

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Stoffwechselaktives, Transcobalamin II-gebundenes
Vitamin B₁₂ im Vergleich zum gesamten Vitamin B₁₂:
Ein neuer Labortest**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
ROBERT SCHREMPF
aus
Crailsheim**

2004

DEKAN:

PROFESSOR DR. C. D. CLAUSSEN

1. BERICHTERSTATTER:

PROFESSOR DR. R. WAHL

2. BERICHTERSTATTER:

PRIV.-DOZ. DR. P. BROSSART

FÜR MEINE ELTERN

I INHALTSVERZEICHNIS

	SEITE
I INHALTSVERZEICHNIS	I - V
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI / VII
III EINLEITUNG	1
1. Vitamin B₁₂	1
1.1 Herkunft	1
1.2 Stoffwechsel	2
1.2.1 Stoffwechsel von Propionyl-CoA	2
1.2.2 Stoffwechsel von Methionin	3
1.3 Mangel	4
1.4 Folgen des Mangels	7
1.5 Therapie	9
2. Vitamin B₁₂-Bindungsproteine	9
2.1 Haptocorrin	10
2.2 Intrinsic Faktor	11
2.3 Transcobalamin II	12
3. Diagnostik	14
3.1 Gesamt-Vitamin B ₁₂	15
3.2 Methylmalonsäure und Homocystein	15
3.3 Holo-Transcobalamin II	16

	SEITE
4. Fragestellung	18
IV MATERIAL UND METHODEN	19
1. Versuchsdesign	19
2. Materialien und Geräte	19
3. Gewinnung, Aufarbeitung und Lagerung der Proben	20
4. Vitamin B₁₂-Bestimmung	22
4.1 Bestimmung von holo-Transcobalamin	22
4.1.1 Prinzip	22
4.1.2 Reagenzien	23
4.1.3 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte	24
4.1.4 Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien	24
4.1.5 Durchführung	25
4.1.6 Interpretation der Messergebnisse	28
4.2 Routinemäßige Vitamin B ₁₂ -Bestimmung	29
4.2.1 Prinzip	29
4.2.2 Reagenzien	29
4.2.3 Durchführung	29
4.3 Urinexkretionstest nach Schilling (Schilling-Test)	29
4.3.1 Prinzip	29
4.3.2 Durchführung	30

	SEITE
5. Statistische Auswertung	31
5.1 Beurteilung der Testgüte und Untersuchung des Einflusses der Lagerungsbedingungen auf die Proben	31
5.2 Ermittlung eines Referenzintervalls für TC II-gebundenes Vitamin B ₁₂	32
5.3 Methodenvergleich	34
5.4 Vergleich mit dem Schilling-Test	39
5.5 Software	39
V ERGEBNISSE	40
1. Beurteilung der Testgüte	40
1.1 Interne Qualitätssicherung	40
1.2 Präzision in der Serie	41
1.3 Präzision von Analysenserie zu Analysenserie	42
1.4 Gesamtbeurteilung	42
2. Einfluss von Lagerungsdauer, Lagerungstemperatur und Analysenserie auf die Messergebnisse	43
3. Ermittlung eines Referenzintervalls	47
4. Vergleich der Bestimmungsmethoden	51
5. Vergleich mit dem Schilling-Test	57

	SEITE
VI DISKUSSION	59
1. Durchführbarkeit im Routine-Labor	60
1.1 Vorteile	60
1.2 Nachteile	60
1.3 Gesamtbeurteilung	61
2. Beurteilung der Testgüte	62
2.1 Interne Qualitätssicherung	62
2.2 Präzision in der Serie	63
2.3 Präzision von Analysenserie zu Analysenserie	63
2.4 Gesamtbeurteilung der Präzision	63
2.5 Schlussfolgerung	64
3. Einfluss von Lagerungsdauer, Lagerungstemperatur und Analysenserie auf die Messergebnisse	64
3.1 Lagerungsdauer	65
3.2 Lagerungstemperatur	65
3.3 Analysenserie	66
3.4 Wechselwirkungen	66
3.5 Schlussfolgerung	66
4. Referenzbereich	67
5. Vergleich der Bestimmungsmethoden	69
5.1 Entwicklung der Datensätze	69
5.2 Rechnerischer / statistischer Methodenvergleich	71
5.2.1 Hauptkomponentenregression	71
5.2.2 Regression nach Passing und Bablok	71
5.2.3 Beurteilung	72

	SEITE
6. Vergleich mit dem Schilling-Test	73
7. Schlussfolgerung	74
VII ZUSAMMENFASSUNG	75
VIII LITERATURVERZEICHNIS	77
IX DANKSAGUNG	91
X LEBENSLAUF	93

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen (1)	
μ	mikro
⁵⁷ Co	radioaktives Kobalt-Isotop
AG	Antigen
AK	Antikörper
apo-TC II	Transcobalamin II mit unbesetzter Vitamin B ₁₂ -Bindungsstelle
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
Bq	Becquerel
BSA	bovine serum albumine, Rinderalbumin
C	chemisches Symbol für Kohlenstoff
cB ₁₂	Konzentration von Gesamt-Vitamin-B ₁₂
CH	control high
Ci	Curie
CL	control low
Co	chemisches Symbol für Kobalt
CoA	Coenzym A
cpm	Zählimpulse pro Minute
cTCII	Konzentration von Transcobalamin II-gebundenem Vitamin B ₁₂
DS	Datensatz
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FG	Freiheitsgrad
g	1. Gramm 2. Erdbeschleunigung
H	chemisches Symbol für Wasserstoff
HC	Haptocorrin
Hcy	Homocystein
holo-TC II	Transcobalamin II mit besetzter Vitamin B ₁₂ -Bindungsstelle
IF	Intrinsic Faktor, intrinsischer Faktor
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

Liste der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Abkürzungen (2)	
K	chemisches Symbol für Kalium
k	kilo
m	milli
M.	Morbus, Krankheit
MCH	mittlerer korpuskulärer Hämoglobingehalt von Erythrozyten
MCHC	mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration von Erythrozyten
MCV	mittleres korpuskuläres Volumen von Erythrozyten
MLQT	Maximum-Likelihood-Quotienten-Test
MMA	Methylmalonsäure
mol	Mol
N	1. chemisches Symbol für Stickstoff 2. Normal
n	nano
O	chemisches Symbol für Sauerstoff
p	piko
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PG	Poolserum – Gefriertruhenlagerung (< -20 °C)
PK	Poolserum – Kühlraumlagerung (+2 bis +8 °C)
PRT	Poolserum – Lagerung bei Raumtemperatur (+20 bis +25 °C)
Q-Q-Plot	Quantil-Quantil-Plot
R ²	Bestimmtheitsmaß
rel. E	relativer Messfehler
RIA	Radioimmunoassay
S	chemisches Symbol für Schwefel
SD	Standardabweichung
TC	Transcobalamin
TC I + III	Transcobalamine I + III; Synonym für Haptocorrin (HC)
TC II	Transcobalamin II

III EINLEITUNG

1.Vitamin B₁₂

Vitamin B₁₂ (Cobalamin) ist ein wasserlösliches Vitamin. Es besitzt ein porphyrinoides Grundgerüst (Corrin) mit Kobalt als Zentralatom und existiert in unterschiedlich substituierten Formen. Sein Molekulargewicht wird mit 1357 angegeben (112). Die komplette Struktur wurde erstmals 1956 beschrieben (67). Stoffwechselaktive Formen sind das 5-Desoxyadenosyl-Cobalamin im Mitochondrium und das Methyl-Cobalamin im Zytosol (89). Seine Funktion übernimmt es als Coenzym der L-Methylmalonyl-CoA-Mutase (Umwandlung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA) und der Methionin-Synthase (Bildung von Methionin aus Homocystein) (74, 115) im Fett-, Amino- und Nucleinsäurestoffwechsel sowie beim Umsatz von Kohlehydraten.

1.1 Herkunft

Synthetisiert wird Vitamin B₁₂ ausschließlich von Mikroorganismen. Der aerobe Syntheseweg konnte erstmals an *Pseudomonas denitrificans* nachvollzogen und beschrieben werden (11, 12, 119). Ein zweiter Syntheseweg kommt ohne das Vorhandensein von Sauerstoff aus, untersucht an *Propionibacterium shermanii* (108, 110, 111). Die beiden Stoffwechselwege unterscheiden sich außer in der Notwendigkeit des Vorhandenseins von molekularem Sauerstoff unter anderem im Zeitpunkt, in dem das Kobalt-Atom in den Corrin-Ring eingefügt wird, sowie in anfallenden Nebenprodukten. Weitere Vitamin B₁₂-produzierende Bakterien sind *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium smegmatis*, *Lactobacillus arabinosus*, *Bacillus subtilis* und einige Streptomyces-Arten (102). In der natürlichen Nahrung kommt Vitamin B₁₂ nahezu nur in tierischen Lebensmitteln vor, hier insbesondere in Leber, Fleisch, Eiern und Milch, die alle mit Cobalamin-produzierenden Keimen kontaminiert sind (5).

1.2 Stoffwechsel

1.2.1 Stoffwechsel von Propionyl-CoA

Der Stoffwechsel von Propionyl-CoA ist in Abbildung 1 dargestellt: Propionyl-CoA ist das vorläufige Endprodukt beim Abbau von ungeradzahligen Fettsäuren, wo es im Vergleich zur Verstoffwechslung geradzahliger Fettsäuren nach Abspaltung aller möglichen Acetyl-CoA-Reste als Molekül mit drei Kohlenstoff-Atomen übrig bleibt. Weitere Verbindungen, aus denen durch Umwandlung das Propionyl-CoA entstehen kann, sind die Aminosäuren Thymin, Valin, Isoleuzin, Methionin, und Threonin, sowie das Cholesterol. Durch Carboxylierung und Epimerisierung entsteht aus Propionyl-CoA über D-Methylmalonyl-CoA das L-Methylmalonyl-CoA, welches dann in der oben erwähnten 5-Desoxy-Adenosylcobalamin-abhängigen Reaktion der L-Methylmalonyl-CoA-Mutase zu Succinyl-CoA umgesetzt wird. Letzteres tritt in den Zitrat-Zyklus ein (115).

