

CAT :
Zin of onzin van bepaling folaat
(in rode bloedcellen)

Ilja Depoortere
20/03/2018

Promotor : Dr. Marieke Criel

Vragen

Folaat

- (te) frequent aangevraagd ($>$ macrocytaire anemie)
- vaak samen met folaat in RBC

1. Wat is de beste strategie om folaatdeficiëntie na te gaan ?

Is er een meerwaarde voor bepaling van folaat (in ) ?

2. Verschillende methoden en cut-off waarden

→ verschil in prevalentie deficiëntie

→ standaardisering ?



Overzicht

A/ Folaat:

1. Bron
2. Farmacokinetica
3. Oorzaken deficiëntie
4. Symptomen en gevolgen deficiëntie
5. Diagnose
6. Behandeling

B/ Zin of onzin van bepaling folaat (in rode bloedcellen)

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic

D/ Retrospectieve studie Imelda

E/ Benchmark

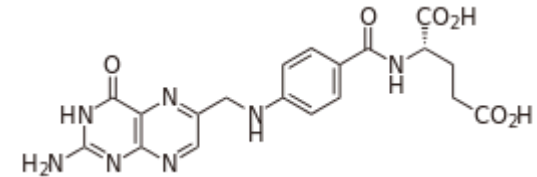
F/ Financiële factor

G/ Besluit op vragen

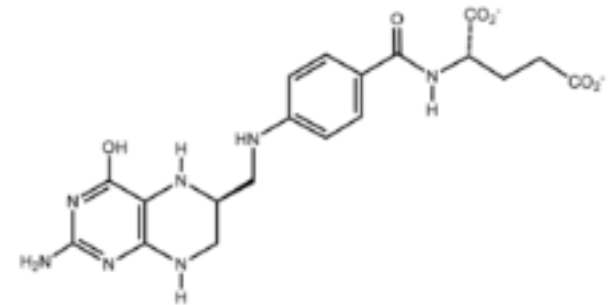
H/ To do

1. Bron folaat (vit B11)

- Foliumzuur (chemische synthese!)
voedingssupplementen / verrijkte voeding

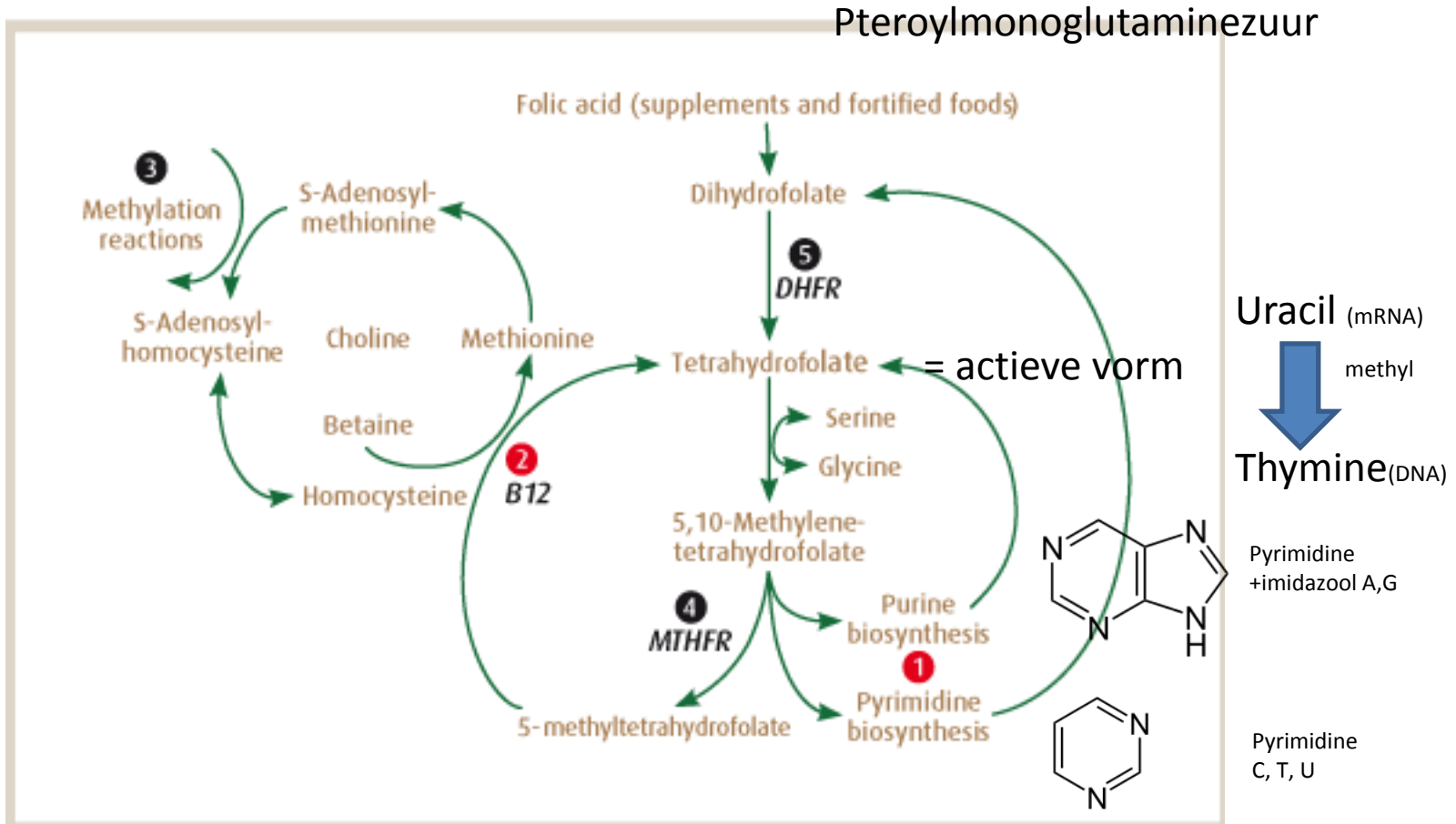
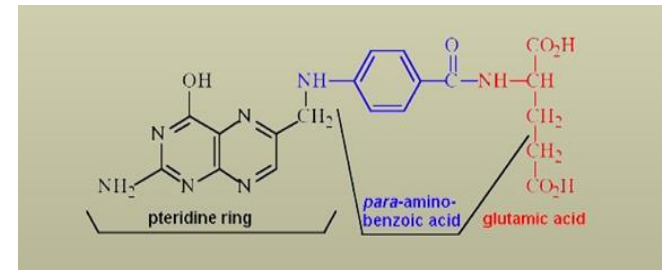


- Folaat (anionische vorm) :
vnl. bladgroenten, bloemkool,
broccoli, erwten/bonen, spruiten,
noten, amandelen,
sommige citrusvruchten...
Én lever



→ Aangeraden dosis 400 µg

2. Farmacokinetiek



Methionine
