poliglutamato por acción de folilpoli-g-glutamato sintetasa que puede adicionar hasta 8 residuos glutamato.

La folilpoli-g-glutamato carboxipeptidasa los transformará en monoglutamatos secretados en la bilis y reabsorbidos en el intestino delgado.

El riñón participa de la homeostasis dado que el folato filtrado es reabsorbido en el nefrón, que contiene receptores de folato (FR)

# Tecnología escalable que acompaña su crecimiento



- Gestión de laboratorios
- Conectividad con analizadores
- Trazabilidad de muestras
- Redes de laboratorios
- Integración hospitalaria
- Facturación



#### PUBLISHER

Publicación automática de resultados vía fax / email / PDF. Envío simultáneo a pacientes / médicos / instituciones.



#### WEB

Integración a la web. Consulta interactiva de resultados para Pacientes / Médicos / Derivantes / Recepción en línea de derivaciones.

#### CONNECT

Comunicación con instrumentos. Producto independiente o componente de NextLAB LIS.



#### MICROBIOLOGÍA

Definición de paneles de antibióticos (CIM, Disco, IDI) / Manejo de múltiples aislamientos para muestra / Informes preliminares.



#### SISTEMA DE TRACKING DE MUESTRAS

Seguimiento de las muestras dentro del laboratorio. Producto independiente o integrado a NextLAB LIS.

#### CONECTOR

Integración en tiempo real de NextLAB LIS con Sistemas hospitalarios / Middleware / LIS de otros fabricantes.



**LABORATORY  
INFORMATION  
SYSTEM®**

Flexibilidad y poder de parametrización. Software abierto que puede integrarse con instrumentos de cualquier fabricante. Solución ideal para instituciones públicas y privadas al contemplar facturación e integración con sistemas hospitalarios. NextLAB® LIS se presenta en tres versiones: Lite, Professional y Enterprise.

LITE

PRO

ENT

 **NextLAB®**

SOFTWARE INTELIGENTE

NextLAB by Genetrics S.A.  
Av. del Libertador 8630 6to Piso "11"  
C1429BNT Núñez Buenos Aires  
T. [+5411] 52 63 02 75 Rot  
F. [+5411] 52 63 02 75 Ext 100  
[info@nextlab.com.ar](mailto:info@nextlab.com.ar)

en las células del túbulo proximal.

Los FR son una familia de receptores de alta afinidad codificados por 3 genes *alfa*, *beta* y *gamma* localizados en el cromosoma 11. Las *alfa* y las *beta* son glicosilfosfatidilinositol proteínas de anclaje y la *gamma* es secretoria.

La absorción de folato en el citosol por los FR implicaría un proceso de endocitosis (1).

#### TRANSPORTE DE VITAMINA B12

La vitamina B12 o Cobalamina, también hidrosoluble, resulta de la unión asimétrica de cuatro anillos pirrólicos (anillo de corrina) en torno a un átomo central de cobalto sobre el que se efectuarán procesos de óxido-reducción que conducirán del Co (3+) a Co (1+) (2) (Figura 2).



Figura 1. Ácido fólico.

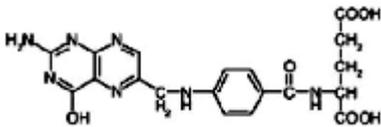
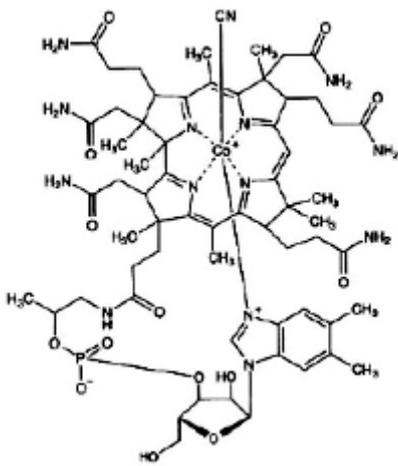


Figura 2. Fórmula química de la Vitamina B12.



Mínimas dosis con necesarias para el organismo. La cadena nutricional comienza con la producción por las bacterias en el tracto intestinal de los herbívoros, la acumulación en sus tejidos y el consumo de productos de origen animal dado que el hombre no puede sintetizarla. La hidroxicobalamina y la

cianocobalamina proveniente de los alimentos serán transformadas en metil- y desoxiadensilcobalamina.

La vitamina B12 es captada por la Haptocorrina, de origen salival, que la protege de la hidrólisis en medio ácido. En el duodeno la Haptocorrina es degradada por las enzimas pancreáticas y la B12 es captada por el Factor Intrínseco (FI) producido por las células parietales; este complejo es absorbido por endocitosis mediada por el receptor Cubilina-AMN.

La cubilina es una proteína de membrana que se une a FI-B12 y AMN es una proteína transmembrana con actividad endocítica.

El FI es degradado por proteasas lisosomales y la B12 retorna al citoplasma por medio de la proteína LMBD, puede permanecer dentro de la célula o ser exportada por el MRP1, transportador basolateral de la célula ileal.

Una vez transportada al plasma circula unida a la Transcobalamina II, la cual puede ser captada por el receptor CD320 en el hígado y demás órganos.

En riñón la recaptura de holotranscobalamina se produce por el receptor Megalina (3).

La B12 es cofactor para dos enzimas: la metionina sintetasa (citoplasmática) y la metilmalonilCoA mutasa (mitocondrial) que cataliza el pasaje de metilmalonilCoA a succinilCoA, metabolito del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

El déficit de B12 reduce la actividad de la metilmalonilCoA mutasa produciendo la acumulación de metilmalonilCoA y ácido metilmalónico (MMA).