Beim Vitamin B₁₂-Mangel akkumulieren die Methylmalonyl-CoA-Zwischenprodukte. Eine Hydrolase spaltet vom D-Isomer das Coenzym A ab. Es entsteht Methylmalonsäure (MMA), deren Spiegel im Körper steigt. Zu messen ist MMA in Urin, Serum, Liquor und im Gewebe. Ihr Anstieg dient als einer der Parameter, die zur Diagnose eines Vitamin B₁₂-Mangels genutzt werden (6, 54, 81, 105, 116). Hierauf soll später noch näher eingegangen werden.

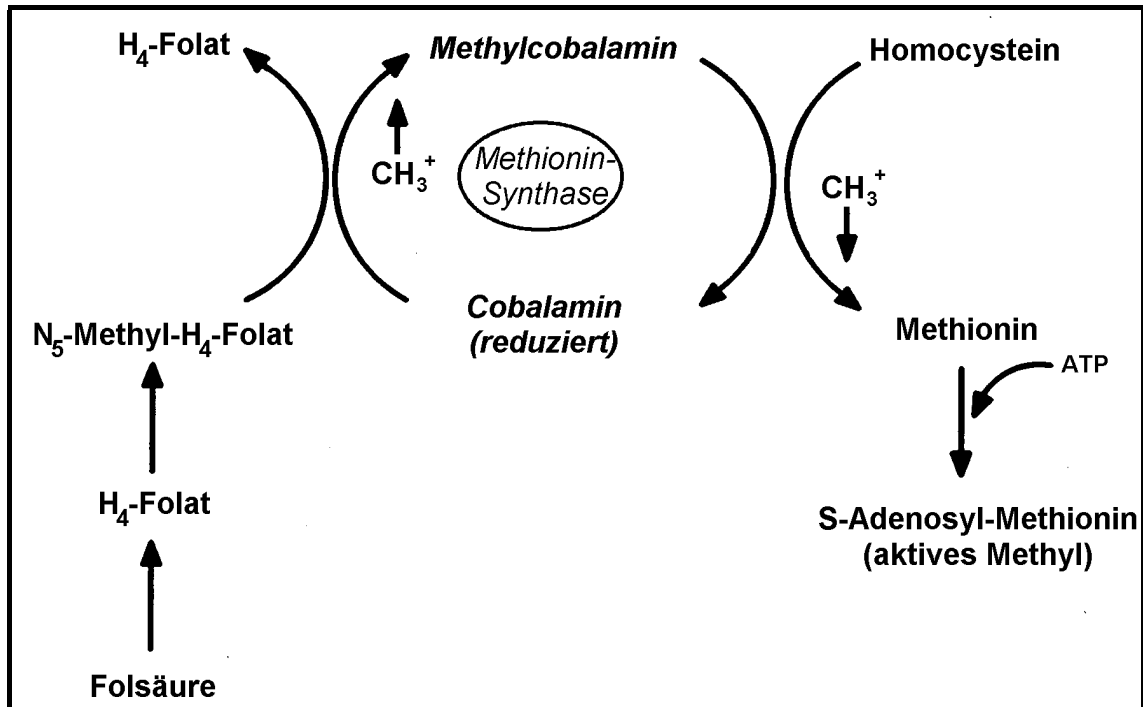


Abbildung 2: Stoffwechsel von Methionin

Aus den Stoffwechselwegen lässt sich ableiten, dass die Homocystein-Konzentration im Körper bei Vitamin B₁₂-Mangel sowie beim Mangel an Folsäure ansteigt.

1.3 Mangel

Ursachen für eine unzureichende Versorgung des menschlichen Körpers mit Vitamin B₁₂ liegen begründet in Ernährung, Malabsorption, Medikamenten oder Verwertungsstörungen (115). Im Folgenden wird darauf näher eingegangen:

- Ernährung: Von Bedeutung ist eine strenge einseitige pflanzliche Ernährung bei Vegetariern und viel mehr noch bei Veganern, die keinerlei tierische Nahrungsmittel zu sich nehmen (59). Bei einem Tagesbedarf von lediglich 0,5 bis 5 µg (5, 62, 115), wovon etwa 1/3 extern zugeführt werden müssen und 2/3 über den enterohepatischen Kreislauf rezirkulieren (89), reicht allerdings

schon die gelegentliche Zufuhr von Tierprodukten wie Eiern oder Milch zur Deckung des Bedarfs. Außerdem dauert es aufgrund des normalen Körpervorrats von ca. 4 mg (je zur Hälfte in und außerhalb der Leber) und der langen biologischen Halbwertszeit von 450 bis 750 Tagen mitunter bis zu 15 Jahre bis zum Auftreten von Mangelerscheinungen (5, 62, 88, 104). Zu einer Rarität macht den alimentären Vitamin B₁₂-Mangel jedoch die Tatsache, dass in unseren Breiten sehr viele Lebensmittel mit Vitamin B₁₂ angereichert sind. Ein Risiko tragen allerdings gestillte Kinder von Müttern, die entweder vegetarisch leben oder an unbehandelter oder nicht diagnostizierter perniziöser Anämie leiden, da ihre einzige Nahrungsquelle, die Muttermilch, unzureichend mit Vitamin B₁₂ ausgestattet ist (115).

- Malabsorption (Tabelle 1): Als weiterer und wichtigster Grund für einen Vitamin B₁₂-Mangel gilt eine gestörte Aufnahme des in der Nahrung angebotenen Cobalamins. Voraussetzungen für die regelrechte Aufnahme des Vitamins sind Magensäure, das Vorhandensein von Intrinsic Faktor und R-Bindern, die Pankreas-Funktion sowie ein intaktes Ileum (115). Im Magen wird unter dem Einfluss von Protonen das Cobalamin aus Eiweißbindungen gelöst. Über die Bindungsproteine Intrinsic Faktor, Haptocorrin (Synonym für Transcobalamin I+III) und Transcobalamin II gelangt es letztendlich in die Blutbahn und wird in die Körpergewebe verteilt (74). Wichtig für die Absorption sind die verschiedenen pH-Werte in den aufeinanderfolgenden Anteilen des Verdauungstraktes sowie die Anwesenheit von Verdauungsenzymen. Sind die daran beteiligten Organe in ihrer Funktion beeinträchtigt, so resultiert eine inadäquate Resorption von Vitamin B₁₂. Organstörungen, die einen Vitamin B₁₂-Mangel auslösen können, sind zum Beispiel die Typ A-Gastritis oder chronisch atrophische Gastritis. Hier treten Antikörper, die gegen die H⁺ / K⁺-ATPase der Parietalzellen des Magens und gegen den Intrinsic Faktor gerichtet sind, auf. Diese Krankheit ist vor allem bei älteren Menschen eine häufige und oftmals unentdeckte Ursache für Cobalaminmangel (10, 24). Weiter sind hier die Gastrektomie (118) und die Ileum-Resektion zu nennen.

Tabelle 1: Gründe für einen Vitamin B₁₂-Mangel, verursacht durch Malabsorption

atrophische Gastritis
Magenresektion – total, partiell oder Magenverkleinerungen
Magenschleimhautverätzungen
Magenkarzinom, Magenkarzinoid, Magenpolypose
Pankreasinsuffizienz
Resektion, Umgehungsanastomosen des Ileum
Dünndarmfistel
bakterielle Überwucherung des Dünndarms, Erkrankung mit Fischbandwurm
M. Crohn, Sprue, Zöliakie
Imerslund-Gräsbeck-Syndrom (kongenitale selektive Malabsorption von IF-Cobalamin mit Proteinurie)

nach (87, 115)

- **Medikamente:** Hier sind insbesondere Antazida zu erwähnen, die die Produktion der Magensäure hemmen, aber auch das Antidiabetikum Metformin. Distickstoffoxid (Lachgas) kann bei häufigem Gebrauch in der Anästhesie, wie er zum Beispiel in der Zahnheilkunde üblich war, ebenfalls einen Vitamin B₁₂-Mangel verursachen (115). Weitere Medikamente in Tabelle 2.

Tabelle 2: Medikamente, die einen Vitamin B₁₂-Mangel verursachen können

Distickstoffoxid (Lachgas, N ₂ O)
Magensäureblocker
Metformin
Antikonvulsiva
Kortison
Ovulationshemmer
Cholestyramin

nach (87, 115)

- Verwertungsstörungen: Vor allem ein Mangel an Transcobalamin II, das eine große Rolle bei der Aufnahme von Vitamin B₁₂ in die Zelle spielt, beeinträchtigt die Verwertung von in der Blutbahn zirkulierendem Cobalamin (115).

Relativ neu ist die Vermutung der Entstehung eines Cobalaminmangels aufgrund einer Helicobacter pylori-Infektion. Diese hat möglicherweise eine noch weitreichendere Bedeutung als jene bei chronisch atrophischer Gastritis (46).

