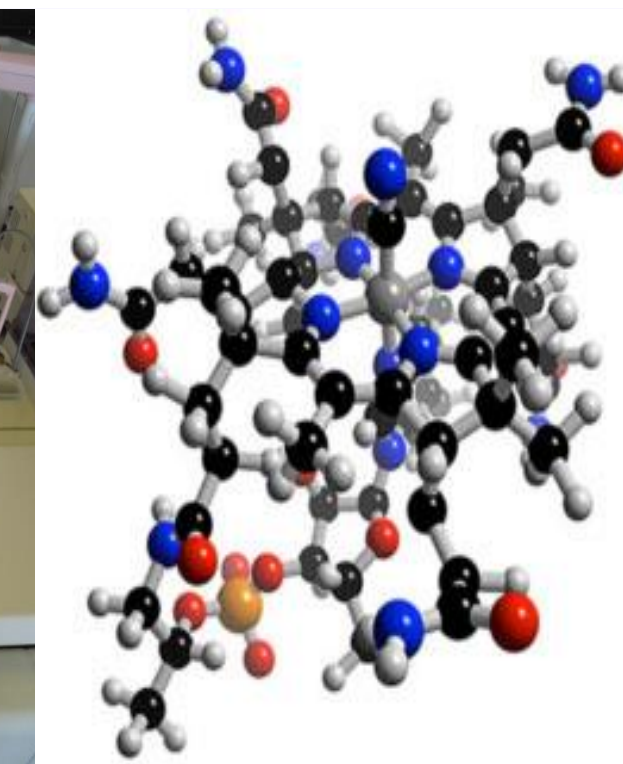


# Hypervitaminose B12: Les tests sont-ils fiables?

Luyckx F.<sup>1</sup>, Teixeira J.<sup>1</sup>, H. Valdes-Socin H.<sup>2</sup>, E. Cavalier E.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Service de Biologie CHU de Liege, CHU Sart-Tilman, Belgique  
<sup>2</sup>Service d'Endocrinologie, CHU de Liege, CHU Sart-Tilman, Belgique



## Introduction

- La carence en vitamine B12 (B12) est associée à l'anémie pernicieuse, à des troubles neurologiques et psychologiques.
- Des niveaux élevés de B12 ont été également associés à des maladies myéloprolifératives, hépatiques et, bien sûr, un traitement par voie orale ou injection de B12.
- Nous avons été confrontés récemment avec le cas d'une femme âgée de 51 ans, qui consulte pour asthénie et douleurs articulaires. Elle a des niveaux très élevés de B12 (> 2000 ng/L) mesurés avec Roche Modular, Abbott architect B12 « total » et DXI Beckman (> 1500 ng/L), sans aucun supplément de B12.
- Avant de commencer une exploration approfondie, nous avons décidé de rechercher une interférence analytique. La recherche d'anticorps Hétérophiles, anti-RF, anticorps anti-FI et anti-ACCP n'était pas contributive. Nous avons recherché la présence de complexes (IgM) - IgG - B12, de 40 % des précipitations de PEG d'après Remacha et al. La B12 mesurée sur surnageant a considérablement diminué, passant de "> 2000" à 363 ng/L ! La Chromatographie d'exclusion a confirmé la présence de « complexes B12-anticorps ».