La B12 es cofactor de la metionina sintetasa que cataliza la remetilación de la homocisteína a metionina, precursor de la S-adenosilmetionina (SAM), donador de grupos metilo necesarios para la metilación de fosfolípidos, neurotransmisores, aminas, ADN, ARN y proteínas básicas de mielina; en la depleción de B12 se inactiva la metionina sintetasa con importante reducción de las reacciones de metilación, y la homocisteína aumenta (4,5).

La deficiencia de B12 o de folatos se traduce en una anemia megaloblástica resultante en una síntesis alterada de ADN. Ambas vitaminas están intrínsecamente ligadas a la vía de la metionin sintetasa que es la única enzima que usa al 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF) y lo convierte en su forma metabólicamente activa, el tetrahydrofolato (THF) necesario en el metabolismo de un átomo de carbono.

En la deficiencia de B12 la actividad de la metionin sintetasa se reduce y se bloquea la formación de THF; el folato queda atrapado como 5-MTHF, que es una forma que no puede utilizarse, dado que el pasaje de 5,10-MTHF a 5-MTHF catalizado por la 5,10-metilentetrahydrofolato reductasa (MTHFR) es irreversible.

#### TRAMPA DE FOLATOS

La SAM es inhibidor alostérico de la MTHFR; en el déficit de B12 la SAM disminuye, por lo que se elimina la inhibición de MTHFR promoviendo la reducción de 5,10-MTHF a 5-MTHF de modo que se utilice para resintetizar metionina y se produce más acumulación de folatos como 5-MTHF.

Las células sufren de una pseudo-deficiencia de folatos dado que no está en su forma activa, de manera que se interrumpe la producción de purinas y pirimidinas necesarias para la síntesis de ADN.

El 5-MTHF no es sustrato de elección para la folilglutamato sintetasa, enzima responsable de la retención celular de folato. Se han reportado bajas concentraciones de folato intraeritrocitario en deficiencia de B12 (5).

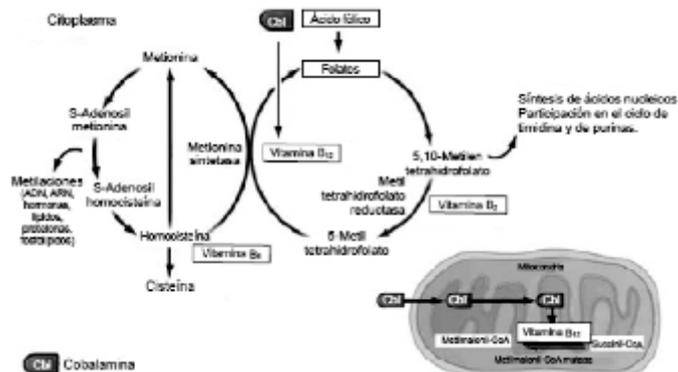
El 5-MTHF puede atravesar la barrera hematoencefálica, lo que permite el mantenimiento de la mielina.

El defecto en la síntesis de ADN compromete a todas las células del organismo con capacidad proliferativa.

La anemia megaloblástica es la manifestación de esta anomalía en la síntesis de ADN; se activa la apoptosis que causará una eritropoyesis ineficaz y se acorta la supervivencia de los glóbulos rojos (Figura 3).



Figura 3. Ciclo metabólico de Folatos y Vitamina B12



megaloblástica se encuentra la deficiencia de Vitamina B12 (B12) y Folato (Fol), mientras que para la anemia macrocítica no megaloblástica, la causa más frecuente es un aumento de los reticulocitos (Ret) o el consumo crónico de alcohol (6,7). Se debe tener en cuenta también la edad de los pacientes, ya que los valores de B12 y Fol están disminuidos, y los del Ácido Metilalánico (AMM) y de la Homocisteína total (HCT) están aumentados en adultos mayores de 60 años (7).

CAUSAS DE ANEMIA MEGALOBLÁSTICA

Fuera de las deficiencias de B12 y Fol, existen varias causas de AM-Me, entre las que se encuentran la inadecuada secreción de Factor Intrínseco (FI), alteraciones en la liberación de B12 del complejo B12-Receptor, malabsorción por anomalías del íleo terminal (para B12) o del yeyuno (para Fol) y anomalías hereditarias o adquiridas en los metabolismos de B12 y Fol (7).

Además, existe una gran cantidad de drogas de uso frecuente en medicina que interfieren con la absorción o distribución de Fol, como agentes anticonvulsivantes (fenobarbital, fenitoína, etc.), anticonceptivos (estrógenos), antimaláricos (quinina, etc.) y antibióticos (ampicilina, tetraciclinas, etc.) (8). Hay drogas que interfieren con el metabolismo de Fol, conocidas generalmente como análogos de folato, que se utilizan en el tratamiento de enfermedades oncológicas, ya sea de tumores sólidos o leucemias (metotrexato,

EVALUACIÓN DE LAS ANEMIAS MACROCÍTICAS EN EL LABORATORIO

Las anemias macrocíticas (AM) generalmente definidas por un Volumen Corpuscular Medio (VCM) >100 fL, se pueden clasificar en dos subtipos: las megaloblásticas (AM-Me) y las no megaloblásticas (AM-NoMe).

Dentro de las causas comunes de anemia macrocítica



Analizador Multiparamétrico Totalmente automatizado

- Dispositivo individual de un solo uso que contiene todos los reactivos necesarios para realizar el ensayo.
- Capacidad multiparamétrica: Procesa hasta 30 diferentes pruebas por corrida.
- La velocidad permite obtener resultados simultáneos de diferentes paneles.
- El primer resultado se obtiene antes de 90 minutos.
- Volumen de muestra: La muestra se dispensa manualmente. ELISA; Mínimo de muestra 60 uL. Fijación de complemento; Mínimo de muestra 120 uL.



