

Onverwachte problemen bij de vitamine-B₁₂-bepaling

M.A. FOURAUX^{1,2}, F.M. VERHEIJEN^{1,2}, M. de KLUIS³ en J.M.T. KLEIN GUNNEWIEK³

Inleiding

Vitamine B₁₂ (VB12) wordt routinematig binnen klinisch-chemische laboratoria gemeten. Het Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium (GKCL) rapporteert per maand ongeveer 1500 VB12-uitslagen aan specialisten en huisartsen. De testen worden binnen de laboratoria uitgevoerd met een competitieve immunoassay van de firma Siemens Medical Solutions Diagnostics op het Immulite-2000- en/of Immulite-2500-platform. De VB12-bepaling wordt hoofdzakelijk als onderdeel van de screening op anemie aangevraagd en als onderdeel van een aanvraagpakket voor geriatrische patiënten. Schattingen van de prevalentie van een VB12-deficiëntie bij de laatste groep lopen op tot bijna 30 procent (1, 2). In de algemene Nederlandse bevolking is beschreven dat er bij 5 tot 10 procent een VB12-deficiëntie bestaat (3). Veelal wordt in Nederland van een te lage VB12-concentratie gesproken bij waarden lager dan 150 pmol/l. Dit is echter niet meteen een bewijs voor een functionele VB12-deficiëntie, alhoewel dit in de dagelijkse klinische praktijk vaak wel zo wordt opgevat. Een functionele VB12-deficiëntie kan worden gediagnosticeerd met behulp van het stroomschema zoals voorgesteld door Wiersinga et al. (4). In dit schema spelen de bepaling van methylmalonzuur en homocysteïne een prominente rol. Rond april 2006 werden de auteurs vanuit onafhankelijke klinieken door clinici gebeld met de vraag of er problemen met de VB12-bepaling bekend waren. Er werden naar mening van de clinici frequenter dan voorheen een VB12-concentraties lager dan 150 pmol/l gerapporteerd, niet in overeenstemming met het klinisch beeld van de betrokken patiënt. In dit artikel beschrijven we de retrospectieve analyse van de VB12-bepaling op de Immulite 2000 en 2500 in de periode januari 2005 – maart 2006.

Methoden

Om de vraag vanuit de kliniek te kunnen beantwoorden zijn retrospectief gegevens rondom de VB12-bepaling geanalyseerd. Vanaf januari 2005 tot en met maart 2006 zijn de verrichtte interne en externe (SKML-

bindingsanalyse) kwaliteitscontroles geanalyseerd. Bij de interne kwaliteitscontrole is gebruik gemaakt van de Lyphochek Immunoassay Plus Control op twee concentratieniveaus (260 en 540 pmol/l; Bio-Rad Laboratories). Vervolgens zijn van dezelfde periode ook de VB12-patiëntmaandgemiddelden bepaald. Hierbij zijn waarden groter dan 738 pmol/l (bovengrens van de gebruikte VB12-bepaling) als 738 pmol/l meegeteld. Waarden kleiner dan 111 pmol/l (ondergrens van de VB12-bepaling) zijn als 111 pmol/l meegeteld. Het aantal VB12's lager dan 112 pmol/l is als percentage van het totale aantal VB12's per maand uitgezet. Medio 2005 is binnen het laboratorium de VB12-bepaling van de Immulite 2000 overgezet naar de Immulite 2500. Om eventuele effecten van die overgang in het lage gebied te analyseren is met behulp van 2004 patiëntenmonsters in het gebied tussen 111 en 150 pmol/l een correlatiestudie uitgevoerd. De data zijn met behulp van een Passing- en -Bablok-analyse geanalyseerd. Daarnaast is met behulp van 321 onafhankelijke patiëntenmonsters de duplicerbaarheid van de VB12-bepaling getest, waarbij in voorkomende gevallen (sterk afwijkende duplowaarden) een monster vijfmaal gemeten is. Bij alle bepalingen is, tenzij anders vermeld, gebruik gemaakt van de VB12-bepaling op het Immulite-2500-platform. Specifieke informatie over lotnummers en batchnummers is bij de auteurs verkrijgbaar.