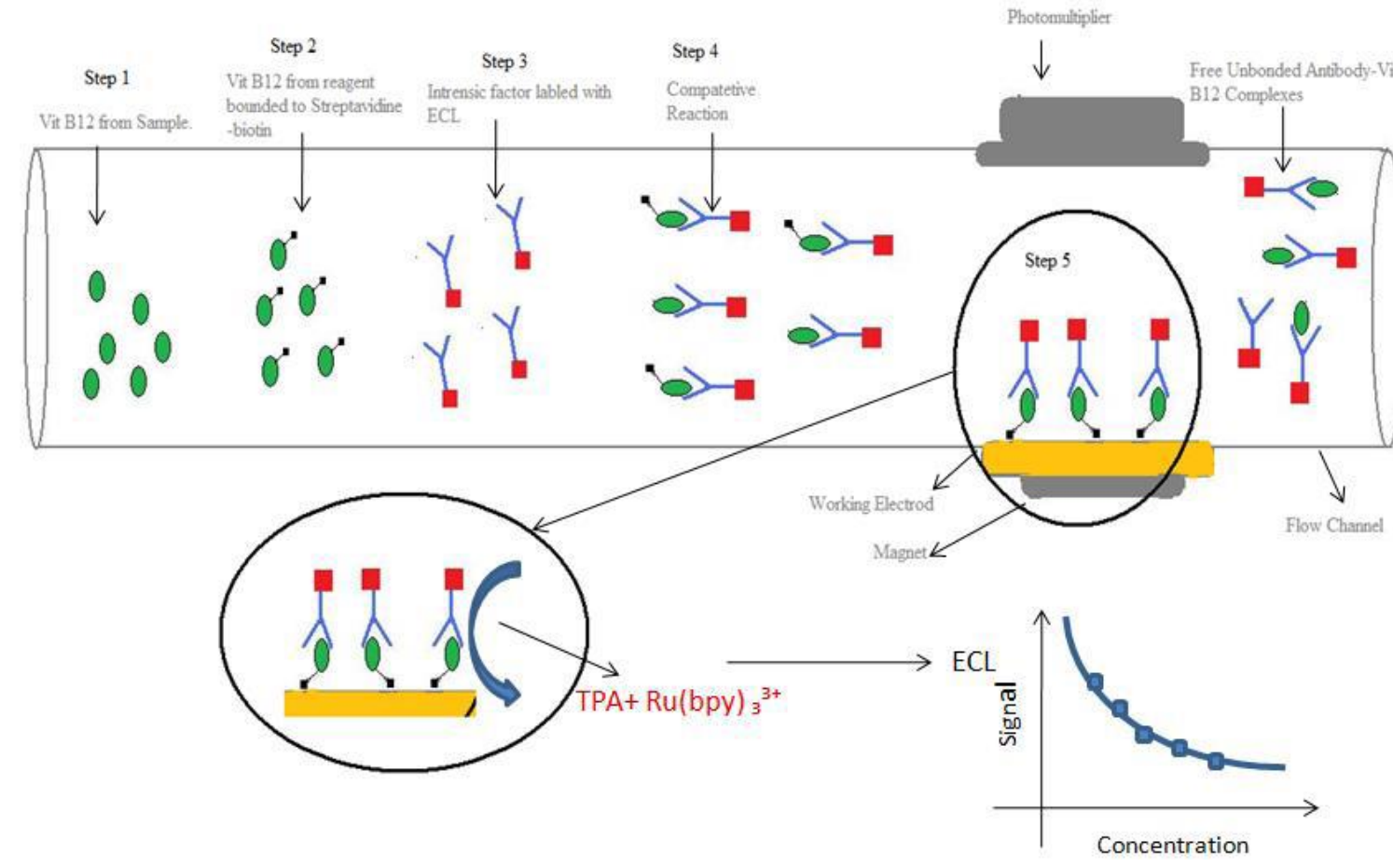


## Objectifs

- Traiter par précipitation de PEG tous les échantillons de routine avec une B12 > 2000 ng/L.
- Vérifier sur le sérum si le résultat par PEG diffère significativement du résultat initial.
- Vérifier si cette interférence affecte toutes les valeurs, en classant les échantillons par quartiles.
- Comparer les différentes techniques automatisées disponibles pour la B12 totale, avant et après précipitation par PEG.
- Tester le dosage de l'holo-transcobalamine sur les mêmes échantillons.
- Proposer des techniques alternatives et innovantes pour surmonter les interférences analytiques immunocomplexe-B12.

## Matériel et Méthodes

B12 Modular ECLIA utilise un test de compétition incluant le facteur intrinsèque et B12. La B12 de l'échantillon et la B12 marquée entre en compétition pour les sites de liaison avec biotine dans le complexe marqué ruthénium- facteur intrinsèque.