1.4 Folgen des Mangels

Die Symptome des Mangels lassen sich kurz mit der Trias hämatologische, neurologische und gastrointestinale Störungen zusammenfassen (62):

- Hämatologische Symptome: Im Vordergrund steht die megaloblastäre Anämie, die als perniziöse Anämie (Anämie bei Typ A-Gastritis, Morbus Biermer) bezeichnet wird, sofern sie durch einen Mangel an Intrinsic Faktor hervorgerufen wird. Ihr gegenüber steht die durch Folsäuremangel verursachte megaloblastäre Anämie. Klinisch sind sie nicht zu unterscheiden (5). Erythrozytenvolumen (MCV) und der Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten (MCH) sind erhöht, nicht jedoch die absolute Hämoglobinkonzentration im Erythrozyten (MCHC). Häufig ist diese Anämie mit einer zusätzlichen Leuko- und Thrombozytopenie vergesellschaftet, es liegt dann eine Panzytopenie vor (62). Eine detaillierte Übersicht über die im Blut feststellbaren Veränderungen gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Megaloblastäre Anämie bei Vitamin B₁₂-Mangel

Veränderungen im peripheren Blut

Makrozytose

Makroovalozyten

Anämie

Hypersegmentierte neutrophile Granulozyten

Leukozytopenie

Thrombozytopenie

Veränderungen im Knochenmark

Vermehrung der Zellzahl

Verschiebung des Kern-Plasma-Verhältnisses

Große Nukleolen mit lockerer Chromatinstruktur in erythrozytären

Vorläuferzellen

Riesenstäbe und Metamyelozyten

Ineffektive Erythropoese durch intramedullären Zelltod

Laborveränderungen

Erhöhte Laktatdehydrogenase

Erhöhtes indirektes Bilirubin

aus (115)

- Neurologische Symptome: Es kommt zur funikulären Spinalerkrankung oder Myelose. Die Demyelinisierung in den Hinter- und Seitensträngen des Rückenmarks bedingt vielseitige neurologische Störungen. Diese reichen vom häufigsten Frühsymptom, der Störung der Tiefensensibilität und des Vibrationsempfindens, über Gangunsicherheit, Ataxie, Pyramidenbahnzeichen, Schwäche, Polyneuropathie mit schmerzhaften Parästhesien bis zur Urininkontinenz und Impotenz. Auch Hirnschäden mit Symptomen wie Depressionen, emotionaler Labilität, Gedächtnisstörungen oder Demenz gehören in diese Gruppe (62, 115).

- Gastrointestinale Symptome: Neben der bereits erwähnten chronisch atrophischen Gastritis mit Mukosa-Atrophien auch im übrigen Gastrointestinaltrakt tritt die Möller-Hunter-Glossitis, die durch eine glatte, rote Zunge mit Zungenbrennen charakterisiert ist, in Erscheinung (62).

Nicht zu vergessen sind die bereits oben beschriebenen Veränderungen im Stoffwechsel mit unter anderem steigenden Konzentrationen von Methylmalonsäure und Homocystein (dieses auch bei Folsäuremangel) im Urin, Serum und Liquor (115).

1.5 Therapie

Zur Vitamin B₁₂-Substitution wird meist das Hydroxocobalamin verwendet, das aufgrund seiner besseren Eiweißbindung und dadurch langsameren Ausscheidung dem Cyanocobalamin vorgezogen wird. Am Beginn der Therapie stehen Aufsättigungsdosen mit bis zu 1000 µg täglich, die intramuskulär verabreicht werden. Diese werden später in Erhaltungsdosen umgewandelt, die in größeren Abständen zu geben sind. Bei der perniziösen Anämie ist oftmals die lebenslange Substitution nötig. Hierbei ist die intramuskuläre Injektion in vierteljährlichen Abständen als Substitution besser geeignet als die regelmäßige orale Einnahme hoher Dosen von Vitamin B₁₂ (62).

2. Vitamin B₁₂-Bindungsproteine

Die Nomenklatur der Vitamin B₁₂-Bindungsproteine ist uneinheitlich, letztendlich gibt es drei Gruppen: Haptocorrin, Intrinsic Faktor und Transcobalamin (89). Diese sind in unterschiedlicher Weise an der Vitamin B₁₂-Aufnahme in Körperzellen beteiligt und binden an unterschiedliche Membranrezeptoren. Hierbei sind der Intrinsic Faktor und das Haptocorrin vor allem als Bindungsproteine auf der Luminalseite des Gastrointestinaltraktes von Bedeutung. Transcobalamin II hingegen erfüllt seine Funktionen in der

Blutbahn, Haptocorrin ist hier jedoch auch zu finden (7). Jedes Proteinmolekül besitzt dabei eine Bindungsstelle für jeweils ein Molekül Vitamin B₁₂ (89).

2.1 Haptocorrin (HC)

Synonyme, die in der Literatur auftauchen, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Bezeichnungen für Haptocorrin (HC)

Transcobalamine I + III (TC I + III)

R-Binder: "R" für "rapid electrophoresis"

B ₁₂ -bindendes Alpha-Globulin

Cobalophilin (CP)

non-intrinsic-factors (NIF)

(7, 26, 109)

Die Bedeutung des HC als Glykoprotein (vgl. IF) ist nicht vollständig geklärt, ein Mangel oder eine Funktionsstörung scheinen aber ohne klinische Relevanz zu sein (1, 23, 26, 52, 89, 114). Produziert wird Haptocorrin von Zellen des oberen Verdauungstraktes, von Leukozyten, Amnionepithelzellen, Milchdrüsen und von akzessorischen Verdauungsdrüsen wie Speicheldrüsen und Pankreas. Von den anderen Vitamin B₁₂-Bindungsproteinen unterscheidet es sich dadurch, dass es außer Cobalamin auch andere Corrinoiden zu binden vermag (7, 41).

Eine seiner Aufgaben besteht möglicherweise darin, dem Wachstum pathogener Mikroorganismen im oberen Gastrointestinaltrakt entgegenzuwirken, indem es ihnen das für ihr Wachstum benötigte Cobalamin und andere Corrinoiden entzieht. Eine weitere Funktion ist, Cobalamin-ähnliche Substanzen und Cobalamin-Derivate, die nicht an den Vitamin B₁₂-abhängigen Stoffwechselwegen beteiligt sind, durch Transport zur Leber aus der Blutbahn zu entfernen (4, 49, 88, 89). Darüber hinaus ist bekannt, dass in den Speicheldrüsen produziertes und mit dem Speichel sezerniertes HC das mit der

Nahrung aufgenommene Vitamin B₁₂ im Magen aufnimmt und dadurch vor Zerstörung durch die Magensäure schützt, um es dann im Dünndarm an den Intrinsic Faktor zu übergeben. Im Unterschied zum IF weist das HC bei saurem pH-Wert die höhere Bindungsaffinität zu Cobalamin auf (3, 7). Eine verminderte Säureproduktion, wie sie bei der atrophischen Gastritis vorliegt, kann die Aufnahme von Vitamin B₁₂ somit negativ beeinflussen (16, 17).

Etwa 80 % des im menschlichen Serum vorhandenen Cobalamins liegen an HC gebunden vor, wobei Methyl-Cobalamin bevorzugt an HC angelagert wird, 5-Desoxyadenosyl-Cobalamin vor allem an Transcobalamin II (90).

Den größten Anteil an HC-Rezeptoren, von denen es verschieden strukturierte gibt, besitzt die Leber. Insgesamt wurden sie im Gegensatz zu TC II-Rezeptoren nur in wenigen Körpergeweben gefunden. Aus diesem Grund wird die Funktion des HC als Speicherprotein für Vitamin B₁₂ als eine seiner Hauptaufgaben angesehen (7, 89, 103).

2.2 Intrinsic Faktor

Der Intrinsic Faktor (intrinsischer Faktor, IF), ist das Cobalamin-spezifischste Protein (41, 88). Er wird beim Menschen in den Parietalzellen des Magens gebildet (109). Substanzen wie Gastrin, Histamin und Metacholin, die die gastrale Säuresekretion fördern, steigern auch seine Produktion (7). Der Intrinsic Faktor ist verantwortlich für den Transport und die Aufnahme des Vitamins in die Zellen des terminalen Ileums (49), wo sich die IF-Rezeptoren in den Bürstenmembranen befinden. Beim IF handelt es sich um ein sialinsäurehaltiges Glykoprotein (100), das das Cobalamin als „extrinsischen Faktor“ bindet und es somit vor dem Abbau schützt (74). Hierbei besitzt der IF die Fähigkeit, zwischen physiologisch aktiven und inaktiven Corrinoiden unterscheiden zu können und nur erstere aufzunehmen (41). Die Bindung des aus der Nahrung sowie des aus dem enterohepatischen Kreislauf stammenden Vitamin B₁₂ an IF findet im Duodenum statt, wo Pankreasenzyme die Bindung zwischen Cobalamin und Haptocorrin durch Abspaltung des Bindungsproteins lösen, so dass der IF das Vitamin übernehmen kann (88). Die Lokalisation

dieser Umlagerung liegt darin begründet, dass eine IF-Cobalamin-Bindung bei dem sauren pH-Wert des Magens nicht möglich ist und einen höheren pH-Wert erfordert, wie er im proteasehaltigen Milieu des oberen Duodenum gegeben ist. Erreicht der IF-Cobalamin-Komplex das terminale Ileum, erfolgt die Aufnahme in die Mukosazelle durch Endozytose nach Kalzium-abhängiger Bindung an den IF-Cobalamin-Rezeptor bei annähernd neutralem pH-Wert. Intrazellulär folgt anschließend die lysosomale Abspaltung des IF durch eine Protease (112). Zwischen der Rezeptorbindung des Komplexes und dem Übertritt von Vitamin B₁₂ in die Blutbahn, wo es an Transcobalamin II gebunden ist, liegt eine Zeitspanne von etwa drei bis vier Stunden (7, 49, 89).

Aufgrund ihrer Struktur werden die IF-Cobalamin-Rezeptoren auch als Cubiline bezeichnet (112). Weitere wurden im Epithel der proximalen Nierentubuli gefunden (84).

Zwei Erkrankungen sollen in diesem Zusammenhang in Erinnerung gerufen werden: Erstens die Kombination von fehlender Funktionstüchtigkeit der gastrointestinalen sowie der renalen IF-Rezeptoren mit einer Malabsorption von Cobalamin und einer Proteinurie. Dieses Krankheitsbild ist als Imerslund-Gräsbeck-Syndrom beschrieben (vgl. Tabelle 1) (89). Zweitens, und von größerem Interesse, die perniziöse Anämie als Form der Vitamin B₁₂-Mangelanämie, die durch einen IF-Mangel verursacht und definiert ist.