 ↑ vit B12
 5-MTHFZ
 Homocysteïne
 en
 Glycine
 ↑ 5-MTHFZ
 Serine

AZ synthese

DNA synthese

CAVE: - vitamine B12 deficiëntie niet missen!
 - 'trapping folaat' igv. vit B12 deficiëntie → serumfolaat ↑

2. 'Farmacokinetiek'

- Absorptie : via dunne darm (cave koken, polyglutamaat)
- Distributie :
 - Rode bloedcel (95%) : opslag enkel tijdens erythropoïese
 - Serum (5%) : 2/3 vrij, 1/3 gebonden aan eiwitten
 - Voedselinname : snelle invloed op folaat serum
trage invloed op folaat rbc (pas na 3-4 m)
 - Lever, 4w voorraad
- Metabolisatie : enterohepatisch (*cave alcohol*)
- Excretie : via de gal, via de urine en faeces

3. Oorzaken deficiëntie

Megaloblastische anemie: oorzaken van foliumzuurdeficiëntie

- **Inadequaat dieet : armoede, instellingen, alcohol...**
- **Malabsorptie : glutenenteropathie, pancreas-aandoeningen, levercirrose, darmlymfoma, -amyloidosis, tropische spruw**
- **Verhoogd verbruik ; hemolytische anemie, zwangerschap, prematuriteit, inflammatoire ziekten, kanker...**
- **Excessief verlies : dialyse**
- **Medicatie : anticonvulsiva (diphantoine), sulphasalazine, barbituraten**
- **Foliumzuurantagonisten, bvb methotrexaat, Daraprim°, trimetoprim (Bactrim °)**

= Meest frequent

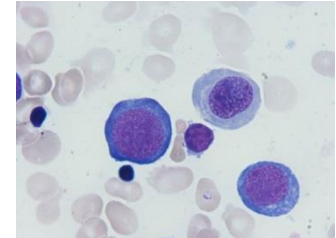
Altijd foliumzuur
supplementeren!!!