Enfermedades Infecciosas

Adenovirus IgG	Legionella Pneumophila 1-4 IgG
Adenovirus IgA	Measles IgM
Citomegalovirus IgG	Measles IgM
Citomegalovirus IgM	Mycoplasma Pneumoniae IgA
Epstein-Barr VCA IgG	Mycoplasma Pneumoniae IgG
Epstein-Barr VCA IgM	Mycoplasma Pneumoniae IgM
Epstein-Barr EBNA IgG	Mumps IgG
Epstein-Barr Early Antigen IgG	Mumps IgM
Epstein-Barr Early Antigen IgM	Respiratory Syncytial Virus IgG
Helicobacter Pylori IgG	Respiratory Syncytial Virus IgM
Helicobacter Pylori IgA	Rubella IgG
HSV 1 Screen	Rubella IgG Avidity
HSV 2 Screen	Rubella IgG Avidity
Herpes Simplex 1+2 IgM	Syphilis Screen Recombi
Herpes Simplex 1+2 IgG	Treponema IgG
Influenza A IgG	Treponema IgM
Influenza A IgM	Toscana Virus IgG (Sandfly Fever Virus)
Influenza B IgG	Toscana Virus IgM (Sandfly Fever Virus)
Influenza B IgM	Tosoplasma IgG
Legionella Pneumophila IgM	Tosoplasma IgG Avidity
Legionella Pneumophila 1 IgG	Tosoplasma IgM
	Tosoplasma IgA
	Varicella IgG
	Varicella IgM

Autoinmunidad

AINA-I	Glutin-B
ENA-S-S	Desaminated Gladin
ANA Screen	Proteide-G
SM	Desaminated Gladin
SS-A	Proteide-A
SS-B	ITp-A
Scl-70	ITp-G
Cerep-B	ASCA-A
Jo-1	ASCA-G
dsDNA-G	PR3
dsDNA-M	MPO
CCP	GBM
RF-G	a-TG
RF-M	a-TPO
Cardiolipin-IgG	TG
Cardiolipin-IgM	LKM-1
Beta 2-Glycoprotein-G	AMA-M2
Beta2-Glycoprotein-M	Insulin
Glutin-A	

Fijación del Complemento

Bordetella Pertussis	Chlamydia
Borrelia	Echo Virus P Mix
Bruceia	Influenza A Virus
Campylobacter Jejuni	Influenza B Virus
Legionella Pneumophila	Mycoplasma Pneumoniae
Leptospira Mix	Parainfluenza Mix
Listeria Monocytogenes	Q-Fever
Shigella Flexneri	Reovirus
Yersinia Enterocolitica	Respiratory Syncytial Virus
Echo Virus N Mix	Coxsackie Virus A Mix
Poliovirus Mix	Coxsackie Virus B Mix
Adenovirus	Achinococcus

Próximamente disponibles: Borrelia IgG - IgM, Vitamina D, Chlamydia Trachomatis IgG - IgA, Parvovirus IgG - IgM, Panel Vacunación (Tetanos - Difteria - polio IgG), EBV VCA Recombinante.

hidroxiurea, mercaptopurina, etc.) (8). También hay drogas que disminuyen la absorción de B12: antituberculosos y antibióticos (ácido aminosalicílico, isoniacida, neomicina, etc.), hipoglucemiantes orales (metformina); drogas que aumentan la excreción de B12: antihipertensivos (nitroprusiato de sodio) y las que destruyen B12: antihipertensivos (óxido nítrico) (8). Algunos de estos compuestos son conocidos también como antivitaminas, su uso está muy difundido en medicina sobre todo con antagonistas de Fol como el metotrexato y vitamina K (anticoagulantes orales), sin embargo, está aún en las primeras fases de investigación para antagonistas de B12 (9).

#### OTRAS CAUSAS DE ANEMIA MACROCÍTICA NO MEGALOBLÁSTICA

Como se mencionó más arriba, las causas más frecuentes de AM-NoMe son el abuso crónico de alcohol (con o sin enfermedad hepática) y los cuadros hemolíticos o pérdidas abundantes de sangre, que producen reticulocitosis, como así también la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Dentro de otras causas se pueden distinguir la enfermedad hepática (cirrosis y patología hepática aguda), el hipotiroidismo, mielodisplasias como el síndrome 5q-, anemia diseritropoyética congénita tipo I (CDA I), anemia aplásica, síndrome de Diamond-Blackfand y anemia de Fanconi (6). Existen también, al igual que en el caso de las AM-Me, drogas que producen por distintos mecanismos una anemia macrocítica, como ser las que interfieren en el metabolismo de purinas y/o pirimidinas, con la consiguiente disminución en la síntesis de ADN, por lo general utilizadas en el tratamiento de patologías oncológicas (mercaptopurina, fludarabina, etc.), antigotosos (allopurinol), inmunomoduladores usados en trasplante de órganos y procesos inflamatorios como artritis reumatoidea y artritis psoriásica (azatioprina, leflunomida, etc.) (8). Existen, además, drogas que producen macrocitosis por mecanismos complejos o desconocidos, como algunos antineoplásicos (asparaginasa, arsénico, etc.) (8) y antirretrovirales de uso frecuente en el tratamiento de pacientes HIV positivos (7).

#### ESTUDIOS BIOQUÍMICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANEMIAS MACROCÍTICAS

Lo primero es realizar una observación minuciosa de un buen extendido de sangre

periférica, ya que de observar policromatofilia, generalmente asociada a presencia de un número aumentado de Ret, estaría indicando un aumento en la actividad eritroide de la médula y orientaría a pensar en un aumento de la producción debido a pérdida de sangre o anemia hemolítica. Por otro lado, la presencia de neutrófilos hipersegmentados, definida generalmente como la presencia de >5% de neutrófilos con cinco o más lóbulos, ya sea con o sin la presencia de macro ovalocitos, orientaría a una megaloblastosis (6,10).

#### DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE VITAMINA B12

Los métodos actuales para determinar la concentración de B12 en suero brindan, según los fabricantes, una sensibilidad del 95–97%, pero los valores normales de B12 no excluyen una deficiencia. Por este motivo, es importante realizar también la determinación los metabolitos relacionados como ácido metilmalónico (AMM) y homocisteína total (HCT) los cuales están aumentados, tempranamente, en la deficiencia de B12 (6,7,10).

La determinación de AMM tiene varias desventajas, ya que se trata de un estudio caro, por lo que no está muy difundido y además, por lo general, tiene una demora importante en la devolución de resultados (7,10). Esto se debe a que el método de determinación comprende técnicas de separación por Cromatografía Gaseosa y cuantificación por Espectrometría de Masa (CG-EM) (10-12). Se puede utilizar además una técnica de Cromatografía Líquida y cuantificación por espectrometría de masa en *tandem* (CL-EM/EM), la cual según sus desarrolladores, tiene muy buena correlación con la CG-EM en cuanto a los resultados obtenidos, con CV% intra e inter ensayo menores, de 3,8-8,5% para CG-EM y 1,3-3,4% para CL-EM/EM, pero a diferencia de ésta, tiene una reducción importante en los costos (59% menos) y en el tiempo de procesamiento (75% menor), ya que tiene un tiempo de corrida de 7,5 h contra las 30 h de la CG-EM. Por este motivo sus desarrolladores consideran que puede ser automatizable para más de 100 muestras/día (13).

Con respecto a la determinación de HCT, tiene la desventaja de estar aumentada tanto en la deficiencia de B12 como en la de Fol, por lo que pierde especificidad (7,10).

En los últimos años se ha estado investigando la incorporación de la determinación de B12 intra-eritrocitaria, que junto con el Fol intra-eritrocitario, evalúan los depósitos de dichas vitaminas, ya que éstas se incorporan al glóbulo rojo durante su formación en los precursores de médula ósea y mantienen su concentración durante los 120 días de vida media del eritrocito, disminuyendo por consiguiente a los pocos meses de deficiencia de estos compuestos (14). Esta técnica no está muy difundida, ya que se trata de una técnica experimental de radioensayo de inhibición competitiva (15) y actualmente existe un reactivo comercial de I CN Pharmaceuticals Inc. para la determinación cuantitativa simultánea de Vitamina B12 [57Co] y Folato [125I] en suero y plasma. Este reactivo sirve además para la determinación de Fol intra-eritrocitario, pero no se describe en el inserto del mismo la determinación de B12 intra-eritrocitaria (16).

La Holotranscobalamina (HoloTC) es la fracción activa de B12 y puede ser más específica que los niveles de B12 sérica para determinar el estado de deficiencia de B12. Existe en la actualidad un *test* inmunológico comercial para su determinación, el cual fue planteado como un probable *gold-standard* frente a la determinación de AMM, ya que no se necesita ninguna preparación previa de la muestra (10). Esta técnica se basa en un ensayo inmunológico de captura por anticuerpos monoclonales (17). Sin embargo, el uso de este *kit* comercial está cuestionado, ya que según algunos autores se basa en modelos erróneos. Ellos plantean principalmente que el modelo de Herbert, en el cual se basa la afirmación que la HoloTC sería un indicador precoz de la deficiencia de B12, no considera cómo el reciclado entero-hepático de B12, regula la concentración de HoloTC. En función de esto, la HoloTC sólo sería un indicador temprano de deficiencia de B12 en los casos en que dicha deficiencia se debiera a una interrupción del ciclo entero-hepático. De otra manera, existiría un período de “depleción” en el cual la B12 total caería, mientras que la HoloTC permanecería dentro de valores normales hasta que los depósitos hepáticos se agoten (18).

En este punto es importante destacar que ante la ausencia de un VCM elevado y la presencia de patología neurológica, no se puede excluir la evaluación de una deficiencia de B12 ya que se ha observado que

## La más amplia gama de Analizadores de Electrolitos

### SEMIAUTOMÁTICOS



#### V4 Semi Básico

Ideal para laboratorios pequeños con baja cantidad de muestras diarias. No consume mientras no se usa!



#### V4 Semi Plus

Ideal para laboratorios pequeños con baja cantidad de muestras. Con impresora y conectividad. No consume mientras no se usa!

Desde equipos semiautomáticos para pocas muestras diarias, hasta automáticos de alta gama y prestación para una gran carga de trabajo.

Diseñados y producidos en Argentina comercializados en todo el mundo.

### AUTOMÁTICOS



#### V4 Auto Básico

Para laboratorios medianos y modernos, con auto stand by para reducir consumo, impresora y conectividad.



#### V4 Auto Plus

Es el instrumento para laboratorios grandes, que necesita gestionar sus muestras en forma autónoma y segura, con toda la conectividad necesaria.

Na<sup>+</sup>

K<sup>+</sup>

Cl<sup>-</sup>

Ca<sup>++</sup>

Li<sup>+</sup>



Inmunoensayo Magnético Quimioluminiscente de Micropartículas (CMIA) de Abbott Diagnostic-Architect y el Enzimo Inmunoensayo Quimioluminiscente competitivo de Siemens HealthCare-Immulite.

#### Vitamina B12

Architect: Las muestras no necesitan preparación previa y las muestras hemolizadas deben ser descartadas. El tiempo de reacción es de aproximadamente 40 min.

#### Precisión y Exactitud

El fabricante realizó estudios de imprecisión durante 20 días basados en el protocolo EP5-A2 del CLSI. Se trabajó con 3 lotes de reactivo, 2 lotes de calibradores y 1 panel de sueros, en 2 equipos diferentes. En este estudio se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla I.

Para determinar exactitud, se realizó un estudio respecto al patrón internacional de OMS 03/178, obteniendo una diferencia de -3,6% respecto al valor esperado.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son las siguientes:

Bilirrubina hasta 25,1 mg/dL  
Proteínas hasta 12 g/dL  
Triglicéridos hasta 3.325 mg/dL

*Immulite*: En este caso se trata de un ensayo competitivo en fase sólida.

