

## Diagnostische opbrengst van standaard reflexmeting op serum methylmalonzuur voor het vaststellen van een functioneel vitamine B12 tekort

J.M.W. van den OUWELAND, A.M. BEIJERS en H.W. van DAAL

Vitamine B12, ook wel cobalamine genoemd, is essentieel voor de bloedvorming en voor een normale neurologische functie. Deficiënties kunnen ontstaan door onvoldoende inname, malabsorptie en een verhoogde behoefte. Dit kan leiden tot (macro- of normocytair) anemie en irreversibele neurologische schade als gevolg van demyelinisatie en axonale degeneratie; dit kan paresthesiën, ataxie, dementie en psychose tot gevolg hebben (1). Echter, de meeste patiënten bij wie een vitamine B12 deficiëntie wordt aangetoond, zullen bij presentatie geen symptomen hebben. Een tekort aan B12 is een veelvoorkomend probleem, vooral bij oudere patiënten. Een schatting is dat 5-10% van de Nederlandse bevolking een vitamine B12 tekort heeft (2). Vitamine B12 dient als cofactor voor een tweetal reacties: als adenosylcobalamine bij de omzetting van L-methylmalonyl-CoA naar succinyl-CoA door methylmalonyl-CoA-mutase en als methylcobalamine in de re-methylering van homocysteïne naar methionine door het methioninesynthase. Vitamine B12 deficiëntie leidt tot verhoogde bloedwaarden van zowel homocysteïne als methylmalonzuur (MMA) (3). Homocysteïne is geen specifieke marker voor B12 deficiëntie daar het door een veelvoud van factoren wordt beïnvloed (onder andere tekorten aan vitamine B12, B6 en foliumzuur, nierfalen, roken en medicatie). MMA, daarentegen is vooral afhankelijk van B12 en in mindere mate van nierfunctie en leeftijd (4, 5). Diagnostiek naar de vitamine B12 status geschiedt doorgaans door meting van de totale hoeveelheid B12 in bloed (referentie-interval 150-700 pmol/l). Van de totale hoeveelheid B12 die in het bloed circuleert is slechts een kleine fractie (6-20%) aan transcobalamine gebonden en beschikbaar voor synthesereacties op celniveau (actief B12). Voor het overige deel is het aan haptocorrine gebonden en wordt het gebruikt voor transport en opslag (inactief B12). De meting van totaal vitamine B12 ontbeert de nodige diagnostische sensitiviteit en specificiteit. Zo kan de totale vitamine B12 concentratie normaal zijn (>150 pmol/l) terwijl het actief B12 te laag is (bijvoorbeeld bij de ziekte van Crohn). Bij zwangeren is soms het omgekeerde het geval; het totale vitamine B12 blijkt verlaagd ten gevolge van een

lagere B12 verzadiging aan het haptocorrine, echter zonder dat er sprake is van een functioneel tekort. Bij een licht verlaagde serumconcentratie van vitamine B12 (100-200 pmol/l) kan bepaling van MMA en/of homocysteïne uitsluitsel geven of er een vitamine B12 deficiëntie is (1, 3). Zo valt er te differentiëren tussen enerzijds patiënten met een vitamine B12 deficiëntie en een fout-negatieve testuitslag en anderzijds patiënten zonder deficiëntie met een fout-positieve testuitslag. MMA meting biedt voordelen boven meting van homocysteïne; naast de hogere specificiteit voor het aantonen van B12 deficiëntie kan het uit dezelfde serum buis worden nabepaald die voor de meting van vitamine B12 is gebruikt. Voor homocysteïne, daarentegen, dient veelal opnieuw een bloedafname plaats te vinden waarbij tevens specifieke afnamecondities gelden (afname op ijs en dergelijke). Dit is al met al belastend voor zowel patiënt als laboratoriumpersoneel. In dit onderzoek hebben we gekeken naar de prevalentie van verhoogde MMA concentraties bij diverse serum B12 concentraties om te bezien of routinematige implementatie van MMA reflexmeting bij intermediaire B12 concentraties toegevoegde waarde heeft.

### Materiaal en methoden

Er zijn 355 (left-over) sera met B12 concentraties tussen 22 en 1476 pmol/l (ECLIA, Roche) met normale kreatinine gehalten (<110 (M), <90 (V)  $\mu$ mol/l; enzymatisch, Roche) geselecteerd voor nadere analyse op MMA. MMA referentiewaarden zijn met non-parametrische analyse bepaald in een subset van sera met hoog normale B12 concentraties (>400 pmol/l; n=87). Serum MMA werd gemeten met behulp van vloeistof chromatografie gekoppeld aan tandem massa spectrometrie (LC-MS/MS) zoals eerder beschreven (6).