4. Gevolgen / symptomen deficiëntie

1. GESTOORDE DNA SYNTHESE :

- Beenmerg :

- Ineffectieve erythropoïese : megaloblastair
(kern-cytoplasma uitrijpingsdissociatie tgv. vertraagde celdeling)
→ BM: reuzevormen in 3 reeksen vnl. erythroblasten
→ perifeer: macrocyten, reuzesegmenten (hypersegmentatie), reuzetrombocyten
- Intramedullaire hemolyse
→ BM: hypercellulair
→ Perifeer : milde anemie (ev. andere cytopenieën), hemolyse



- Snel delende weefsels

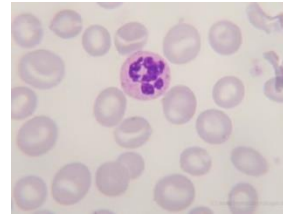
- Foetus → spina bifida...
- Slijmvliezen, haarwortels → glossitis
- Zenuwstelsel → perifere neuropathie, cognitieve ↓, slapeloos, moe, zwak, rusteloze benen...

2. GESTOORDE AZ SYNTHESE : VERHOOGD HOMOCYSTEÏNE

Cardiovasculair risico ↑ (trombosevorming)

5. Diagnose

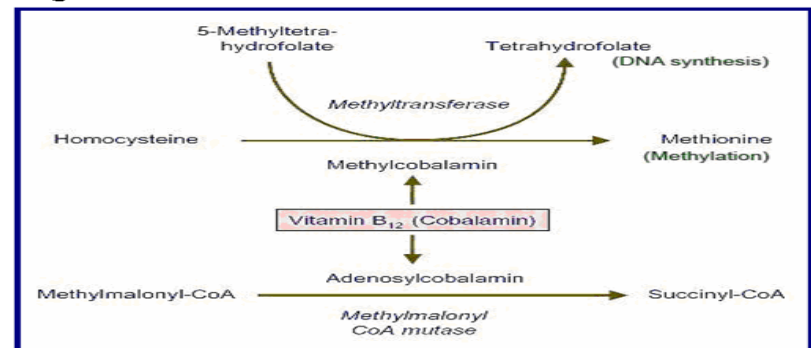
1. Anamnese ! anemie / neuropathie , dieet, alcoholisme, malabsorptie
2. Bloedresultaten:
 - macrocytaire anemie (ev. pancytopenie) : laag Hb, hoog MCV, reticulocyten ↓
 - hemolyse : indirect bili en LDH ↑, haptο ↓
3. Perifeer bloeditstrijkje :
 - * Macro-ovalocyten
 - * Hypersegmentatie granulocyten
 - hoge PPV voor folaat of vitB12 def.!
 - (* Reuzebloedplaatjes)
4. Vitamine B12 !!!! en folaat
 - vit B12: hogere prevalentie, mag niet gemist worden!
 - folaat : lage pretest probabiteit, zelfs zo macrocytaire anemie



Ev. aanvullend:

5. MMA nl. en Homocysteïne ↑
(MAAR: beide ↑ bij vit. B12 deficiëntie)
6. Beenmerg : zo uitgesproken anemie of
geen beterschap 14 dagen na R/
→ afwijkingen in 3 mergreeksen (zie hierboven)

Figure 1: The Biochemical Role of Cobalamin



6. Behandeling



- Oorzakelijk
- FZ substitutie 4 mg/d
 - ev. empirisch obv. macrocytaire anemie
(vitamine B12 deficiëntie uitsluiten !)
- Controleer Hb en MCV na 2w
- Stop substitutie zodra volledig hematologische respons
 - (zeldzaam levenslang nodig)

Overzicht

A/ Folaat

B/ Zin of onzin van bepaling folaat (in rode bloedcellen)