2.3 Transcobalamin (Transcobalamin II, TC II, B₁₂-bindendes Alpha-Globulin, β-Globulin-Binder (51, 88))

Transcobalamin ist das Transportprotein in der Blutbahn, das intestinal absorbiertes und – vor allem in der Leber - gespeichertes Vitamin B₁₂ zu Organen und Körperzellen transportiert, wo es als Coenzym für die zwei oben beschriebenen Reaktionen innerhalb der Stoffwechselwege von Propionyl-CoA und Methionin benötigt wird. Ungesättigt liegt das Transcobalamin in der apo-Form vor, ist die Cobalamin-Bindungsstelle besetzt, wird dies als holo-Form bezeichnet (42). Es versorgt also den Organismus mit dem biologisch verfügbaren Vitamin B₁₂ (14, 25). Ein anderer Weg, wie das essentielle

Cobalamin die Körperzelle erreicht, ist nicht bekannt (10). Dies erklärt das besondere Interesse an diesem Bindungsprotein. Die Halbwertszeit des holo-TC II im Blutkreislauf ist mit etwa 1,5 bis 18 Stunden gegenüber derjenigen des oben beschriebenen holo-Haptocorrin mit etwa 6 bis 10 Tagen relativ kurz (68, 69).

Die Herkunft des TC II ist mannigfaltig: Sezerniert wird es unter anderem von Leber, Herz, Niere, Milz und Ileum. Neben der nachgewiesenen Bildung in Leberparenchymzellen sowie in kultivierten Lymphozyten- und Fibroblasten-Zellreihen wird die Produktion von TC II in Gefäßendothelien vermutet (43, 88, 104). Außer im Plasma wurde es in Muttermilch, Liquor (55), Synovialflüssigkeit und Samenflüssigkeit gefunden (56). Von den Plasma-proteinen besitzt es die größte Bindungskapazität für Vitamin B₁₂, mindestens 80 % sind ihm zuzuordnen (4). Tatsächlich an TC II gebunden sind im Normalfall jedoch lediglich 5 bis 40 % des gesamten zirkulierenden Vitamin B₁₂ (5, 10, 40, 44, 48, 90, 104). Eine sehr viel größere Streubreite ist bei verschiedenen Erkrankungen zu finden (21). Die Bindungsaffinität des TC II für Vitamin B₁₂ ist in einem pH-Wert-Bereich zwischen 3 und 12 am größten. Dies ermöglicht es dem TC II, ähnlich wie dem IF, aber im Unterschied zu Haptocorrin, zwischen biologisch aktiven und inaktiven Corrinoiden zu unterscheiden und nur erstere zu binden. Die Aufnahme von Cobalamin durch TC II erfolgt innerhalb der Darmmukosazelle (49). Anschließend wird das holo-TC II in die Mesenterialvenen abgegeben. Wie beim IF-Cobalamin-Komplex existieren Zellen, die auf ihrer Plasmamembran TC II-Rezeptoren exprimieren, die nach Bindung von holo-TC II als Ganzes durch Endozytose aufgenommen werden. Solche Rezeptoren finden sich in allen Geweben, in großer Dichte in Niere, Darm, Herz und Lunge sowie in Plazenta und Leber. Megalin, ein multifunktionaler Megarezeptor, ist einer der TC II-Rezeptoren (89). Seine Lokalisation im proximalen Tubulus der Niere ist deshalb von großer Bedeutung, weil hierdurch der renale Vitamin B₁₂-Verlust durch Reabsorption von glomerulär filtriertem holo-TC II minimiert wird. Bei Störungen im Bereich der Nierentubuli kommt es zu einer vierfach erhöhten Cobalamin-Ausscheidung über den Harn (15).

Die Spaltung des Rezeptor-holo-TC II-Komplexes in die Einzelkomponenten findet im sauren Milieu zellulärer Endosomen statt, die Trennung von Cobalamin und apo-TC II nach Fusion mit Lysosomen. Freigesetztes Vitamin B₁₂ kann nun in zytoplasmatischen oder mitochondrialen Kompartimenten zu den biologisch aktiven Coenzymen Methyl-Cobalamin und 5-Desoxyadenosyl-Cobalamin umgesetzt werden (88, 104).

Besitzt der menschliche Körper zu wenig TC II, fehlt es ganz, wie zum Beispiel beim hereditären TC II-Mangel, einer autosomal rezessiv vererbten Erkrankung (53, 73), oder ist die Funktion der holo-TC II-Rezeptoren gestört, führt dies in unterschiedlicher Ausprägung zu den Symptomen des Vitamin B₁₂-Mangels (8, 101, 112). Auch ein höheres Risiko für Frauen mit erniedrigter holo-TC II-Konzentration im Plasma, Kinder mit Neuralrohrdefekten zur Welt zu bringen, ist beschrieben (2). Hier besteht offensichtlich eine Parallele zum Folsäuremangel, der ebenfalls zu Neuralrohrdefekten bei Neugeborenen führen kann.

3. Diagnostik

Die Diagnose des Vitamin B₁₂-Mangels steht häufig zur Diskussion, insbesondere seitdem bemerkt wurde, dass dieser Mangel häufig unentdeckt bleibt (44). Sowohl die Suche nach dem oder den richtigen Parametern sowie die Suche nach entsprechenden methodisch einfach durchzuführenden Bestimmungsverfahren dauert bis heute an. Zur Verdachtsbestätigung oder zum Ausschluss des Cobalaminmangels ist die quantitative Bestimmung der Gesamt-Vitamin B₁₂-Konzentration im Patienten-Serum das am häufigsten angewandte Verfahren. Untersuchungen auf die Stoffwechselprodukte Methylmalonsäure und Homocystein, die bei einem Cobalaminmangel verstärkt anfallen, sowie die Einbeziehung der Vitamin B₁₂-Bindungsproteine TC II und HC sind eher selten gebrauchte Methoden. Zur Überprüfung einer möglichen Absorptionsstörung von Vitamin B₁₂ kann der Urinexkretionstest nach Schilling (Schilling-Test) eingesetzt werden.

Die Methoden im einzelnen:

3.1 Gesamt-Vitamin B₁₂

Mikrobiologische Techniken zu Beginn der Cobalamin-Diagnostik wurden von Radiodilutionsmethoden und Immunoassays abgelöst (60, 93). Die Vitamin B₁₂-Bindung erfolgte bei den Immunoassays zunächst unspezifisch, was zu einer großen Zahl an falsch negativen Ergebnissen führte. Mit Verwendung des IF als sehr spezifischem Cobalamin-Binder konnte die Zuverlässigkeit und damit die Verbreitung dieser Methodik gesteigert werden (81, 115). Allerdings wurde eine Reihe von Patienten beobachtet, bei denen trotz fehlender klinischer Symptomatik niedrige Serum-B₁₂-Spiegel gemessen wurden. Andererseits fanden sich auch Patienten, die trotz normalem Gesamt-Vitamin B₁₂-Spiegel im Serum Symptome zeigten, die sich unter einer Cobalamintherapie besserten (22, 76). Ein erniedrigter Serum-B₁₂-Spiegel entspricht also nicht in jedem Fall einem Cobalaminmangel und ein normaler Spiegel schließt einen solchen nicht aus. Hinzu kommt, dass die Referenzbereiche für Vitamin B₁₂ im Serum immer noch Gegenstand der Diskussion sind (44). Der Nutzen dieses Laborparameters zur Diagnose des Vitamin B₁₂-Mangels ist also durchaus umstritten und wird so zum Teil lediglich bei extrem niedrigen Werten zur Diagnose herangezogen (22) oder nicht als alleiniges Kriterium für oder gegen eine Therapie mit Vitamin B₁₂ empfohlen (6, 28, 29, 45, 81, 93, 116).

3.2 Methylmalonsäure (MMA) und Homocystein (Hcy)

Wie oben beschrieben, entstehen Methylmalonsäure und Homocystein, wenn die Funktion der Cobalamin-abhängigen Enzyme durch einen Vitamin B₁₂-Mangel eingeschränkt ist. Nachzuweisen sind diese Stoffwechselprodukte in Serum und Urin. Einigkeit herrscht darüber, dass durch die Bestimmung ihrer Konzentrationen im Serum bei Patienten mit Verdacht auf Cobalaminmangel die Diagnostik durchaus sinnvoll ergänzt werden kann. Insbesondere kommen diese Parameter in solchen Fällen in Frage, bei denen normale Gesamt-Vitamin B₁₂-Spiegel vorliegen oder die Möglichkeit eines Folsäuremangels

zusätzlich untersucht werden soll (1, 6, 16, 17, 28, 29, 30, 31, 50, 54, 76, 95, 105, 106, 115, 116). Der Cobalaminmangel wird als „funktionell“ definiert, fallen erhöhte MMA- und / oder Hcy-Spiegel unter Vitamin B₁₂-Therapie wieder ab (77).

Der Nutzen der Bestimmung dieser Metaboliten in der Routine-Diagnostik erfährt allerdings auch Einschränkungen, wenn man bedenkt, dass Krankheiten wie renale Funktionsstörungen, Hypothyreose, Achlorhydrie oder AIDS Einfluss auf ihre Serum- und Urinkonzentrationen nehmen können. Die Spezifität dieser Teste wird dadurch reduziert. Zusätzlich kann die Bestimmung mitunter auch noch teuer sein (25, 44, 61, 83, 93).