### Technique of B12 PEG precipitation :

- Prepare PEG 6000 (VWR) at 40 %
- 300 µl serum + 300 µl of 40 % PEG in a Eppendorf micro-tube and vortex
- Incubate 1 h at 37°C in the oven
- Centrifuge for 2 minutes at 2000 rpm
- Decant the supernatant into a cup
- Measure B12 Vitamin on the supernatant
- Multiply the result by 2 (dilution)
- Inter Assay Cv = 3.9 %

Interférence avec les IgG-IgM-B12 complexes ⇒ signal diminué et concentration augmentée.

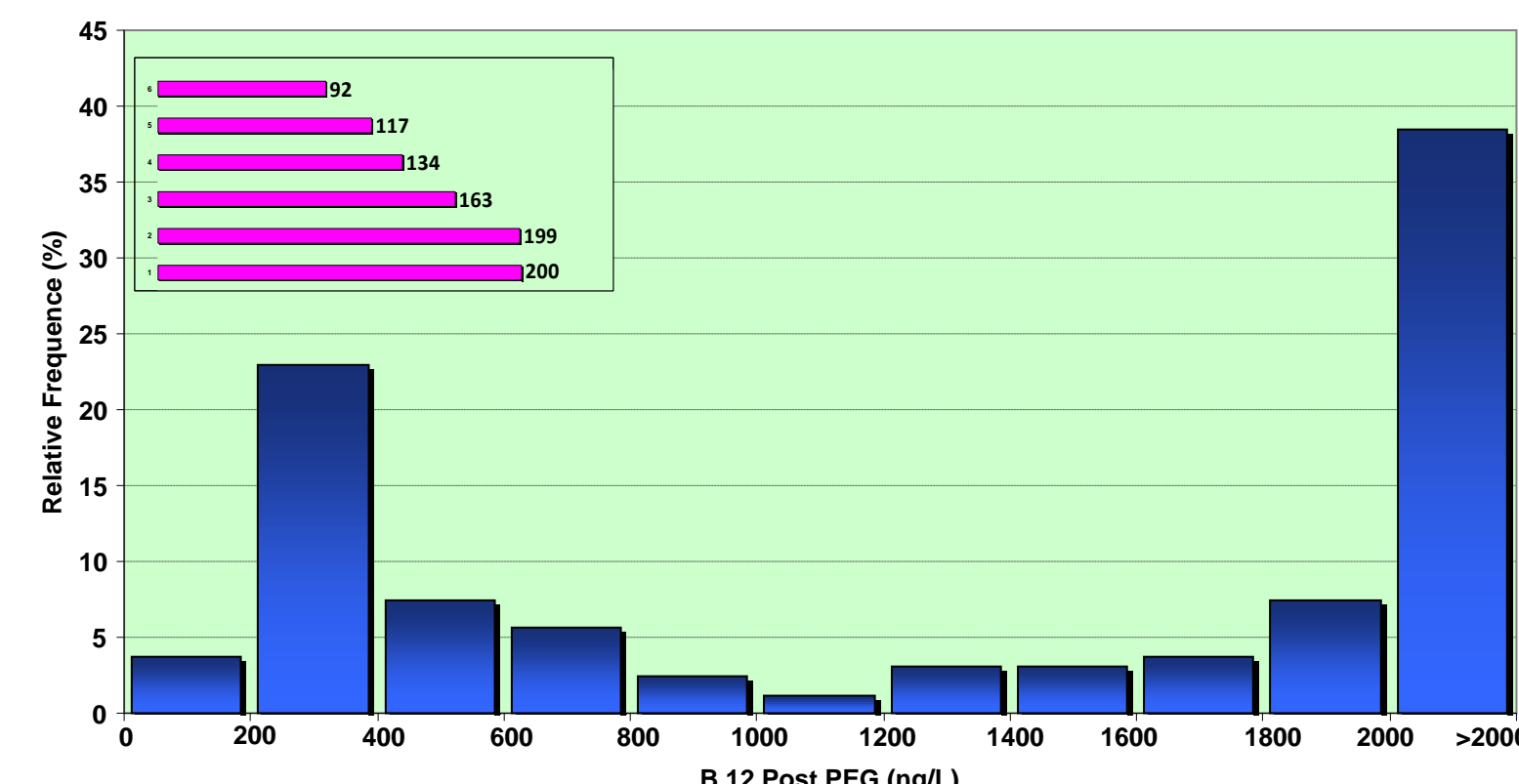
## Problèmes Techniques

Analyser	Modular E170 (Roche)	Access (Beckman Coulter)	Vista (Siemens)	Architect (Abbott)
Test	Total B12	Total B12	Total B12	Holo-transcobalamine
Methodology	ECLIA Competition	ECLIA Competition	ECLIA Competition	MEIA