### Resultaten en discussie

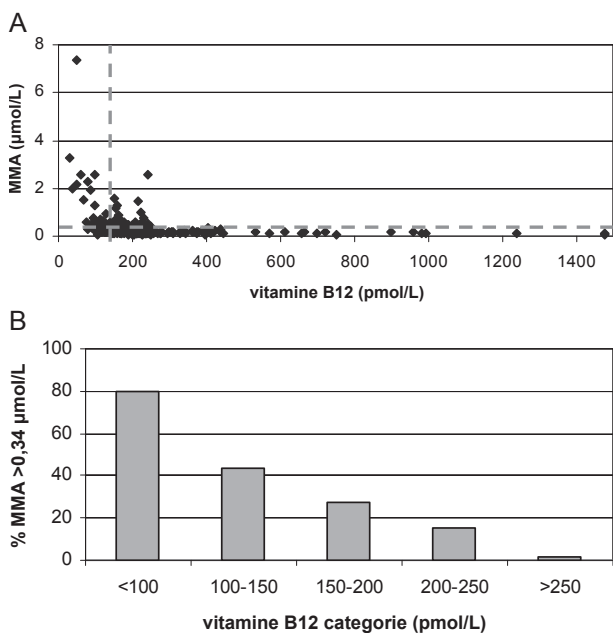
Referentiewaarden (2,5-97,5 percentiel) voor serum MMA zijn 0,05-0,34  $\mu$ mol/l. Deze referentiewaarden stemmen goed overeen met die in de internationale literatuur (4). MMA vertoont een negatieve correlatie met serum B12 ( $r=-0,22$ ;  $p<0,0001$ ). Figuur 1a geeft de relatie weer tussen serum B12 en MMA. Voor B12 concentraties van <100, 100-150, 150-200, 200-250 en > 250 pmol/l is MMA verhoogd in respectievelijk 80%, 44%, 27%, 16% en 2% (figuur 1B). Tabel 1 geeft het aantal vitamine B12 aanvragen over 2010 weer van ons laboratorium opgedeeld per categorie B12. In 2/3 van alle vitamine B12 aanvragen is de concentratie > 250 pmol/l. Met het lage percentage (2%) verhoogd MMA in deze categorie lijkt de conclusie van een vitamine B12 deficiëntie bij een serumconcentratie >250 pmol/l gerecht-

*Klinisch Chemisch Laboratorium, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen*

E-mail: j.v.d.ouweland@cwz.nl

Afkortingen: MMA, methylmalonzuur; B12, vitamine B12; TC, transcobalamine; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry

vaardigd. Hertesten op MMA in deze categorie is van beperkte toegevoegde waarde. In de veel kleinere groep met B12 concentraties < 100 pmol/l (1% van alle B12 aanvragen) zien we daarentegen in 80% een verhoogd MMA. Ook hier lijkt hertesten op MMA van beperkte toegevoegde waarde. Het absoluut aantal patiënten in deze categorie waaraan mogelijk onnodig vitamine B12 wordt voorgeschreven omdat MMA normaal blijkt is gering (ongeveer 20 patiënten op jaarbasis). In de categorie vitamine B12 aanvragen met B12 concentraties tussen 100 en 150 pmol/l (5%) zien we dat er op basis van een verhoogd MMA slechts in 44% sprake is van een functioneel B12 tekort. Dit doet vermoeden dat in deze categorie ruim de helft onnodig met vitamine B12 wordt behandeld. In de vitamine B12 categorie met laag normale concentraties tussen 150 en 200 pmol/l (11%) heeft een flink aantal (27%) een verhoogd MMA. Hier speelt dat patiënten mogelijk onterecht B12 suppletie wordt onthouden. Onze data sluiten aan bij eerdere bevindingen waarbij een laag totaal vitamine B12 slechts in 25-50% van de patiënten zou overeenkomen met een echte vitamine B12-deficiëntie op weefselniveau (5, 7). Wanneer we MMA zouden nabepalen in alle vitamine B12 sera met concentraties tussen de 100 en 200 pmol/l (17% van alle vitamine B12 aanvragen), valt in 32% een verhoogd MMA te verwachten. Opvallend is dat in de vitamine B12 categorie tussen 200 en 250 pmol/l nog 16% een verhoogd MMA heeft. Omdat deze groep in absoluut aantal even groot is als de groep patiënten met vitamine B12 concentraties tussen 100 en 200 pmol/l zal het uitbreiden van het vitamine B12 interval van 100-200 pmol/l naar 100-250 pmol/l tot een verdubbeling in het aantal MMA testen leiden. Al met al sluiten onze bevindingen goed aan bij het landelijk advies om MMA als aanvullende bepaling te hanteren bij vitamine B12 concentraties tussen 100-200 pmol/l (1).