1. Bepaling in labo van SF
2. Bepaling in labo van RCF
3. Algemene bedenkingen
4. Pro-contra RCF

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic

D/ Retrospectieve studie Imelda

E/ Benchmark

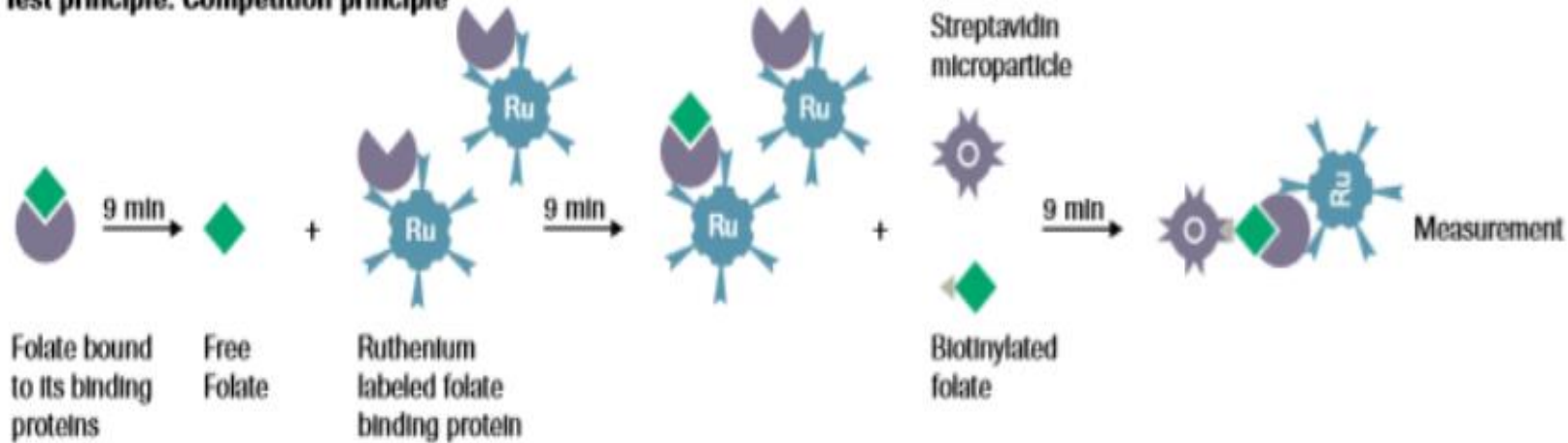
F/ Financiële factor

G/ Besluit op vragen

H/ To do

1. Bepaling in labo : Folaat in serum (ECLIA)

Test principle: Competition principle



(1) Voorbehandeling

= eiwitgebonden folaat vrijmaken

-PT1: pretreatment reagens 1 (MESNAI)
-PT2: pretreatment reagens 2 (NaOH)

(2) Folaat complexvorming:

Ruthenium gelabeld AL + gebiotinyleerd AL + Streptavidine gecoate partikels aan vaste fase

(3) Meetcel

-partikels magnetisch gecaptureerd op elek. (rest wegwassen ProCell)
-spanning over elektrode → Ruthenium in aangeslagen toestand bij terugkeren naar grondtoestand wordt elektron vrijgemaakt
= gaat gepaard met emissie van licht (=chemieluminescentie)
→ gemeten door fotomultiplier.

Verlaagd folaat gedefinieerd als <3,89 ng/mL (nl. 3,89- 26,8 ng/mL)

2. Bepaling in labo : Folaat in rbc (volbloed EDTA) (ECLIA)

1. Voorbehandeling :

ascorbinezuuroplossing toevoegen:

90 min. incuberen (donker)

→ rode bloedcel lysis -> intracellulair folaat komt vrij
= hemolysaat

2. Procedure zoals folaat in serum

(voorbehandeling en complexvorming)

3. Het bekomen resultaat wordt in het LIS gecorrigeerd
(verdunning voor hemolysaat en hct waarde van volbloedstaal)

Verlaagd folaat in rbc gedefinieerd als <523 ng/mL

3. Algemene bedenkingen

1. Bepaling folaat (te) frequent aangevraagd
2. Niet-specifieke test
licht – °C - hoog eiwit – antifolaten (methotrexaat) - FZ- vit B12...
niet alle gemeten vormen biologisch actief
3. Lage pretest probabiliteit (zelfs zo macrocytaire anemie)
4. Resultaat heeft weinig invloed op de behandeling