Repeatability (%)	0,6 to 4,3	4,8 to 11,4	1,2 to 3,5	1,6 to 4,4
Reproducibility (%)	2,2 to 6,1	6,6 to 11,4	1,9 to 7,6	3,3 to 5,8
Measuring range	30 to 2000 ng/L	50 to 1500 ng/L	60 to 2000 ng/L	5-128,4 pmol/L
Reference value	191 to 663 ng/L	180 to 914 ng/L	182-625 ng/L	25,1 to 165 pmol/L
Standardization	RIA Bio-Rad	??	OMS 03/178	??

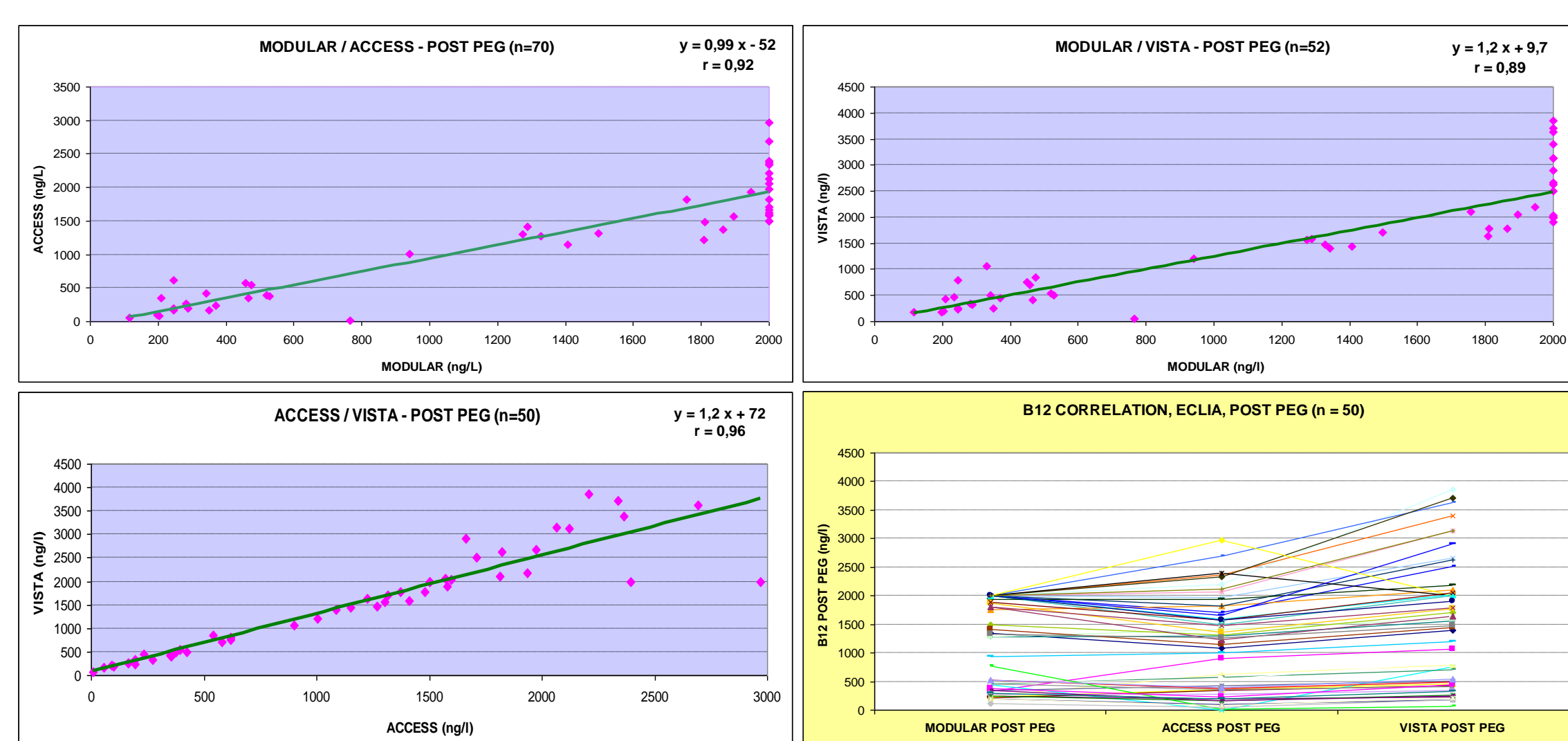
- Difficulté pour définir les valeurs de référence.
- Différentes valeurs de linéarité (> 2000, > 1500 ng/L) and une dilution n'est pas conseillée.
- Absence de standards.
- Interférences : ac hétérophiles, anti-RF, anti-FI and anti-ACCP Antibodies
- Présence de complexes (IgM)-IgG-B12 ?
- Holo-TC : pas de linéarité dans les valeurs de référence.