Las muestras se deben desnaturalizar calentando a 100 °C durante 15 a 20 min y luego un enfriamiento de 5 min antes de ser procesadas. El análisis se completa con una corrida de 2 ciclos de 30 min cada uno.



Tabla I. Datos del estudio de imprecisión para la determinación de Vitamina B12

Analizador	Muestra	n	Media (pg/mL)	Intra-ensayo		Inter-ensayo	
				DE	CV%	DE	CV%
1	Suero	360	262	12,6	4,8	16,3	6,2
	C. Bajo	354	246	13,8	5,6	16,7	6,8
	Medio	355	424	14,3	3,4	16,8	4,0
	Alto	359	890	36,0	4,0	38,9	4,4
2	Suero	357	248	11,6	4,7	13,3	5,4
	C. Bajo	356	241	10,4	4,3	12,9	5,4
	Medio	352	408	13,3	3,3	15,5	3,8
	Alto	355	885	23,9	2,7	29,7	3,4

#### Precisión y Exactitud

El fabricante realiza un estudio de precisión intra-ensayos con 15 replicados de 5 soluciones en una sola tanda. Además, hace precisión inter-ensayos con muestras analizadas en 10 tomas distintas de 3 soluciones. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas II y III.

## NO LO PIENSE MÁS, TENEMOS EL EQUIPO IDEAL PARA SU LABORATORIO

### Química Clínica



240 Test/Hora  
DIRUI CS-T240



400 Test/Hora  
DIRUI CS-400



600 Test/Hora  
DIRUI CS-600B

### Orinas



514 Tiras/Hora  
DIRUI H-500

### Hematología



60 Hemogramas/Hora  
DIRUI BCC-3000B



60 Hemogramas/Hora  
DIRUI BF-6500



80 Hemogramas/Hora  
Con AUTO-SAMPLER  
DIRUI BF-6800

**DIRUI** 20



Bernardo Lew

aproximadamente el 25% de los casos presentan VCM normal (10).

#### ESTUDIOS PARA DETERMINAR LA ETIOLOGÍA DE LA DEFICIENCIA DE COBALAMINA

Una vez certificada la deficiencia de B12 es importante realizar estudios para determinar la etiología de la anemia. Esto se debe a que se hace imprescindible el diagnóstico de Anemia Perniciosa (AP).

La AP es una enfermedad autoinmune, que puede coexistir con otras como la enfermedad de Hashimoto, la diabetes tipo I, el vitiligo y el hipoadrenalismo.

Es común encontrar en estudios de autoinmunidad para varias endocrinopatías, anticuerpos asociados a AP (10).

#### ANTICUERPOS ANTI FACTOR INTRÍNSECO

La AP se caracteriza por la presencia de Anticuerpos Anti Factor Intrínseco (AcFI).

Este estudio tiene un alto valor predictivo positivo, ya que están presentes en el 95% de los pacientes con AP, mientras que presenta un bajo nivel de falsos positivos de entre 1–2%, sin embargo tiene una baja sensibilidad ya que están presentes solo en el 40–60% de los pacientes con AP; por lo tanto, este estudio, de ser negativo, no permite descartar el diagnóstico.

Se debe tener en cuenta, además, que la tasa de positividad aumenta con la edad y también en determinados grupos raciales, como los latinoamericanos y los afroamericanos y que, además altos títulos de AcFI pueden interferir dando resultados normales de B12 en suero, por lo cual este estudio está absolutamente indicado en aquellos pacientes con resultados de B12 normal, con presencia de AM y síntomas neurológicos. Asimismo, con técnicas de quimio-luminiscencia, se pueden dar falsos positivos en pacientes que hayan recibido recientemente tratamiento con cobalamina inyectable (10).

#### ANTICUERPOS ANTI CÉLULAS PARIETALES GÁSTRICAS

Si bien los Anticuerpos anti Células Parietales Gástricas (AcCPG) tienen una baja especificidad para AP, con el progreso de la enfermedad pueden hacerse positivos en el 80% de los pacientes; además, presentan una baja tasa de falsos positivos que se reporta en un 10% de personas normales. Estos anticuerpos son los responsables de causar Aclorhidria Gástrica y los pacientes pueden progresar a AP (10).

#### DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE FOLATO

El término Folato se refiere tanto a las diferentes formas biológicamente activas de la vitamina, como al Ácido Fólico, que es la forma sintética usada en la suplementación de alimentos y para el tratamiento médico.

Ambos tipos son absorbidos en la zona proximal del intestino delgado (yeyuno) y, aproximadamente el 50% del Fol corporal se encuentra en el hígado.

Si bien la biodisponibilidad de ambas formas es buena, la absorción del Fol dietario está influenciada por varios factores en el lumen intestinal, como así también es vulnerable a degradación por el proceso de cocción de los alimentos. Existe consenso en que la biodisponibilidad del Fol alimentario es 50% menor que la del ácido fólico.

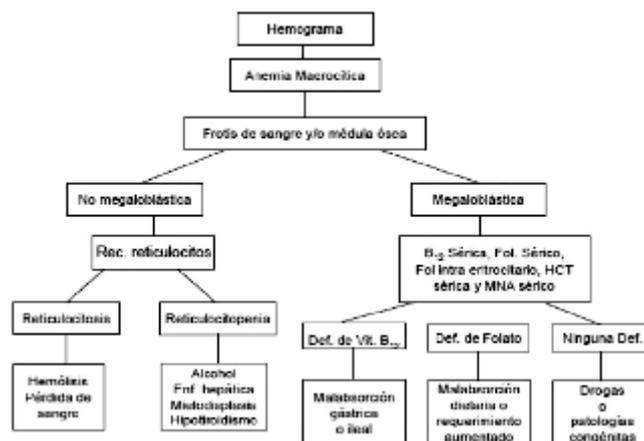
Una baja ingesta de Fol lleva a bajos niveles de Fol en sangre lo que conduce a bajas concentraciones en los tejidos. Sabiendo que el Fol es esencial para la síntesis de ADN, la deficiencia temprana se ve reflejada en los tejidos de rápida proliferación, como la médula ósea y el tracto gastro-intestinal, mientras que la deficiencia severa, puede llevar a pancitopenia y AM (10).