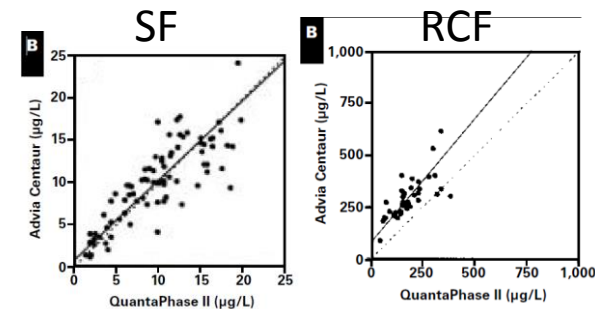
4. Pro – contra folaat RBC

- PRO :
1. Reflecteert reserve
 2. Minder onderhevig aan schommelingen tgv.
 - Recente voedselinname
 - Alcohol, zwangerschap en anti-epileptica



CONTRA : 1. Minder goede methode vergelijking (inter-laboratorium)

2. Grotere analytische imprecisie (intra-laboratorium) tgv.
 - Verschillen in staalvoorbereiding (manueel hemolysaat)
 - Incomplete lyse van RBC
 - ‘Folate trapping’
 - » door oxyhemoglobine (tgv. denaturatie hemoglobine)
 - » tgv. vitamine B12



Overzicht

A/ Folaat

B/ Zin of onzin van bepaling folaat (in rode bloedcellen)

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic

D/ Retrospectieve studie Imelda

E/ Benchmark

F/ Financiële factor

G/ Besluit op vragen

H/ To do

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic (1999-2009)

1. Folaatdeficiëntie is zeldzaam
 - 152166 SF en 15708 RCF bepalingen
 - prevalentie SF deficiëntie : 0,39% (<3 ng/mL)
 - prevalentie RCF deficiëntie : 0,27% (<140 ng/mL)
 - **1082** patiënten: simultane bepalingen
 - prevalentie SF én RCF deficiëntie: 0,09%

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic (1999-2009)

1082 simultane bepalingen		Serum folaat (3 ng/mL cut-off) (≈ bij ons 3,9 ng/mL)	
		Deficiënt	Normaal
Rode bloedcellen folaat (140 ng/mL cut-off) (≈ bij ons 523 ng/mL)	Deficiënt (<140)	1 (0,09%)	4 (0,4%)
	Normaal (>140)	8 (0,7%)	1069 (98,8%)

2. Goede correlatie SF – RCF
3. Misdiagnose deficiëntie zo enkel SF aangevraagd =zelden (4)

én klinische impact is beperkt (slechts 1/4 patient behandeld met FZ)

→ geen extra klinische meerwaarde bepaling RCF : test afgeschaft

Gemiste casussen

- 1) 6 jarige jongen:
folaat transporter deficiëntie -reeds folaat
- 2) 58 jarige man:
jicht, AHT, hyperlipidemie
normaal Hb en MCV
- 3) 65 jarige man:
chronische diarree, vermoedelijk ethyl
normaal Hb – MCV licht gestegen 100.3 fL
- 4) 51 jarige man:
gangstoornis, ethyl, VG vit B12 def. (nu nl.)
normaal Hb – MCV 115.1 fL **R/ folaat**

Overzicht

A/ Folaat

B/ Zin of onzin van bepaling folaat (in rode bloedcellen)

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic

D/ Retrospectieve studie Imelda
Kritische bedenkingen

E/ Benchmark

F/ Financiële factor

G/ Besluit op vragen

H/ To do

Retrospectieve studie Imelda

01/07/2016-30/06/2017

1. Prevalentie folaatdeficiëntie op alle bepalingen

	Totaal # Folaat bepalingen (8751)	# folaat deficiëntie	% folaat deficiëntie	Vgl. Mayo Clinic
Folaat in serum	5932	1014	17,1% (<3,9 ng/mL)	0,39% (<3 ng/mL)
Folaat in rbc	3844	156	4,1% (<523ng/mL)	0,22% (<140 ng/mL)

→ Prevalentie folaat'deficiëntie' bij ons hoger

Retrospectieve studie Imelda

2. Indicatie bepaling (macrocytaire anemie) niet altijd correct

	Totaal # bepalingen met gekend Hb en MCV	Anemisch	Macrocytair	Macrocytaire anemie
Mannen	3790	1757 (46,3%)	464 (12,2%)	328 (8,6%)
Vrouwen	4737	1601 (33,8%)	474 (10%)	249 (5,2%)
Totaal	8527	3358 (39,3%)	938 (11%)	577 (6,7%)