## Résultats

- 2 % des patients ont un taux de B12 > 2000 ng/L (n=161)
- Après PEG : 38 % restent > 2000 ng/L, 19 % diminuent leur taux entre 1000 and 2000, 8 % entre 600 et 1000, 31 % entre 200 et 600 et 4 % (6 patients) diminuent < 200 ng/L (= B12 déficience !)

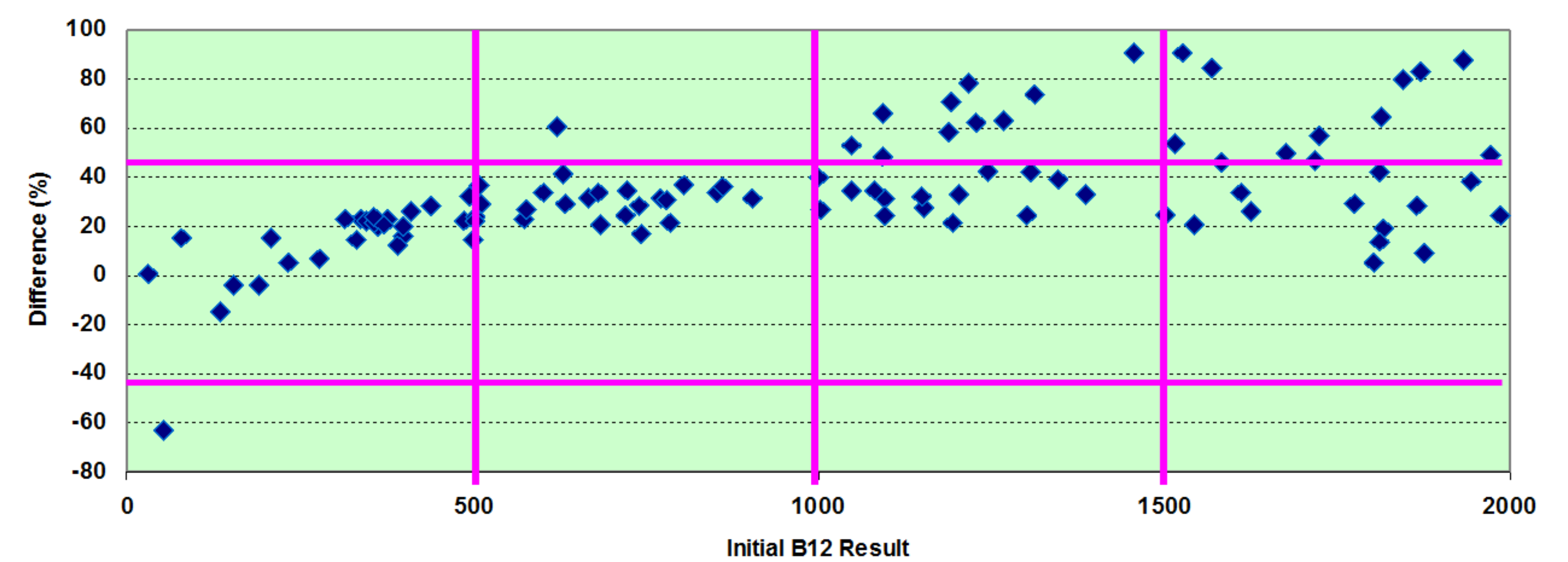


- Les échantillons avec une Vitamine B12 >2000 ng/L avec MODULAR étaient >2000 ng/L avec VISTA et > 1500 ng/L avec le système ACCESS.
- Les techniques 3 ECLIA avaient une bonne corrélation après précipitation 40 % PEG.