Resultaten

De dagelijkse VB12-kwaliteitscontrole op twee concentratieniveaus laat geen onacceptabele afwijkingen zien in de periode van januari 2005 tot en met maart 2006. Ook de externe SKML-bindingsanalyse rondzending, waarbij doorgaans gebruik wordt gemaakt van VB12-concentraties boven 200 pmol/l, laat geen onacceptabele afwijkingen zien (data niet getoond). Wanneer echter de VB12-patiëntmaandgemiddelden over de betreffende periode worden uitgezet (figuur 1A) is er sprake van een dalend maandgemiddelde. De gemiddelde VB12-maandconcentratie (circa 1500 patiënten per maand) in januari – maart 2005 is ongeveer 350 pmol/l, terwijl deze in januari – maart 2006 ongeveer 310 pmol/l is. Tegelijkertijd neemt het percentage VB12's lager dan 112 pmol/l toe van 1 naar 6 procent (figuur 1B). Opvallend genoeg zijn de beschreven afwijkingen reeds voor de wisseling van de Immulite 2000 naar de Immulite 2500 zichtbaar. Op basis van bovenstaande gegevens is een beperkte correlatiestudie van de VB12-bepaling verricht met

Geïntegreerd Klinisch Chemisch Laboratorium Albert Schweitzer ziekenhuis Dordrecht & RIVAS Beatrix ziekenhuis Gorinchem¹; Klinisch Chemisch Laboratorium, Ikazia ziekenhuis, Rotterdam²; Afdeling Klinische Chemie, UMC St Radboud, Nijmegen³

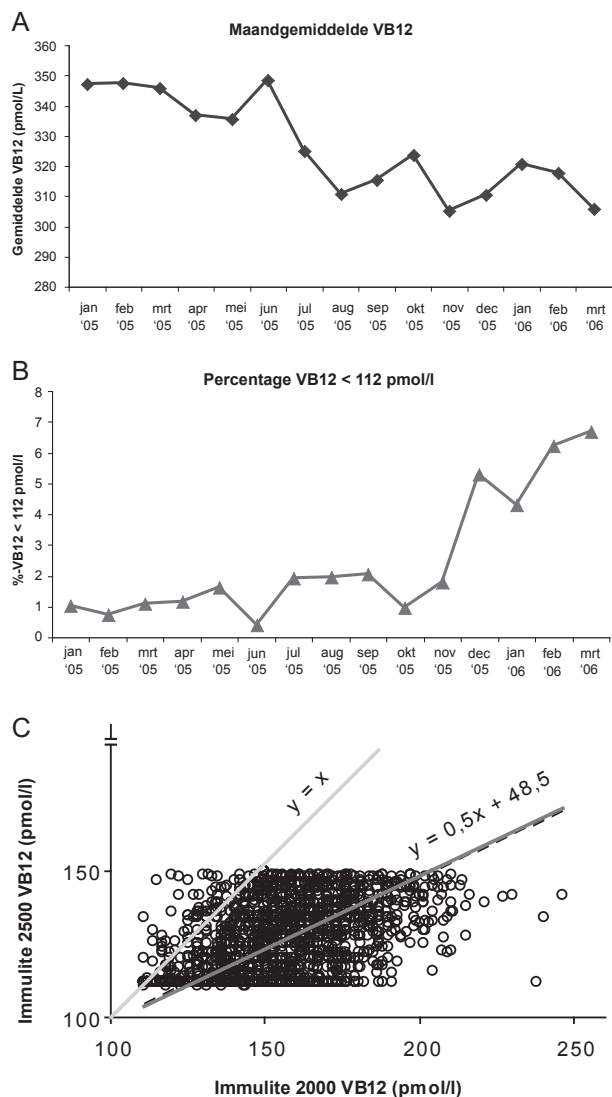
E-mail: m.fouraux@asz.nl

de Immulite 2500 en 2000. Deze studie liet zien dat de Immulite 2000 circa 25 pmol/l hogere VB12-concentraties meet dan de Immulite 2500 in het gebied tussen 111 en 150 pmol/l (data niet getoond). In een eerdere validatiestudie is deze bias niet opgemerkt, mogelijk doordat toen een groter concentratiegebied is getest. Van een aantal patiëntenmonsters met een VB12-concentratie lager dan 150 pmol/l (Immulite 2500) is de methylmalonzuur- en homocysteïneconcentratie gemeten. Deze waren niet afwijkend, suggestief voor een foutief-verlaagde VB12-concentratie. Het besluit is toen genomen om alle monsters met een VB12-concentratie lager dan 150 pmol/l opnieuw te meten met de Immulite 2000-bepaling. Van 2004 patiëntenmonsters is zowel de VB12-concentratie op de Immulite 2500 als op de Immulite 2000 bepaald. De Passing-en-Bablok-analyse is weergegeven in figuur 1C. Hierbij vallen twee zaken op. Ten eerste meet de Immulite 2500 circa 25 pmol/l lagere VB12-concentraties dan de Immulite 2000. Ten tweede is er sprake van een enorme spreiding in de bepaling. Met 324 monsters is vervolgens de dupliceerbaarheid van de VB12-bepaling op de Immulite 2500 getest. Er werd een gemiddelde variatiecoëfficiënt van 4,6% gevonden (gemiddelde VB12-concentratie 130,7 pmol/l). Dit is in overeenstemming met de claim van de fabrikant (5). Bij individuele patiënten is echter soms sprake van veel grotere variatie met onacceptabele variatiecoëfficiënten tot 33,4%.