→ slechts in 6,7% van de folaatbepalingen macrocytaire anemie

Retrospectieve studie Imelda

3. Prevalentie folaatdeficiëntie in de groep met macrocytaire anemie

	Macrocytaire anemie	# Folaat deficiëntie in serum	# Folaat deficiëntie in rbc	# Folaat deficiëntie in serum en/of rbc	% Folaat deficiëntie in serum en/of rbc
Mannen	328	55	2	56 (1 simultaan)	17%
Vrouwen	249	41	5	44 2 simultaan)	17,6%
Totaal	577			100	17,3%

→ Vergelijkbaar met totale groep (17,1%)
vergelijkbaar bij mannen en vrouwen

Retrospectieve studie Imelda

4. Prevalentie vit B12 deficiëntie in de groep met macrocytaire anemie

	Macrocytaire anemie	# patiënten waarbij vit B12 bepaald	# patiënten met vit B12 deficiëntie	% patiënten met vit B12 deficiëntie
Mannen	328	316	27	8,5%
Vrouwen	249	241	140	58%
Totaal	577	557	167	30%

→ Prevalentie vitamine B12 deficiëntie groter dan folaat deficiëntie

Retrospectieve studie Imelda

5. Simultane bepaling folaat in serum en RBC

1025 simultane bepalingen		Serum folaat (3,9 ng/mL cut-off)	
		Deficiënt	Normaal
RBC folaat (523 ng/mL cut-off)	Deficiënt (<523)	33 (3,2%)	7 (0,7%)
	Normaal (>523)	142 (13,8%)	843 (82,2%)

1. Prevalentie simultane deficiëntie laag! nl. 3,2%
2. Iets minder goede correlatie tss beide bepalingen ivm. Mayo
3. Misdiagnose folaatdeficiëntie zo enkel SF aangevraagd = zelden (7)
 én klinische impact is beperkt (slechts 1/7 behandeld met FZ)

'Gemiste' casussen

		Folaat serum (<3,9)	Folaat rbc (<523)	Hb (< 13,5 ♂ <12 ♀)	MCV (>100)	VitB12 (<197)	
1	♂, 49j	4,5	426	13,2	104,6	153	Totale gastrectomie gehad, vit B12 substitutie gestart
2	♀, 88j	5,8	468	17,4	92,8	400	/
3	♀, 88j	5,15	469	15,9	90,9	255	/
4	♀, 52j	4,11	491	15,9	100,4	229	/
5	♂, 71 j	4,56	503	14,2	92,1	257	Rectumcarcinoom, waarvoor chemo
6	♂, 78 j	4,9	508	16	97,4	258	Bilroth II resectie maag, coloncarcinoom
7	♀, 81 j	4,55	512	14,4	95,7	254	Rectumcarcinoom

Slechts in 1 casus macrocytaire anemie met tevens vitamine B12 deficiëntie waarvoor substitutie.

Kritische bedenkingen omtrent prevalentie≠

1. Aangerijkt voedsel

- US Food and Drug Administration :
aanrijking alle graanproducten sinds '97
(ervoor hogere prevalentie tot 18,3% (*))
- Europa en België : nog geen fortificatie
CAVE : mogelijks nadelige effecten substitutie



(neurotoxisch, oncogeen, verminderde werking van antifolaten)!

2. Verschillende methodes en cut-off waarden

- RIA, microbiologische assays, CBP (≠affiniteit voor ≠folaten)
- Onvoldoende consensus voor LRL

→ grote verschillen in interpretatie resultaten

→ Meer nood aan standaardisering

3. Extern kwaliteitscontrole materiaal

(*) Ganji V. Kafai R. Trends in serum folate, RBC folate, and circulating total homocysteine concentrations in the United States: analysis of data from National Health and Nutrition Examination Surveys, 1998-1994, 1999-2000, and 2001-2002. J Nutr 2006; 136:153-8.