Las técnicas para evaluar el estado deficitario de Fol deberían incluir las determinaciones de Fol sérico e intra-eritrocitario. Los resultados obtenidos van a depender del método de determinación utilizado y pueden surgir de las diferencias en las técnicas de preparación de los hemolizados. La especificidad de resultados bajos de Fol intra-eritrocitario está discutida, ya que más del 60% de pacientes con deficiencia de B12 presentan valores disminuidos de Fol intra-eritrocitario, de modo que se hace indispensable realizar la determinación de B12 sérica junto con Fol sérico e intra-eritrocitario, por lo que la deficiencia de Fol se asume sólo cuando se encuentran valores normales de B12 sérica (6,7). Se debe tener en cuenta además, que el resultado de Fol sérico se ve influenciado por la ingesta reciente de ácido fólico, por lo que pueden verse resultados falsamente negativos en pacientes con deficiencia de Fol.

En función de lo expresado hasta aquí, puede proponerse un algoritmo para el estudio de pacientes con AM, de acuerdo con el propuesto por Green *et al* que se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Algoritmo para la evaluación de pacientes con AM. Adaptado de Green R y Dwyre DM. *Sem Hem* 2015 Oct; 52 (4): 279-86



#### EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

Las dos metodologías más utilizadas en nuestro medio son:



**Tabla II.** Resultados de los estudios de precisión intra-ensayo.

Solución	Media (ng/mL)	DE	CV%
1	159	18	11,3
2	204	21	10,3
3	401	27	6,7
4	736	39	5,3
5	1308	77	5,9

**Tabla III.** Resultados de los estudios de precisión inter-ensayo.

Solución	Media	DE	CV%
1	310	23	7,4
2	660	40	6,1
3	1192	202	17,0

Se realiza además un estudio de exactitud como recuperación con 4 soluciones de distinta concentración dando porcentajes de recuperación entre 93–115% expresado en % de observado/esperado.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son:

Bilirrubina hasta 20 mg/dL  
Hemoglobina hasta 3,81 g/dL  
Triglicéridos hasta 3000 mg/dL

#### Folato sérico y folato intra eritrocitario

Architect: Las muestras para determinar Fol sérico no necesitan ninguna preparación previa y las muestras hemolizadas deben ser descartadas. El tiempo de reacción es de aproximadamente 40 min.

#### Precisión y Exactitud

El fabricante realiza un estudio de imprecisión con el siguiente esquema: usa 3 paneles de suero (S1, S2, S3) en un instrumento, 3 replicados en dos tiempos diferentes durante 20 días con 2 lotes de reactivo. De este estudio se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla IV.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son las siguientes:

Bilirrubina hasta 20 mg/dL  
Proteínas hasta 12 g/dL  
Triglicéridos hasta 3.000 mg/dL



**Tabla IV.** Datos del estudio de imprecisión para la determinación de Folato sérico.

Muestra	Lote de Reactivo	Media (ng/mL)	Intra-ensayo		Total	
			DE (ng/mL)	CV%	DE (ng/mL)	CV%
S1	1	3,5	0,12	3,5	0,14	3,9
	2	3,6	0,14	3,9	0,17	4,7
S2	1	10,8	0,18	1,7	0,41	3,8
	2	11,2	0,21	1,9	0,44	4,0
S3	1	16,8	0,27	1,6	0,53	3,1
	2	17,0	0,24	1,4	0,61	3,6

**Tabla V.** Resultados de los estudios de precisión intra e inter-ensayo.

Muestra	Lote de Reactivo	Media (ng/mL)	Intra-ensayo		Total	
			DE (ng/mL)	CV%	DE (ng/mL)	CV%
H1	1	113,2	6,10	5,4	8,82	7,8
	2	118,1	4,69	4,0	6,49	5,5
H2	1	222,9	7,04	3,2	13,29	6,0
	2	221,9	5,59	2,5	12,19	5,5
H3	1	387,2	7,87	2,1	21,80	5,9
	2	359,1	8,90	2,5	22,97	6,4

Las muestras para determinar Fol intra-eritrocitario requieren 90 min de incubación del hemolizado a temperatura ambiente.

#### Precisión y Exactitud

El fabricante realizó el mismo esquema que para el Fol sérico, pero con 3 hemolizados (H1, H2, H3) obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla V.

Realizan también un estudio de exactitud con estándar internacional de OMS 03/178, obteniendo un porcentaje de diferencia entre -0,6–1,3% en un intervalo de confianza de 95% y realizan estudio de reactividad cruzada con 3 sustancias interferentes, obteniéndose resultados de reactividad cruzada entre -0,6–2,1%.

Immulate: Se trata de un ensayo competitivo en fase líquida.

Las muestras para la determinación en suero se deben desnaturalizar calentando a 100 °C entre 15 a 20 min y luego un enfriamiento por 5 min.

El ensayo se completa con 2 ciclos de 30 min cada uno.

#### Precisión y Exactitud

El fabricante realiza estudios de precisión intra-ensayo haciendo 20 replicados de 3 soluciones de diferente concentración en una sola tanda y precisión inter-ensayo de 20 tomas distintas de 3 soluciones. Los resultados obtenidos pueden verse en las Tablas VI y VII.