3.3 Holo-Transcobalamin II (holo-TC II)

Die Erkenntnis, dass lediglich das an TC II gebundene Cobalamin dem Zellstoffwechsel zur Verfügung steht (104), macht das holo-TC II zu einem interessanten Parameter, der sich möglicherweise zur Erkennung eines Vitamin B₁₂-Mangels einsetzen lässt (68, 69). Generell sind bei der Anwendung eines solchen Verfahrens zwei Arbeitsschritte erforderlich, zu denen es eine Reihe von Ansätzen gibt. Sie sollen im folgenden kurz vorgestellt werden:

1. Am Anfang steht die Identifizierung des an TC II gebundenen Vitamins, um seine Menge anschließend mit dem ausgewählten Messverfahren zu bestimmen. Die Identifizierung erfolgt über eine Trennung der Bindungsproteine in den Serumproben und nutzt Unterschiede der Proteine in Ladung, Größe, immunologischen Eigenschaften oder Fähigkeit der Bindung anderer Corrine aus (72, 89, 92, 109, 121). Bei den Messverfahren muss dann unterschieden werden, ob die vorliegende holo-TC II-Menge beziehungsweise die Menge an TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ direkt bestimmt wird oder ob sie indirekt als Differenz aus Gesamt-Cobalamin-Menge und an Haptocorrin gebundenem Cobalamin (holo-HC) berechnet wird (78).

Häufig erfolgt die Trennung des TC II von den anderen Bindungsproteinen über die unterschiedliche Ladung durch Adsorption an mikrofein präzipitierendem Kieselgel mit anschließender Lösung in einem Phosphat- oder Natriumazetat-Puffer zur weiteren Bestimmung der TC II-Menge (35, 42, 61, 65, 72, 78, 122, 123). In einem neueren Verfahren wird das TC II durch Adsorption an Heparin-Sepharose aus Plasmaproben entfernt. Diese Methode erhebt den Anspruch, eine größere Spezifität als die vorige Methode für die Bindung von TC II zu besitzen. Begründet wird dies durch die geringere Adsorption nicht erwünschter R-Binder (13, 121).

Eine Trennung der Vitamin B₁₂-Bindungsproteine zur weiteren Untersuchung von TC II und Haptocorrin ist auch über eine Sephadex Gel-Chromatographie möglich (21).

Antikörper gegen TC II, die an Sepharose als inerter Phase gekoppelt werden können, machen die spezifische Bindung des Bindungsproteins ebenfalls möglich (14, 75).

2. Die quantitative Bestimmung des an TC II gebundenen Cobalamins stellt aufgrund der kleinen Mengen den schwierigeren Schritt in der Bestimmung des aktiven Vitamin B₁₂ dar. Problematisch ist eine ausreichende Präzision im Bereich der unteren Nachweisgrenze (12). Eine Möglichkeit ist die Anwendung eines ELISA (91). Auch Radioimmunoassays (RIA) werden zur Cobalaminbestimmung eingesetzt. Hierbei konkurriert mit ⁵⁷Co markiertes Cobalamin mit dem in der Probe enthaltenen nativen Vitamin B₁₂ um Bindungsstellen an Bindungsproteinen oder Antikörpern (13, 85, 120, 121, 122).

In einem ganz neuen Verfahren wird durch Bindung von TC II an Anti-TC II-Antikörper, die an paramagnetische Mikrosphären gekoppelt sind, die Cobalaminmengenbestimmung durch einen RIA erfasst. Dieses als Holo TC RIA bezeichnete Verfahren soll in der vorliegenden Studie näher untersucht werden.

4. Fragestellung

Folgende Fragestellungen sollen mit der vorliegenden Arbeit gelöst werden:

1. Beurteilung der Durchführbarkeit des neuen Holo TC RIA im Routine-Labor.
2. Beurteilung der Testgüte des neuen Holo TC RIA anhand seiner verfahrenstechnischen Präzision.
3. Einfluss von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer der Blutproben auf die Messergebnisse.
4. Ermittlung eines Referenzintervalls für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ im Serum beziehungsweise Plasma.
5. Vergleich der bisher am Universitätsklinikum Tübingen verwendeten Routine-Bestimmung für Gesamt-Vitamin B₁₂ mit dem neuen Holo TC RIA.
6. Vergleich der Messergebnisse des neuen Holo TC RIA mit den Ergebnissen von Schilling-Testen, die bei Patienten mit Verdacht auf Cobalaminmangel durchgeführt wurden.

IV MATERIAL UND METHODEN

1. Versuchsdesign

Verglichen wurden zwei Methoden zur Vitamin B₁₂-Bestimmung aus Blutproben: Der neue Holo TC RIA (Axis-Shield), der den Anspruch erhebt, nur an Transcobalamin II gebundenes Vitamin B₁₂ zu messen und der ADVIA Centaur VB12-Test (Bayer), der am Universitätsklinikum Tübingen zur routinemäßigen Vitamin B₁₂-Bestimmung eingesetzt wird. Die Möglichkeit, den neuen Holo TC RIA mit dem ebenfalls am Klinikum durchgeführten Schilling-Test als Gold-Standard zur Erfassung eines Vitamin B₁₂-Mangels zu vergleichen, wurde zusätzlich genutzt.

Zur Beurteilung der Testgüte des neuen Tests wurden Intra- und Inter-Assay-Standardabweichungen sowie eine aus diesen beiden berechnete Gesamt-Standard-Abweichung ermittelt. Für die klinische Anwendung wurde die Verteilung der Messwerte untersucht und es wurden Referenzbereiche für beide Geschlechter festgelegt. Zusätzlich beurteilt wurde der Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen und Lagerungszeiten der Serumproben auf die Messwerte.

Alle verwendeten Patienten-Blutproben und alle durchgeführten Schilling-Teste entstammen der Routine-Diagnostik zur Abklärung eines Vitamin B₁₂-Mangels, wobei der Schilling-Test eine eigene Aufklärung der Patienten erforderte.

2. Materialien und Geräte

- Holo TC RIA Testkit, Axis-Shield ASA, Oslo (Norwegen), Vertrieb durch ICN Biomedicals, Eschwege
- ADVIA Centaur VB12-Test, Bayer Corporation
- Cyanocobalamin (⁵⁷Co) Diagnostikkapseln CT 51 PG, Amersham Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig

3. Gewinnung, Aufarbeitung und Lagerung der Proben

Die Blutproben wurden nach den allgemein üblichen Regeln für die Venenpunktion entnommen. Die Serumgewinnung erfolgte durch Inkubation der Proben für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur zur Gerinnung und anschließende Zentrifugation bei 1000 g. Vor der Abtrennung von EDTA-Plasma ist keine Inkubation nötig, so dass dieses sofort nach Zentrifugation mit ebenfalls 1000 g für 10 Minuten weiterverarbeitet werden konnte.

119 Blutproben, hierunter 55 Serum- und 64 EDTA-Plasmaproben stammten von 116 Patienten der Tübinger Universitätsklinik, 112 Serumproben von 112 Spendern der Tübinger Blutbank. Die Spender stammten aus dem Raum Südwürttemberg-Hohenzollern.

Weitere 111 Proben wurden einem Pool entnommen, der für die Einzeluntersuchungen nicht benötigte Überschüsse der Blutbank-Proben enthielt. Angelegt wurde dieser Pool am Tag der Aufteilung der Serumproben auf die verschiedenen Lagerungsbedingungen (Stichtag).

Die Patienten- und Blutbank- Proben wurden vom Tag der Blutentnahme bis zum Tag der Auswertung, die Proben, aus denen der Pool hergestellt wurde, zunächst bis zum Stichtag gefroren bei einer Temperatur $< -20\text{ °C}$ gelagert. Der Zeitraum von der Blutentnahme bis zum Stichtag für die Pool-Proben erstreckte sich auf acht beziehungsweise 14 Tage, da die darin enthaltenen Blutbank-Proben je zur Hälfte (55 beziehungsweise 56 Proben) im Abstand von sechs Tagen abgenommen worden waren. Ihre anschließende Lagerung erfolgte zu jeweils 1/3:

1. gefroren (PG, $< -20\text{ °C}$)
2. bei Kühlschranktemperatur (PK, $+2\text{ bis }+8\text{ °C}$)
3. bei Raumtemperatur (PRT, $+20\text{ bis }+25\text{ °C}$)

Zur Beurteilung der Testgüte und der Einflüsse der Lagerungsbedingungen sowie zur Referenzintervallbestimmung dienten die Proben des Pools, der ausschließlich Serum enthielt. Am Vergleich der seitherigen Bestimmungs-

methode für Gesamt-Vitamin-B₁₂ mit dem neuen Holo TC RIA waren sowohl Serum- als auch EDTA-Plasmaproben beteiligt. Die Messresultate wurden aus folgenden Gründen nicht getrennt, sondern in eine gemeinsame Auswertung einbezogen: Zum einen wurde jeweils das TC II-gebundene Vitamin B₁₂ sowie das Gesamt-Vitamin B₁₂ aus derselben Probe bestimmt. Zum anderen existieren für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ nach einer Studie des Herstellers (20) bei Verwendung des Holo TC RIA keine signifikanten Unterschiede (weniger als 1,3%, $p > 0,05$) zwischen den beiden Probenmaterialien. In zwei früheren Studien zur Transcobalaminbestimmung wurden in EDTA-Plasma 6 % und 8 % höhere Messwerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ gefunden als in Serum. Dieser Unterschied wurde ebenfalls als nicht relevant angesehen (92, 120). Zur Bestimmung von Gesamt-Vitamin B₁₂ sind nach Herstellerangaben sowohl Serum- als auch EDTA-Plasmaproben gleichermaßen geeignet.