Kristensen et al. : Methodes en cut-off waarden:

5 componenten (oa. folaat) met 5 ≠ CPB assay's (38 labo's)

Target : (Roche + Abbott + Siemens) / individueel resultaat

1. Bias aanvaardbaar (als enige!) tgv. grote biologische variatie (Ricos)

		Bias from the target value					
	Target	Goal (< 19,2%)	Architect	Unicel	Cobas	Modular	Advia
Folate (nmol/L)	14	< 2.7	-1.4	-1.5	2.1	0.6	0.1

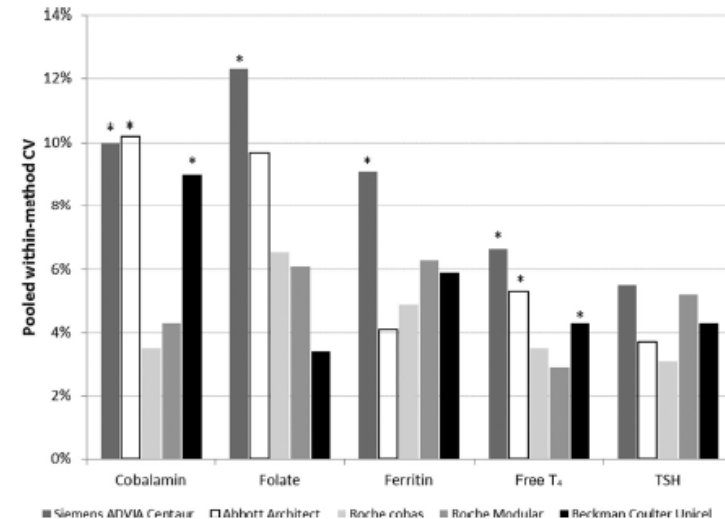
2. Lage methode herhaalbaarheid

(CVa = within method CV) (goal <12%)

Advia : niet aanvaardbaar

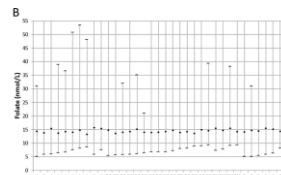
Architect en Roche: aanvaardbaar

Unicel : laag (maar slechts 2 labo's)



3. Methode afhankelijke RI compenseren niet voor methode-afhankelijke verschillen

$$RI = \text{Target} \times (\text{URL of LRL})$$



Roche WHO-calibratie Folate III (01/2016)

CUT OFF

	BioRad Quantaphase	WHO Technical consultation
Ref. Standaard	RIA	Homocysteïne
Ref. Waarde	4,6 ng/mL	3,9 ng/mL

MAAR : veel meer folaat'deficiënties' (7,8% in 2014 → 17% in 2016)

- Controle WHO IS : OK
- Extern Qcomité (Roche gebruikers) : gem. verschuiving 20% over hele meetgebied tot 60% in LRL !!
- Roche : nieuw populatie onderzoek : 404 serumstalen - normaal homocysteïne – niet zwanger / borstvoeding

	2,5 percentiel (oude cohorte)	2,5 percentiel (nieuwe cohorte)
Folaat III	4,6 ng/mL	5,41 ng/mL
Folaat III gerestandaardiseerd		3,89 ng/mL

- Ferraro et al. : 322 serumstalen – normaal MCV – geen hemolyse – geen suppletie
LRL 2,9 µg/L – gem. 4,1 µg/L – URL 5,6 µg/L

→ Overschatting deficiëntie ! Nieuw bevolkingsonderzoek nodig!

Externe kwaliteitscontrole

EQC niet uitwisselbaar! (buiten 95% voorspelbaarheidsinterval) ?

→ Slechte intermethode vergelijking (vnl. in lage conc.)

	Architect	Advia	Unicel	Cobas	Modular
EQC1(liquid)					
EQC2(gelyophiliseerd)					

→ Niet nuttig voor harmonisatie

→ Andere QC materialen nodig !

Overzicht

A/ Folaat

B/ Zin of onzin van bepaling folaat (in rode bloedcellen)

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic

D/ Retrospectieve studie Imelda

E/ Benchmark

F/ Financiële factor

G/ Besluit op vragen

H/ To do

E/ Benchmark

	Ziekenhuis	Toestel	Methode	Ref. Waarde SF ($\mu\text{g/L}$)	Ref. waarde RCF ($\mu\text{g/L}$)
RCF uitgevoerd	A	Cobas (Roche®)	ECLIA	>3,9	>523
	B	Modular E (Roche®)	ECLIA	>4	>523
	C	Dimension Vista (Siemens®)	CLIA	3,1 – 17,5	140-628
	D	Dxl (BC®)	CLIA	>3,1	>140
RCF niet uitgevoerd	E	Architect (Abbott®)	CMIA	>2,3	
	F	Architect i1000SR (Abbott®)	CMIA	>3,5	
	G	Modular E (Roche®)	ECLIA	3,89 – 26,8	
	H	Cobas (Roche®)	ECLIA	3,89 – 26,8	