**Figuur 1.** Relatie tussen serum MMA en vitamine B12 in patiëntensera met normale nierfunctie (n=355). A) Horizontale stippellijn geeft de MMA afkapwaarde (0,34 µmol/l) weer. Verticale stippellijn geeft het vitamine B12 afkappunt (150 pmol/l) weer. B) Percentage verhoogd MMA (>0,34 µmol/l) per vitamine B12 categorie.

**Tabel 1.** Aantal vitamine B12 aanvragen in 2010 en het te verwachten aantal met verhoogd serum MMA (>0,34 µmol/l) opgedeeld per vitamine B12 categorie (pmol/l).

Serum B12	aantal aanvragen (%)	aantal theoretisch verhoogd MMA (%)
<100	107 (1)	86 (80)
100-150	556 (5)	244 (44)
150-200	1190 (11)	321 (27)
200-250	1630 (16)	261 (16)
>250	6913 (67)	138 (2)
Totaal	10396	1050

M/V: 34%/66%; specialisten 44%, huisartsen en instellingen 56%. Leeftijd <20 jr (4%), 20-40 jr (17%), 40-60 jr (27%), 60-80 (34%), >80 jr (18%).

Op basis van onze gegevens valt te overwegen om de vitamine B12 bovengrens voor nabepaling op MMA tot 250 pmol/l op te rekken. Vitamine B12 meting in serum lijkt voorsnog de ingangstest van voorkeur te zijn waarbij de vitamine B12 status van een individu in grofweg 68% eenduidig vast te stellen valt, met 67% als voldoende (B12 >250 pmol/l) en 1% deficiënt (B12 <100 pmol/l). Afhankelijk van het gehanteerde concentratiegebied (100-200 pmol/l versus 100-250 pmol/l) zal in respectievelijk 17% en 33% van alle aanvragen een aanvullende bepaling van MMA geïndiceerd zijn.

### Conclusie

Nabepaling van MMA in sera met intermediaire vitamine B12 concentraties maakt het mogelijk te differentiëren tussen enerzijds patiënten met een vitamine B12 deficiëntie en een fout-negatieve testuitslag en anderzijds patiënten zonder deficiëntie met een fout-positieve testuitslag. MMA kan eenvoudig worden nabepaald uit sera die reeds gebruikt zijn voor de meting van vitamine B12. Ons laboratorium is dan ook doende de MMA bepaling als standaard reflexmeting in te voeren bij onderzoek naar vitamine B12 deficiëntie.

### Referenties

1. Wiersinga WJ, de Rooij SEJA, Huijman JGM, Fischer JC, Hoekstra JBL. De diagnostiek van vitamine-B12-deficiëntie herzien. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2005; 149: 2789-2794.
2. Dagnelie PC. Voeding en gezondheid – potentiële gezondheidsvoordelen en risico's van vegetarisme en beperkte vleesconsumptie in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2003; 147: 1308-1313.
3. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency – a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med.* 1999; 159: 1289-1298.
4. Vogiatzoglou A, Oulhaj A, Smith AD, Nurk E, Drevon CA, Ueland PM, Vollset SE, Tell GS, Refsum H. Determinants of plasma methylmalonic acid in a large population: implications for assessment of vitamin B12 status. *Clin Chem.* 2009; 55: 2198-2206.
5. Savage DG, Lindebaum 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: 239-246.
6. van den Ouweland JM, Beijers AM, Van Daal HW. Methylmalonzuurmeting in serum en urine met behulp van LC-tandem massaspectrometrie. *Ned Tijdschr Klin Chem labgeneesk.* 2011; 36: 260-262.
7. Matchar DB, McCrory DC, Millington DS, Feussner JR. Performance of the serum cobalamin assay for diagnosis of cobalamin deficiency. *Am J Med Sci.* 1994; 308: 276-283.