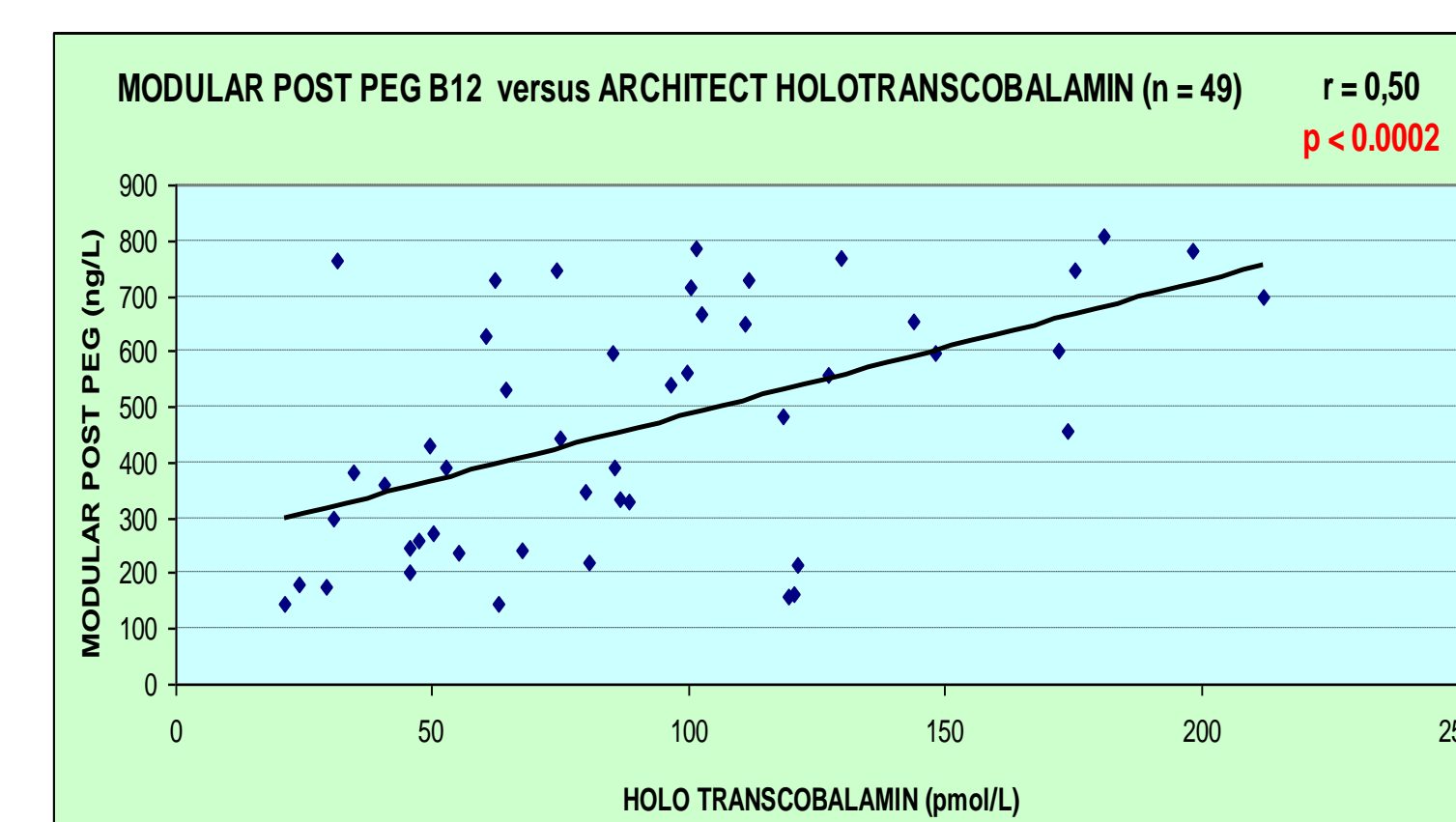


- Nous avons sélectionné 100 échantillons répartis dans 4 quartiles, avec des niveaux de B12 modulaire entre 0-500, 500-1000, 1000 à 1500 et 1500 à 2000 ng/L et traités par PEG.