Citrat-Plasma sollte für beide Labortests nicht verwendet werden. Wichtig ist noch, dass die Proben frei von Ascorbinsäure und Fluorid sind, da diese Substanzen Vitamin B₁₂ zerstören können. Interferenzen mit dem Holo TC RIA wurden vom Hersteller für Bilirubin, Haptocorrin, Hämoglobin und Triglyzeride gefunden und sollten ebenfalls beachtet werden. Die Konzentrationen, in denen diese Substanzen stören und die Größenordnungen der Interferenzen sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Substanzen, die mit dem Holo TC RIA interferieren

interferierende Substanz	Konzentration	Interferenz
Bilirubin	0,4 mg/ml	0
Haptocorrin	1 nM	-1 %
Hämoglobin	10 mg/ml	+4 %
Triglyzeride	15 mg/ml	+3 %

4. Vitamin B₁₂-Bestimmung

4.1 Bestimmung von Transcobalamin II-gebundenem Vitamin B₁₂

Vor der ersten Analysenserie war der Gamma-Counter auf den Photo-Peak von ⁵⁷Co einzustellen. Hierzu wurde eine Gelatine-Kapsel mit definierter Aktivität an ⁵⁷Co verwendet. Es handelte sich um dieselbe Kapsel, wie sie beim Schilling-Test verabreicht wird. Sie besitzt eine Aktivität von 18,5 kBq am Kalibriertag.

4.1.1 Prinzip

Die Bestimmung des an Transcobalamin II gebundenen Vitamin B₁₂ erfolgte mit dem AXIS-Shield Holo TC RIA Testkit. Das Prinzip des Testes ist folgendes: Paramagnetische Mikrosphären sind mit einem monoklonalen Antikörper (AK) gegen menschliches Transcobalamin II beschichtet. Damit lässt sich mit Hilfe eines Magnetseparators im Serum oder Plasma TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ abfangen und von an Haptocorrin gebundenem Vitamin B₁₂ abtrennen. Nach Freisetzung des gebundenen Vitamin B₁₂ aus der Bindung an Transcobalamin II durch Reduktions- und Denaturierungsmittel wird eine definierte Menge von mit ⁵⁷Co markiertem Vitamin B₁₂ als sogenannter Tracer zugesetzt. Vitamin B₁₂ verhält sich in der nachfolgenden Bindungsreaktion wie ein Antigen (AG). Die radioaktive und die zuvor isolierte, nicht radioaktive Vitamin-Fraktion konkurrieren anschließend um die Bindung an Schweine-Intrinsic Faktor, der hier die gleiche Aufgabe wie ein Antikörper erfüllt. Der Intrinsic Faktor selbst ist an einen festen Träger gebunden. Markiertes und nicht radioaktiv markiertes Vitamin B₁₂ verhalten sich gegenüber Intrinsic Faktor gleich. Zwischen der in den Standards bekannten oder der in den Proben unbekanntem Menge an nicht radioaktivem Vitamin B₁₂ einerseits und dem radioaktiven Vitamin B₁₂ andererseits kommt es zu einer Competition um die Bindungsplätze am Intrinsic Faktor. Da die Bindungskapazität am Intrinsic Faktor begrenzt ist, bleibt sowohl ein Teil des markierten als auch des unmarkierten Vitamins frei, also

ungebunden. Die Radioaktivität dient als Messsignal. Viel Radioaktivität am festgebundenen Intrinsic Faktor bedeutet wenig nicht-radioaktives Vitamin B₁₂ im Standard oder in der Probe.

Anhand einer Standard-Kurve lässt sich die ursprünglich an Transcobalamin II gebundene Vitamin B₁₂-Menge dann quantitativ bestimmen.

4.1.2 Reagenzien

- Verdünnungslösung (Diluent Solution): 0,1 mol/l phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit < 0,08 % Salzsäure als Konservierungsmittel, pH = 7,2, gebrauchsfertig
- Bindungsreagenz (Capturing Reagent): an monoklonale Maus-Antikörper gegen menschliches Transcobalamin II gekoppelte magnetische Mikrosphären in 0,1 mol/l PBS, Rinderalbumin (BSA) und < 0,08 % Salzsäure als Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
- Isotopenindikator (Tracer): ⁵⁷Co-Vitamin B₁₂; < 0,45 μCi (17 kBq), gebrauchsfertig
- Reduktions-Reagenz (Reductant): Dithiothreitol in Phosphatpuffer mit Stabilisator, gebrauchsfertig
- Extraktions-Reagenz (Extractant): 1,0 N Natronlauge mit organischem Extraktionsverstärker und gelbem Farbstoff, gebrauchsfertig
- B12-Binder: an festen Träger gebundener, gereinigter Schweine-Intrinsic Faktor in Borat-Puffer mit Natriumchlorid, Farbstoff und Konservierungsmittel, gebrauchsfertig
- Kontrollen (high / low): menschliches Serum, < 0,08 % Salzsäure als Konservierungsmittel und < 0,005 % Kaliumzyanid, gefriergetrocknet
- Standards (Calibrators): rekombinantes holo-Transcobalamin, 0-20-40-80-160-320 pmol/l in PBS-Puffer, < 0,08 % Salzsäure als Konservierungsmittel, BSA und < 0,005 % Kaliumzyanid, gebrauchsfertig

4.1.3 Zusätzlich benötigte Materialien und Geräte

- Einmal-Polystyrol-Röhrchen 12 x 75 mm, glasklar, 5 ml, Greiner
- Reagenzglasständer
- Themaia-Magnetic-Separator für 60 Röhrchen, Code 62075, Serono Diagnostik
- Pipetten: Eppendorf
- Multipipette: Eppendorf
- Schüttler: Rotamax 120, Heidolph
- Mischer: Vortex-Genie
- Zentrifuge mit einer Mindestbeschleunigung von 1000 g, hier: Hettich Rotixa / RP
- Gamma-Counter mit Bestimmungsmöglichkeit für ^{57}Co , hier: LKB Multigamma
- Auswerteeinheit: EGG Berthold LB 5320 UniRad, Bad Wildbad

- zur Probenaufbewahrung: Reaktionsgefäße 1,5 ml, Eppendorf

4.1.4 Vorbereitung und Lagerung der Reagenzien

Vor Versuchsbeginn mussten die Reagenzien (bis auf einen Teil der Verdünnungslösung) auf Raumtemperatur gebracht werden. Zusätzlich mussten die magnetischen Mikrosphären im Bindungs-Reagenz aufgrund ihrer raschen Sedimentation aufgewirbelt (Vortex-Mischer) und höchstens 10 Sekunden vor Gebrauch nochmals aufgeschüttelt werden.

Die Aufbewahrung aller Reagenzien erfolgte bei +2 bis +8 °C und durfte bei der Tracer-Reductant-Mischung zwei Tage, bei den Kontrollen einen Monat und bei den übrigen Reagenzien das angegebene Verfallsdatum nicht überschreiten. Tracer und B12-Binder mussten zudem dunkel gelagert werden.

4.1.5 Durchführung

Generell wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Von den beiden Messwerten wurden die Mittelwerte weiterverwendet. Vor der Messung der Patienten- und Pool-Proben wurde über Standards eine Standard-Kurve ermittelt und die Richtigkeit der Ergebnisse des Ansatzes durch Kontroll-Proben überprüft.

Dem Pipettieren der Reagenzien und Proben sowie dem zeitlichen Ablauf des Tests lag folgende Anleitung zugrunde (vgl. Pipettierschema Tabelle 6):

- (1) 18 Röhrrchen werden für Standards und Kontrollen beschriftet. Ab Röhrrchen Nummer 19 werden je zwei Stück für jede Probe nummeriert.
- (2) Standards, Kontrollen und Proben werden nach Schema hinzugefügt wie in Tabelle 6 beschrieben.
- (3) 400 µl Diluent zu den Röhrrchen Nummer 3 und höher hinzufügen.
- (4) 40 µl Capturing Reagent zu den Röhrrchen Nummer 3 und höher mit der Multipipette zugeben. Um dieselbe Menge Capturing Reagent in jedem Röhrrchen zu gewährleisten, soll dieser Vorgang stattfinden, solange sich die paramagnetischen Mikrosphären in Suspension befinden und daher innerhalb von zwei Minuten abgeschlossen sein. Die Röhrrchen werden anschließend sorgfältig geschüttelt.
- (5) 60 Minuten mischen auf einem Schüttler bei Raumtemperatur.
- (6) Röhrrchen Nummer 3 und höher in den Magnetseparator für mindestens drei Minuten zur Präzipitation der paramagnetischen Mikrosphären mit Maus-AK gegen TC II einsetzen. Überstand verwerfen.
- (7) Röhrrchen Nummer 3 und höher im Magnetseparator mit 500 µl kaltem Diluent auswaschen. Nach drei Minuten Überstand verwerfen.
- (8) Probenröhrrchen aus dem Magnetseparator herausnehmen und 50 µl Tracer / Reductant-Lösung zu allen Röhrrchen hinzufügen – inklusive Nummer 1 und 2.
- (9) Mischen auf dem Vortex-Mischer und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.

- (10) 25 µl Extractant zu Röhrchen Nummer 3 und höher hinzufügen.
- (11) Mischen auf dem Vortex-Mischer und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- (12) Nach gründlichem Mischen des Inhalts der Flasche mit B12-Binder 300 µl B12-Binder zu den Röhrchen Nummer 3 und höher hinzufügen. Mischen auf dem Vortex-Mischer.
- (13) Alle Proben 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- (14) Zentrifugieren der Röhrchen Nummer 3 und höher bei mindestens 1000 g für 10 Minuten bei +2 bis +8 °C.
- (15) Vorsichtiges Dekantieren und Verwerfen der Überstände aus den Röhrchen Nummer 3 und höher. Um den letzten Tropfen des Überstandes zu entfernen, wird der Reagenzglasständer über saugfähigem Papier umgedreht und aufgesetzt.
- (16) Messung der Radioaktivität in den zurückgebliebenen Pellets inklusive der Röhrchen Nummer 1 und 2 über zehn Minuten im Gamma-Counter. Hierbei sollte die Zahl der Zählimpulse pro Minute (counts per minute, cpm) bei den Röhrchen Nummer 1 und 2, abhängig von Gerät und Alter des Tracers, zwischen 1500 und 4500 liegen.