E/ Benchmark

Ziekenhuis	Ref. waarde SF (µg/L)	# SF/j	# SF def./j	# RCF/j	# RCF def./j	Simultane bepaling	Simultane def.	Def SF NI. RCF	NI. SF Def. RCF	Macrocyt. anemie
Imelda Bonheiden (Cobas)	>3,9	5932	1014 17%	3844	156 4%	1025	33 3,2%	142 13,8%	7 0,7%	1 (vit B12 gestart, geen FZ gestart)
A (Cobas)	>3,9		17,5%		4,1%		2,3%	13,6%	1,5%	Neen
B (Modular)	>4	26686	5964 22% (11% zo < 3 µg/L) (0,03% zo < 2 ug/L)	17117	345 2%	13536	207 1,5%	2721 20%	54 0,4%	1 (vit B12 nl, geen FZ gestart) SF: 5,5 µg/L RCF : 512 µg/L (nauwelijks te laag) MCV : 105 fl Hb 12,7 g/dL
C (Dimension)	>3,1	17010	994 5,8%	1155	3 0,2%	181	0 0%	15 8,2%	1 0,5%	Neen
D (DXL)	>3,1	5493	257 4,6%	951	10 10,5%	951	1 0,1%	47 4,9%	10 1%	6 (1 ook vit B12 def) – geen R/ gestart

Overzicht

A/ Folaat

B/ Zin of onzin van bepaling folaat (in rode bloedcellen)

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic

D/ Retrospectieve studie Imelda

E/ Benchmark

F/ Financiële factor

G/ Besluit op vragen

H/ To do

F/ Financiële factor

- Zelfde kost +manuele handeling RCF laborant
→ RCF én SF uitvoeren verdubbelt kost
- Kost-effectiviteit maximaal zo grote PPW,
niet zo gebruikt als screening
- Suppletie goedkoper dan testen

Overzicht

A/ Folaat

B/ Zin of onzin van bepaling folaat (in rode bloedcellen)

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic

D/ Retrospectieve studie Imelda

E/ Benchmark

F/ Financiële factor

G/ Besluit op vragen

H/ To do

1. Nut Folaat bepaling : beperkt !

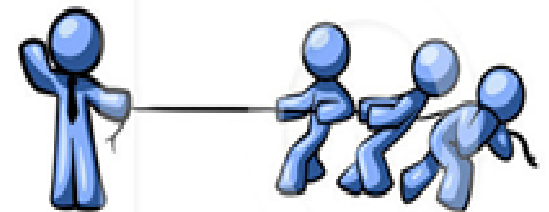
- Beïnvloed door voeding, alcohol, medicatie... :
VP / VN waarden mogelijk
- Folaat deficiëntie is zeldzaam
Lage pretest probabiliteit (zelfs bij macrocytaire anemie!)
- Investigatie macrocytaire anemie start met vitamine B12
(frequenter, belangrijker, mag niet gemist worden)
→ zo vitamine B12 normaal :
 ev. FZ suppletie empirisch starten (kostenefficiënt)
→ zo toch folaat bepaald: NUCHTER!

2. Nut Folaat bepaling in rbc: beperkt !

- Minder goede methode vergelijking
- Grotere analytische imprecisie van meting
- Geen extra klinische meerwaarde
- Extra kostprijs

Bevestigd door Mayo, Bonheiden en Benchmark

→ Folaat in rbc kan worden afgeschaft



3. Meer standaardisatie

- Methoden
- Cut-off waarden
- EQC materiaal

Overzicht

A/ Folaat

B/ Zin of onzin van bepaling folaat (in rode bloedcellen)

C/ Retrospectieve studie Mayo Clinic

D/ Retrospectieve studie Imelda

E/ Benchmark

F/ Financiële factor

G/ Besluit op vragen

H/ To do

I/



1. Overleg clinicus

RCF test niet meer uitvoeren

1. Presentatie seminarie Imelda :

beter inzicht verwerven in indicatie bepaling van SF

3. Nota bij laboresultaat

‘impact van de nieuwe referentiewaarden op de prevalentie van deficiëntie’

4. Follow-up

folaatsubstitutie, populatie onderzoek, IS