- La différence essentielle, 45 % (3 x intra-individuelle CV) a été dépassée chez 23 patients (23 %), entraînant une interprétation clinique erronée, surtout pour les valeurs supérieures à 1000 ng/L.



- Corrélation entre Modular Post PEG B12 et Architect Holotranscobalamine (p < 0.0002)



## Solutions Alternatives

	Avantages	Inconvénients
<b>Total B12</b>	sensibilité acceptable mesure simple	mauvaise spécificité Beaucoup d'interférences
<b>Post PEG B12</b>	sensibilité acceptable Pas d'interférence avec IgM-IgG-B12 complexes	Essai nécessitant deux interventions supplémentaires
<b>Holo-Transcobalamine</b>	sensibilité acceptable, marqueur précoce Active B12, available for tissues	Il n'y a pas d' preuves d'une supériorité clinique dans le diagnostic. Perturbé chez les patients avec insuffisance rénale et syndrome inflammatoire.
<b>Homocystéine</b>	Bonne sensibilité	mauvaise spécificité Test perturbé chez les patients avec insuffisance rénale et hypothyroïdie.
<b>Méthylmalonic acid</b>	Bonne sensibilité	Bonne spécificité Test perturbé chez les patients avec insuffisance rénale

## Conclusions

- L'hypervitaminose B12 est une anomalie plus fréquente que l'hypovitaminose B12: elle concerne 12 à 20 % des patients et peut représenter un défi diagnostique et thérapeutique pour le clinicien et le biologiste.
- Certains auteurs ont attiré l'attention sur des causes d'hypervitaminose B12 liés à une interférence due à des complexes immunologiques, qui augmentent artificiellement les valeurs mesurées toutes les techniques de ECLIA.
- Rien n'est encore fait par les fournisseurs de réactifs, pour résoudre cette interférence analytique.
- Nous proposons une solution alternative simple, incluant la précipitation au PEG et le dosage de B12 sur le surnageant, pour supprimer cette interférence fréquente.
- D' autres moyens méritent d'être explorés, tels que la mesure de holotranscobalamine, acide méthylmalonique ou de l'homocystéine, pour diagnostiquer une carence réelle en vitamine B12.

## Bibliographie

- Markedly increased B12 Vitamin concentrations attributable to IgG-IgM-B12 Vitamin immune complexes - Raffick A.R. Bowen et al, *Clinical Chemistry*, 2006, 52 : 11, 2107-2114.
- An IgG complexed form of B12 Vitamin is a common cause of elevated serum concentrations - Jinny Jeffery et al, *Clinical Biochemistry*, 2010, 43, 82-88.
- Markedly increased B12 Vitamin concentration due to immunological interference - Khansa Chaabouni, *Ann Biol Clin*, 2014, 72, 129-130.
- Immune complexes and persistent high levels of serum B12 Vitamin - A. F. Ramacha, *Jnl Lab Hem*, 2014, 36, 92-93.
- Holotranscobalamine as an indicator of B12 Vitamin deficiency in gastrectomized patients - Young Kyung Lee et al, *Ann of Clin Lab Science*, 2009, 39, 4, 361-366.
- Comparison between serum holotranscobalamine and total B12 Vitamin as indicators of B12 Vitamin status - Al Aisari F, *Oman Med Jnl*, 2010, 25, 9-12.
- Measurement of B12 concentration : a review on available methods - O. Karmi et al, *IIOAB Jnl*, 2011, 2, 23-32.
- Holotranscobalamine versus Total Vit B12 as Indicators of Vit B12 deficiency in Thyrogastric Syndrome. I. Vranken, Cavalier, Valdes-Socin. *Acta Gastroenterologica Belgica* 2013 (abstract)