Tabelle 6: Pipettierschema Holo TC RIA

Röhrchen	Standard, Kontrolle oder Probe (μ l)	Diluent (μ l)	Capturing Reagent (μ l)	Tracer / Reductant Solution (μ l)	Extractant (μ l)	B ₁₂ - Binder (μ l)
1, 2	-	-	-	50	-	-
3, 4	400 A	400	40	50	25	300
5, 6	400 B	400	40	50	25	300
7, 8	400 C	400	40	50	25	300
9, 10	400 D	400	40	50	25	300
11, 12	400 E	400	40	50	25	300
13, 14	400 F	400	40	50	25	300
15, 16	400 CL	400	40	50	25	300
17, 18	400 CH	400	40	50	25	300
Proben (19 und höher)	400	400	40	50	25	300

A: Standard 0 pmol/l rekombinantes holo-TC

B: Standard 20 pmol/l rekombinantes holo-TC

C: Standard 40 pmol/l rekombinantes holo-TC

D: Standard 80 pmol/l rekombinantes holo-TC

E: Standard 160 pmol/l rekombinantes holo-TC

F: Standard 320 pmol/l rekombinantes holo-TC

CL: Control low, Kontrollserum für niederen Konzentrationsbereich

CH: Control high, Kontrollserum für hohen Konzentrationsbereich

4.1.6 Interpretation der Messergebnisse

- (1) Der Mittelwert der Zählimpulse aus den Röhren Nummer 1 und 2 gab die eingesetzte Gesamt-Radioaktivität im Ansatz wieder.
- (2) Als Qualitätsparameter wurde die prozentuale Tracer-Bindung durch den Quotienten aus dem Mittelwert der Zählimpulse der Tracerbindung (Röhren Nummer 3 und 4) und der eingesetzten Gesamt-Radioaktivität (Röhren Nummer 1 und 2) ermittelt. Sie sollte größer als 35 % sein.
- (3) Aus den gemittelten Zählimpulsen der Standards A bis F konnte unter Zuhilfenahme des logistischen Modells mit vier Parametern eine Standard-Kurve wie in Abbildung 3 konstruiert werden.
- (4) Die Konzentration von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ in den Proben wurde über die gemessene Impulszahl (cpm) durch Interpolation aus der Standard-Kurve ermittelt.

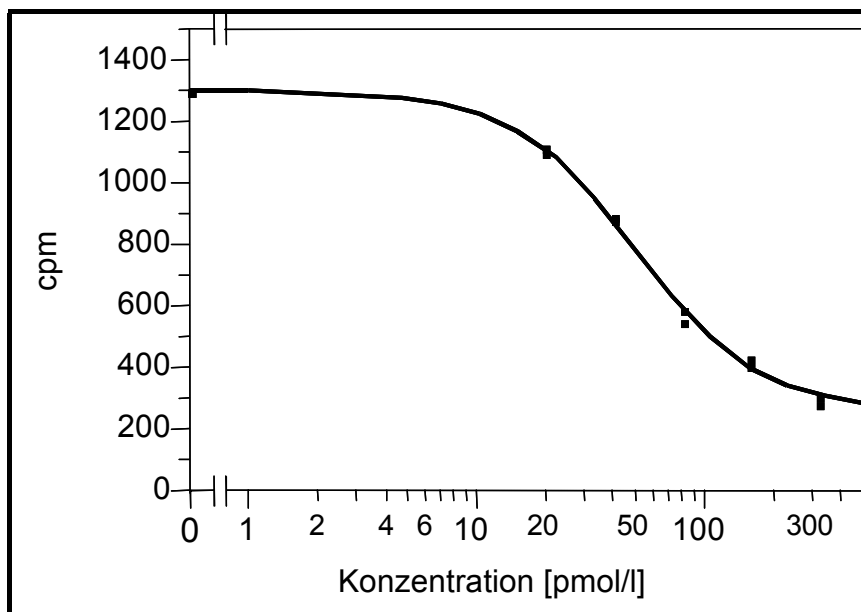


Abbildung 3: typische Kalibrierungs-Kurve des Holo TC RIA

4.2 Routinemäßige Vitamin B₁₂-Bestimmung

4.2.1 Prinzip

Der ADVIA Centaur VB12-Test bedient sich eines kompetitiven Immunoassays mit direkter Chemilumineszenz-Technologie. Vitamin B₁₂ aus der Patientenprobe konkurriert dabei mit einem mit Acridiniumester markierten Vitamin B₁₂ um eine begrenzte Menge an Schweine-Intrinsic Faktor, der an paramagnetische Partikel gebunden ist. Über das umgekehrt proportionale Verhältnis zwischen der Vitamin B₁₂-Menge und den vom verwendeten System gemessenen relativen Lichteinheiten werden die Proben ausgewertet.

4.2.2 Reagenzien

Es wurden die in der Testanleitung vorgesehenen Reagenzien und Materialien verwendet.

4.2.3 Durchführung

Vorbereitung und Laden der Reagenzien, Kalibrierung des Systems und Qualitätskontrolle erfolgten nach den in der Testanleitung angegebenen Vorschriften.

4.3 Urinexkretionstest nach Schilling (Schilling-Test)

4.3.1 Prinzip

Vitamin B₁₂, das mit ⁵⁷Co radioaktiv markiert wurde, wird als ⁵⁷Co-Cyanocobalamin oral verabreicht und im Ileum resorbiert. Anteile des radioaktiven Vitamin B₁₂ werden dann durch eine parenteral verabreichte große Menge (1000 µg) an nicht markiertem Cyanocobalamin durch Sättigung von den Bindungsproteinen kompetitiv verdrängt. Dieser Anteil wird über den Harn ausgeschieden und quantitativ als sogenannte Ausschwemmdosis bestimmt.

Voraussetzung für die Resorption des radioaktiven Vitamin B₁₂ ist die Anwesenheit von Intrinsic Faktor im oberen Gastrointestinaltrakt. Der nicht resorbierte Anteil verlässt den Körper über die Fäzes. Anhand des Anteils der im Urin gefundenen radioaktiv markierten Vitaminmenge von der gegebenen Gesamtdosis kann eine Aussage über die Resorption des Vitamins im Darm gemacht werden. Im Normalfall werden 6 bis 30 % der verabreichten radioaktiven Dosis nach 24 Stunden im Urin gefunden. Liegt die Ausscheidung unter 6 %, ist von einer Vitamin B₁₂-Resorptionsstörung auszugehen.

Bei sehr niedriger Resorptionsquote kann der Test unter gleichzeitiger Gabe von Intrinsic Faktor wiederholt werden. Normalisiert sich das Testergebnis anschließend, so liegt bei dem Patienten ein Intrinsic Faktor-Mangel vor (36).

4.3.2 Durchführung

Nach Blasenentleerung vor Testbeginn wurde vom nüchternen Patienten eine Kapsel mit 1 µg radioaktiv markiertem Vitamin B₁₂ (18,5 kBq-⁵⁷Co-Cyanocobalamin) eingenommen. Mit Verabreichung der Kapsel begann die Sammelperiode des Urins über 24 Stunden. Zwei Stunden nach Einnahme der radioaktiv markierten Dosis musste der Patient noch weiter nüchtern bleiben. Dann wurden als Ausschwemmdosis 1000 µg Cyanocobalamin intramuskulär injiziert. Die Radioaktivität im 24-Stunden-Sammelurin wurde anschließend im Szintillationszähler gemessen (36).

Wichtig ist das vorherige Absetzen jeglicher Medikamente, die die Resorption von Vitamin B₁₂ beeinflussen könnten. Ebenfalls muss ein ausreichender zeitlicher Abstand zur Gabe von anderen Radioisotopen und auch zu jodhaltigen Kontrastmitteln gewahrt werden. Jodhaltige Kontrastmittel im Urin können die Strahlung des ⁵⁷Co schwächen, andere Radioisotope strahlen mitunter in den ⁵⁷Co-Messkanal ein und verfälschen das Messergebnis.

5. Statistische Auswertung

5.1 Beurteilung der Testgüte und Untersuchung des Einflusses der Lagerungsbedingungen auf die Proben

Die durchgeführten Berechnungen erfolgten nach üblichen und anerkannten statistischen Verfahren beim Methodenvergleich (38, 39). Den verwendeten Begriffen liegen die entsprechenden geltenden Definitionen zugrunde (37).

In Tabelle 7 sind die Faktoren aufgelistet, deren Einfluss auf die Messwerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ in diesem Zusammenhang untersucht wurde.

Tabelle 7: untersuchte Faktoren

Faktor	Ausprägung der Faktoren	Definition
Lagerungstemperatur	PG	Poolproben, die im Gefrierschrank gelagert wurden (< -20 °C)
	PK	Poolproben, die im Kühlraum gelagert wurden (+2 bis +8 °C)
	PRT	Poolproben, die bei Raumtemperatur gelagert wurden (+20 bis +25 °C)
Lagerungsdauer	kurz	Poolproben mit einer Lagerdauer von 2-29 Tagen
	lang	Poolproben mit einer Lagerdauer von 121-136 Tagen
Analysenserie	1-10	Messansätze, fortlaufend nummeriert

Zur Beurteilung der Testgüte sowie zur Überprüfung der Einflüsse von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer wurde eine Varianzanalyse mit verschiedenen Varianzen je nach Lagerungstemperatur durchgeführt.