Bovenstaande bevindingen zijn direct met de betrokken fabrikant besproken. De bevindingen zijn bevestigd door de onderzoeksafdeling van Siemens Medical Solutions Diagnostics (SMSD). Bij navraag bleken de beschreven fenomenen ook bij andere laboratoria voor te komen. SMSD is een traject gestart om de tekortkomingen van de VB12-bepaling te corrigeren. Binnenkort wordt een aangepaste VB12-kit op de markt gebracht. De karakteristieken van die VB12-bepaling zijn nog niet vrijgegeven door de firma.

Conclusie en discussie

Bovenstaande beschrijving brengt een aantal interessante punten aan het licht. Ten eerste, wat is nu precies het probleem van de VB12-test? Dit punt is helaas nog steeds niet helemaal duidelijk. Het vreemde is dat de afwijking al lijkt te zijn ontstaan op de Immulite 2000, en later na de overschakeling op de Immulite 2500 is voortgezet. Data van andere laboratoria die niet zijn overgeschakeld op de Immulite 2500, laten zien dat de afwijking na verloop van tijd, zonder duidelijke oorzaak, is verdwenen (data niet getoond). Bij de VB12-bepaling van de Immulite 2500 bleef de afwijking bestaan. Onze vergelijkingsstudie met 2004 patiëntenmonsters laat dit ook zien. Analytisch-technisch is er een groot verschil tussen de test op de Immulite 2500 en Immulite 2000. De Immulite 2000 maakt gebruik van drie incubatiecycli van ieder 30 minuten, terwijl de Immulite 2500 per cyclus 15 minuten gebruikt. Deze cycli zijn met name nodig om het VB12 vrij te maken van zijn endogene VB12-bindende eiwitten (5). Mogelijk is door het verkorten van de cyclusduur deze stap niet meer efficiënt en ontstaan zo de gevonden afwijkingen en variatie.



Figuur 1. Patiënt-maandgemiddelden VB12 (pmol/l) in de periode januari 2005 tot en met maart 2006 (A). Percentage VB12's kleiner dan 112 pmol/l per maand in de periode januari 2005 tot en met maart 2006 (B). Passing en Bablok analyse van de VB12 op de Immulite 2500 en de VB12 op de Immulite 2000 (C).

Ten tweede illustreert deze casus het gebruik van patiëntmaandgemiddelden ter controle van klinisch-chemische testen. Ondanks de niet afwijkende resultaten van de interne en externe kwaliteitscontroles, was een afwijking in de VB12-test opgetreden. Deze hadden we niet gedetecteerd zonder de meldingen vanuit de kliniek. Ter voorkoming van deze fout wordt nu standaard voor deze bepaling het patiëntmaandgemiddelde geanalyseerd. Ook wordt er naast de diverse controles routinematig een humane plasmapool getest op VB12. Deze is bereid uit vers bevroren plasma en bevat een gemiddelde VB12-concentratie van 280 pmol/l. Effecten van het onvolledig vrijmaken van VB12 van zijn endogene VB12-bindende eiwitten worden hiermee mogelijk wel gedetecteerd in tegenstelling tot de interne controles die vaak gebaseerd zijn op niet natieve en/of niet-humane componenten. Momenteel wordt in het GKCL een humane plasmapool geëvalueerd met een VB12-concentratie rond het klinische beslispunt van 150 pmol/l.