**Tabla VI.** Resultados del estudio de precisión intra-ensayo para la determinación de Folato sérico.

Solución	Media	DE	CV%
1	2,1	0,19	9,0
2	5,2	0,22	4,2
3	13	0,67	5,2

**Tabla VII.** Resultados del estudio de precisión inter-ensayo para la determinación de Folato sérico

Solución	Media	DE	CV%
1	1,8	0,16	8,9
2	5,3	0,21	4,0
3	13	0,96	7,4

Se realiza además un estudio de exactitud como recuperación con 3 soluciones de distinta concentración dando porcentajes de recuperación entre 96–119% expresado en % de observado/esperado. La única interferencia es la bilirrubina y la concentración máxima que mostró una

interferencia menor al 10% es la siguiente:  
Bilirrubina hasta 20 mg/dL.

Para la determinación de Fol intra-eritrocitario se debe incubar el hemolizado 90 min a temperatura ambiente.

El fabricante no informa el estudio de precisión para esta determinación.

#### HOMOCISTEÍNA

Architect: Las muestras para la determinación de HCT no necesitan ninguna preparación previa.

El tiempo de reacción es de aproximadamente 30 min.

#### Precisión y Exactitud

El fabricante realiza un estudio basado en el protocolo descrito en la guía EP5-A2 por el CLSI. Se analizaron por duplicado 3 controles y 5 muestras de plasma humano utilizando 2 lotes de reactivos, 2 veces al día durante 20 días, con 2 analizadores. Se generó una curva de calibración nueva para cada lote de reactivos cada día del análisis, Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VIII.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son:

Bilirrubina hasta 20 mg/dL  
Hemoglobina hasta 1 g/dL



**Tabla VIII.** Resultados del estudio de precisión intra-ensayo para la determinación de homocisteína sérica.

Muestra	Analizador	Lote Rvo.	N	Media (µmol/L)	Intra-ensayo		Total	
					DE	CV%	DE	CV%
Control Bajo	1	1	80	7,40	0,26	3,5	0,43	5,9
	2	2	80	7,58	0,18	2,4	0,25	3,3
Control Medio	1	1	80	13,21	0,26	2,0	0,64	4,8
	2	2	80	13,37	0,24	1,8	0,41	3,0
Control Alto	1	1	80	26,77	0,63	2,3	1,09	4,1
	2	2	80	25,73	0,47	1,8	0,73	3,8
Muestra 1	1	1	80	4,78	0,19	4,0	0,30	6,3
	2	2	80	4,71	0,13	2,8	0,18	3,8
Muestra 2	1	1	80	11,03	0,22	2,0	0,48	4,3
	2	2	80	10,89	0,13	1,2	0,23	2,1
Muestra 3	1	1	80	17,60	0,43	2,4	0,77	4,4
	2	2	80	17,29	0,27	1,6	0,46	2,6
Muestra 4	1	1	80	35,40	0,79	2,2	1,19	3,4
	2	2	80	34,83	0,71	2,0	0,87	2,5
Muestra 5	1	1	80	41,84	0,71	1,7	1,35	3,2
	2	2	80	41,46	0,68	1,6	1,12	2,7

Proteínas menores de 3 g/dL y mayores de 12g/dL  
Triglicéridos hasta 6000 mg/dL

Immulite: Se trata de un ensayo competitivo de fase sólida.

El pretratamiento lo realiza el instrumento y dura 30 min. El ensayo se completa con un ciclo de 30 min.

#### Precisión y Exactitud

El fabricante realiza estudios de pre-

cisión intra-ensayos procesando 4 muestras por cuadruplicado en 20 tandas, obteniendo los resultados mostrados en la Tabla IX.

Se realiza además un estudio de exactitud como recuperación con 3 soluciones de distinta concentración dando porcentajes de recuperación entre 85–108% expresado en % de observado/esperado.

Las concentraciones máximas de interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son:

## LA SOLUCIÓN EN HEMATOLOGÍA



**Orphee Mythic 22 AL**  
Total Automático 5 DIFF  
+ Bioseguridad



**GEO MC**  
Total Automático 3 DIFF  
+ Bioseguridad



**Orphee Mythic 22 OT**  
5 DIFF + Sistema Tubo Abierto



**Orphee Mythic 18**  
3 DIFF + Sistema Tubo Abierto



Bioseguridad - Sistema Tubo Cerrado  
PC + Monitor + Impresora  
Conexión a LIS



Reactivos Nacionales



Bilirrubina hasta 20 mg/dL  
Hemoglobina hasta 5,12 g/dL  
Triglicéridos hasta 3000 mg/dL

#### Holotranscobalamina

Como ya se mencionó, la HoloTC es la fracción metabólicamente activa de la B12 y reflejaría mejor y en forma más temprana la deficiencia de esta vitamina. En la actualidad existe un reactivo comercial para su determinación con el sistema Architect–Abbott.

Las muestras para este ensayo no requieren preparación previa y el tiempo de reacción es de 30 min.

#### Precisión y Exactitud

El fabricante realiza un estudio basado en el protocolo descrito en la guía EP5-A2 por el NCCLS. Se analizaron 2 controles de diferente concentración y 5 muestras de suero humano, utilizando 2 lotes de reactivos, calibradores y controles, 2 replicados, 2 veces al día durante 20 días, con 2 analizadores. Se utilizó una curva de calibración única para cada lote de reactivos durante todo el estudio, Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla X.



**Tabla IX.** Resultados del estudio de precisión intra-ensayo para la determinación de homocisteína sérica.

Solución	Media	Intra-ensayo		Total	
		DE	CV%	DE	CV%
1	3,94	0,29	7,4	0,41	10,4
2	9,88	0,47	4,8	0,75	7,6
3	11,1	0,38	3,4	0,46	4,1
4	25,9	1,06	4,1	1,31	5,1

**Tabla X.** Resultados del estudio de precisión intra-ensayo para la determinación de HoloTC en suero.

Muestra	Analizador	Lote Ave.	n	Media (pmol/L)	Intraenserie		Total	
					DE	CV (%)	DE	CV (%)
Control Bajo	1	1	80	15,42	0,64	4,2	0,76	4,9
	2	2	80	15,56	0,59	3,8	0,63	4,1
Control Alto	1	1	80	49,82	1,87	3,8	2,65	5,3
	2	2	80	47,75	1,80	3,8	2,13	4,5
Muestra 1	1	1	80	18,56	0,36	1,9	0,97	5,2
	2	2	80	16,81	0,46	2,8	0,86	5,1
Muestra 2	1	1	80	24,62	0,66	2,3	1,02	4,2
	2	2	80	22,40	0,51	2,3	0,74	3,3
Muestra 3	1	1	80	52,95	0,86	1,6	2,01	3,8
	2	2	80	48,36	1,33	2,7	2,07	4,3
Muestra 4	1	1	80	81,34	1,83	2,2	3,83	4,7
	2	2	80	72,15	2,17	3,0	3,37	4,7
Muestra 5	1	1	80	113,74	2,07	1,8	4,85	4,3
	2	2	80	100,08	4,39	4,4	5,83	5,8

Las concentraciones máximas de los interferentes que mostraron una interferencia menor al 10% son:

Bilirrubina: 20 mg/dL  
Hemoglobina: 200 mg/dL  
Proteínas Totales: 10 g/dL  
Triglicéridos: 850 mg/dL

Factor Reumatoideo: 70 UI/mL

Immulite: Esta plataforma no cuenta con reactivos para la determinación de este analito.

#### Conclusiones

Como se puede observar, en los análisis de precisión y exactitud realizados por los fabricantes, no se ven grandes diferencias entre las dos metodologías utilizadas. La mayor dificultad radica en que los ensayos en plataforma Immulite requieren más trabajo manual y eventualmente, son de más larga duración. Por lo tanto, la elección de la metodología a utilizar dependerá sólo de las posibilidades de adquisición de equipamiento y reactivos por parte de la institución a la que pertenezca cada usuario.

En lo que se refiere al *kit* de ICN Diagnostic (Kit de Radioensayo SimulTRAC-S) para la determinación simultánea de B12 y Folato, cabe destacar que ninguno de los autores tiene experiencia en el uso del mismo, pero por lo que se deduce del inserto, resulta una técnica muy laboriosa, larga (tiempos de preparación de las muestras), con mucho y minucioso trabajo manual.



#### Referencias bibliográficas

- Hamid A, Nissar AW, Jyotdeep K. New perspectives on folate transport in relation to alcoholism-induced folate malabsorption. Association with epigenome stability and cancer development. *Febs J* 2009. Publicado en línea 23 de marzo de 2009; Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2009.06959.x/full>.
- Kräuler B. Biochemistry of B12-cofactors in human metabolism. *Subcell Biochem* 2012; 56: 323-46.
- Fedosov SN. Physiological and molecular aspects of cobalamin transport. *Subcell Biochem* 2012; 56: 347-67.
- Oberley MJ, Yang DT. Laboratory testing for cobalamin deficiency in megaloblastic anemia. *Am J Hematol* 2013 Jun; 88 (6): 522-6.
- Huges CF, Ward M, Hoey L, McNulty H. Vitamin B12 and ageing: current issues and interaction with folate. *Ann Clin Biochem* 2013 Jul; 50 (Pt.4): 315-29.
- Green R, Dwyre DM. Evaluation of macrocytic anemias *Semin Hematol* Oct 2015; 52 (4): 279-86.
- Wickramasinghe SN. Diagnosis of megaloblastic anaemias. *Blood Rev* 2006; 20: 299-318.
- Hesdorffer CS, Longo DL. Drug-induced megaloblastic anemia. *New Eng J Med* 2015; 373: 1649-58.
- Zelder F, Sonny M, Prieto L. Antivitamins for medicinal applications. *Chem Bio Chem* 2015; 16: 1264-78.
- Devalia V, Hamilton MS, Molloy AM. Guidelines for the diagnosis of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol* 2014 Aug; 166 (4): 496-513.
- Stabler SP, Macell PD, Podell EI, Allen RH, Lindenbaum J. Assay of methylmalonic acid in the serum of patients with cobalamin deficiency using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1986; 77: 1601-12.
- Savage SP, Lindenbaum J, Stabler SP, Allen RH. Sensitivity of serum methylmalonic acid and homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies. *Am J Med* 1994; 96 (3): 239-46.
- Magera MJ, Helgeson JK, Matern D, Rinaldo P. Methylmalonic acid measured in plasma and urine by stable-isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2000; 46 (11): 1804-10.
- Diaz ML, Linares V. Evaluation of vitamin B12 state and folate. *Hematología* 2015; 19(3): 264-5.
- Das KC, Manusselis C, Herbert V. Determination of vitamin B12 (cobalamin) in serum and erythrocytes by radioassay, and of holo-transcobalamin II (holo-TC II) and holo-haptocorrin (holo-TC I and III) in serum by adsorbing holo-TC II on microfine silica. *J Nut Bio* Aug 1991; 2 (8): 455-64.
- Inserto Kit de Radioensayo SimulTRAC-S Vitamina B12 [57Co]/Folato [125I], ICN Pharmaceuticals Inc. Diagnostic Division.
- Miller JW, Garrod HG, Rockwood AL, Kushnir MM, Allen LH, Haan MN, et al. Measurement of vitamin B12 and holo-transcobalamin, singly and in combination in screening for metabolic vitamin B12 deficiency. *Clin Chem* 2006; 52 (2): 278-85.
- Golding PH. Holo-transcobalamin (Holo-TC, Active-B12) and Herbert's model for the development of vitamin B12 deficiency, a review and alternative hypothesis Published online Springerplus 2016; 5 (1): 668. Available from URL: [springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2252-z](http://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/s40064-016-2252-z).