Tenslotte kunnen vraagtekens gezet worden bij de gegevens vermeld in de bijsluiters van de Immulite 2500. In de bijsluiters is de volgende correlatie beschreven: Immulite 2500 = 0,93 x Immulite 2000 + 10,7 pg/ml (5). Vertaald naar pmol/l zou een waarde van 150 pmol/l op de Immulite 2000 een waarde van 147 pmol/l op de Immulite 2500 moeten opleveren. Onze data laten zien dat dit niet klopt en dat eerder een waarde van 123 pmol/l wordt gevonden. Daarbovenop komt dat in sommige monsters een variatie van maximaal 33,4% is waargenomen. Juist in het klinisch belangrijke gebied treden dus grote afwijkingen op met implicaties voor de betrokken patiënten. Bij gedetailleerde bestudering van de door de firma gekozen correlatiemonsters valt op dat in het gebied tussen de 111 en 150 pmol/l slechts enkele monsters zijn geïncubeerd en onder de 136 pmol/l geen enkel monster (5). Hierdoor is de door ons geobserveerde bias tussen de twee methoden onopgemerkt gebleven. Samenvattend kan gezegd worden dat de problemen van de VB12-bepaling zo complex zijn, dat ze alleen

door goede en open communicatie tussen de aanvragers van labdiagnostiek, de laboratoria en de diagnosticafabrikanten goed zijn te tackelen.

Referenties

1. Baik HW, Russel RM. Vitamin B12 deficiency in the elderly. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 357-377.
2. Campbell AK, Miller JW, Green R, Haan MN, Allen LH. Plasma vitamin B12 concentrations in an elderly Latino population are predicted by serum gastrin concentrations and crystalline vitamin B12 intake. *J Nutr* 2003; 133: 2770-2776.
3. Dagnelie PC. Voeding en gezondheid – potentiële gezondheidsvoordelen en risico's van vegetarisme en beperkte vleesconsumptie in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk* 2003; 147: 1308-1313.
4. Wiersinga WJ, Rooij SEJA de, Huijmans JGM, Fischer JC, Hoekstra JBL. *Ned Tijdschr Geneesk* 2005; 149: 2789-2794.
5. Siemens Medical Solutions Diagnostics. Immulite 2500 Vitamin B12 PILKVB-8; 2006-12-29.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2008; 33: 172-174

Evaluation of blood collection tubes specific for homocysteine measurement on AxSYM, Immulite and LC-MS/MS systems

A.O. de GRAAF¹, R. de JONGE², M.H. VELMANS¹, J.C.J.M. SWAANENBURG¹ and M.J.W. JANSSEN¹

Introduction

Homocysteine is an intermediary amino acid with a reactive sulfhydryl group that is formed in the metabolism of methionine. Hyperhomocysteinemia is associated with increased risk for atherosclerotic vascular disease and thromboembolic events (1, 2). Furthermore, increased plasma homocysteine concentration is a sensitive marker for folate and vitamin B12 (cobalamin) deficiency (3). Measurement of homocysteine is complicated by sustained metabolism by red blood cells after blood collection, resulting in increase of homocysteine levels in vitro. To prevent this artifact, it is recommended that blood samples are placed and stored on ice immediately after collection (4). Samples should also be centrifuged and plasma or serum should be separated from blood cells as soon as possible. These preanalytical measures are impractical in routine blood collection and may be unsuitable for out-of-hospital facilities. Several studies have investigated the effect of different additives and anticoagulants on

the stability of homocysteine levels in blood collection tubes. The use of acidic citrate as an anticoagulant can stabilise homocysteine levels in tubes at room temperature for up to 6h (5-7). Sodium fluoride (NaF) can reduce the artifactual homocysteine increase at ambient temperature for only short periods of time (2-3h). However, the combination of NaF and EDTA may be effective in maintaining homocysteine stability at room temperature for up to several days (8). Recently, a new tube for homocysteine measurement, containing a stabiliser and Z-gel, was brought on the market by Sarstedt (Nümbrecht, Germany). According to the manufacturer's claim this tube is able to stabilise homocysteine levels in vitro at room temperature for up to 8h without centrifugation.

Methods

The stability of homocysteine was investigated in blood samples of healthy volunteers (n=10, laboratory coworkers). Three commercially available blood collection tubes specific for homocysteine measurement were tested; the HCY-Z-gel tube (S-Monovette 2.6 ml HCY/Z-gel with clot activator and unknown homocysteine stabiliser, Sarstedt, Nümbrecht, Germany), HCY-C/acidic citrate tube (S-Monovette 2.9 ml 9NC/HCY with 0.5 mol/l trisodium citrate and citric acid buffer solution at pH 4.3, Sarstedt, Nümbrecht, Ger-

Klinisch Chemisch en Hematologisch Laboratorium (KCHL), VieCuri Medisch Centrum, Venlo¹ and Afdeling Klinische Chemie, Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam²

E-mail: marceljanssen@viecuri.nl