Schätzungen und Tests erfolgten nach der Maximum-Likelihood (ML)- Methode. Bei der Versuchsplanung wurde auf eine ausgewogene Probenanzahl in den zu vergleichenden Gruppen sowie auf ein harmonisches Verhältnis zwischen Probenanzahl und Anzahl der durchgeführten Analysenserien geachtet. So stehen die Zahlen der „kurz“ beziehungsweise „lang“ gelagerten Poolproben annähernd im Verhältnis 1:1 (54:57), die den unterschiedlichen Lagerungstemperaturen zuzuordnenden Gruppen PG, PK, PRT entsprechend in etwa im Verhältnis 1:1:1 (43:34:34), und das Quadrat der Anzahl der Analysenserien entspricht annähernd der Anzahl der ausgewerteten Proben ($10^2 \approx 111$). Diese Verhältnisse sind optimal, wenn Intra- und Inter-Assay-Streuung gleich groß sind, was bei einer Zwischenauswertung ermittelt wurde (33).

5.2 Ermittlung eines Referenzintervalls für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂

Für die folgenden Berechnungen wurden die Vorgaben der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) berücksichtigt (71).

Da an Transcobalamin II gebundenes Vitamin B₁₂ nur etwa ein Viertel des Gesamt-Vitamins ausmacht (5, 10, 40, 44, 4890, 104), ist vor Einsatz des neuen Holo TC RIA in der Routine die Kenntnis eines Referenzintervalls für Gesunde notwendig. Zur Berechnung wurden die Messergebnisse aus den 112 Proben der als gesund angenommenen Spender der Tübinger Blutbank herangezogen.

Es handelte sich hierbei um eine repräsentative Stichprobe mit 76 männlichen und 36 weiblichen Personen. In Tabelle 8 sind die Altersgrenzen der vertretenen Gruppen, die Mediane sowie die Interquartilsspannen, für die die ermittelten Referenzwerte Gültigkeit haben, angegeben. Die Altersverteilung ist als Histogramm in Abbildung 4 dargestellt.

Tabelle 8: repräsentative Stichprobe aus 112 Proben der Blutbank-Spender

Geschlecht	Alter [Jahre;Monate]	Median [Jahre;Monate]	Interquartilsspanne [Jahre;Monate]
männlich	18;8 bis 66;2	34;5	28;9 bis 42;8
weiblich	21;2 bis 64;9	34;5	23;10 bis 40;3

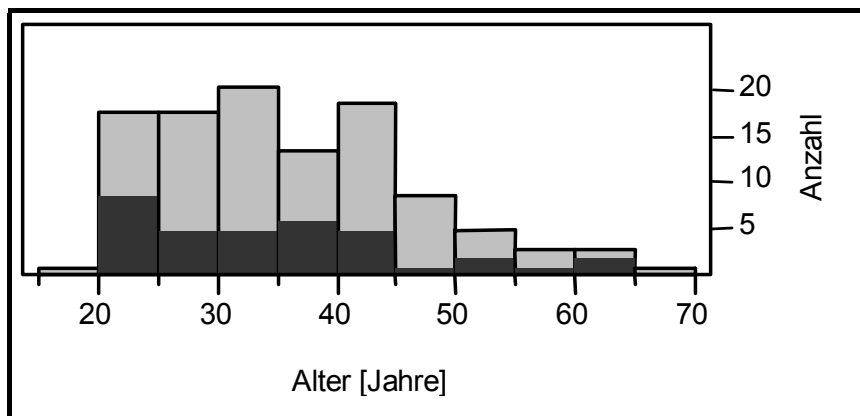


Abbildung 4: Häufigkeit der Blutspender nach Alter und Geschlecht. Für jede 5 Jahre umfassende Altersklasse sind die Häufigkeiten der Frauen als dunkle Flächen unten dargestellt, diejenigen der Männer als helle Flächen oben.

Zur Ermittlung des Referenzbereiches erfolgten zunächst Untersuchungen, welche individuellen Faktoren zwischen den einzelnen Probanden Einfluss auf die Berechnungen haben, beziehungsweise zu Variationen in den Berechnungen führen können. Hierbei kann es sich um das Geschlecht und das Alter des Probanden sowie um das Messdatum für die ermittelten Vitamin-Spiegel handeln.

Die Ergebnisse der auf drei verschiedenen Wegen ermittelten Referenzintervalle für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ wurden verglichen. Da die Normalverteilung der Messwerte für die ersten beiden der angewandten Verfahren eine Voraussetzung darstellt, wurde sie zuvor durch ein Quantil-Quantil-Plot bestätigt. Das dritte Verfahren wird durch die IUPAC vorgegeben und berücksichtigt nur die vorliegende Stichprobe.

5.3 Methodenvergleich

Von den vorhandenen 231 Blutproben wurden 186 Proben von 184 Personen (Patienten sowie Spender der Blutbank) verwendet, deren Probenmenge sowohl zur Bestimmung der Konzentration des TC II-gebundenen Vitamin B₁₂ (cTCII) als auch zur Ermittlung der Gesamt-Vitamin B₁₂-Konzentration (cB₁₂) ausreichte. Bei 45 der 231 Proben war dies nicht der Fall (Schritt 1, siehe Tabelle 9).

Aufgrund der Inhomogenität der Daten wurden zwei Auswertedatensätze gebildet, von denen der erste, soweit vom Test quantifizierbar, alle Messdaten enthielt (DS1), der zweite durch Ausschluss einiger Daten homogener gestaltet wurde (DS2):

- Der erste Datensatz (DS1) umfasste alle Patienten- und Blutbank-Proben mit quantifizierbaren Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂, also Messwerte innerhalb des vom Hersteller zugelassenen Quantifizierungsintervalls von 15 bis 320 pmol/l. Drei Proben mussten aufgrund zu kleiner Konzentrationen ausgeschlossen werden, dazu fünf weitere mit Messwerten über 320 pmol/l. 178 Wertepaare von 177 Personen wurden ausgewertet (Schritt 2). Im Streudiagramm des DS1 (Abbildung 5) wird die oben erwähnte Inhomogenität der Daten deutlich.

Die eingezeichnete Winkelhalbierende symbolisiert dieselben Konzentrationen für Gesamt-Vitamin B₁₂ und TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ (cB₁₂ = cTCII), d. h. hier liegt alles Vitamin B₁₂ an Transcobalamin II gebunden vor.

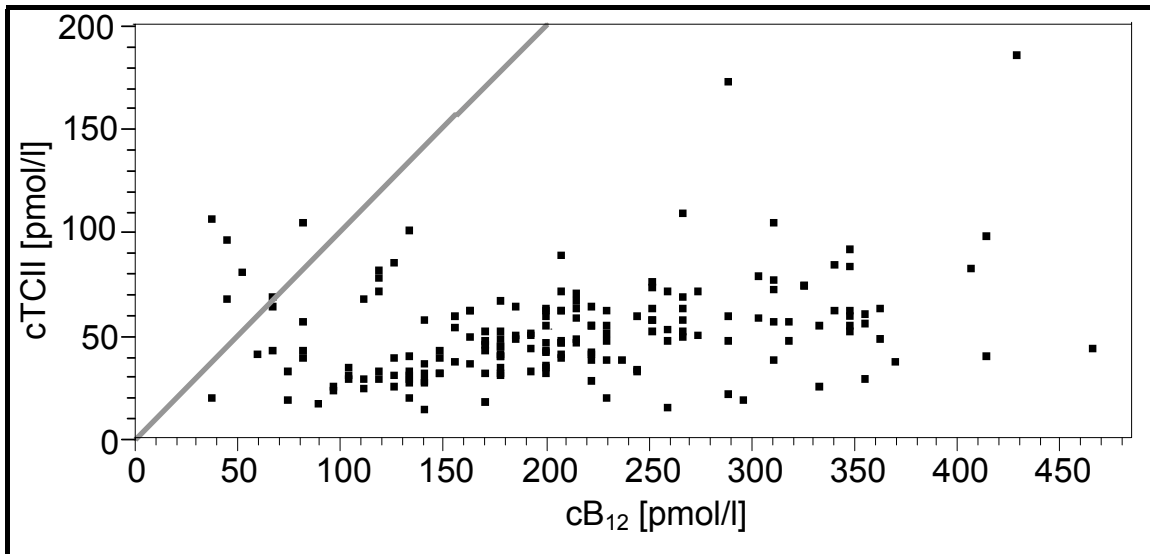


Abbildung 5: Datensatz 1 als Streudiagramm aller darin enthaltener Proben mit Winkelhalbierender (grau). Bei Wertepaaren auf der Winkelhalbierenden ist $c_{B_{12}} = c_{TCII}$, d.h. alles Vitamin B_{12} liegt TC II-gebunden vor (vgl. Ausschlusskriterium 2 im Text)

$c_{B_{12}}$: Konzentration von Gesamt-Vitamin B_{12}

c_{TCII} : Konzentration von TC II-gebundenem Vitamin B_{12}

- Ein anderer, möglichst homogener, Datensatz (DS2) entstand durch Einbeziehung dreier weiterer Ausschlusskriterien, die nacheinander auf den zuvor beschriebenen Datensatz 1 (DS1) angewandt wurden:

- 1) Proben mit Messwerten für TC II-gebundenes Vitamin B_{12} deutlich über normal hohen Konzentrationen. Von den vorliegenden Proben wurden zwei mit Messwerten von 175 pmol/l und höher ausgeschlossen, sodass maximale Konzentrationen von 125 pmol/l auszuwerten waren (Schritt 3).
- 2) Proben mit unlogischen Wertepaaren: Der Messwert des TC II-gebundenen Vitamin B_{12} war bei sieben Proben größer oder gleich der gemessenen Gesamt-Vitamin B_{12} -Konzentration. Der Ausschluss erfolgte vor dem Hintergrund der Annahme, dass das TC II-gebundene Vitamin B_{12} einen Teil des Gesamt-Vitamin- B_{12} ausmacht (Schritt 4).

3) Proben mit einem individuellen Verhältnis der Messwerte von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ zu Gesamt-Vitamin B₁₂ von $\geq 0,45$ als im Histogramm (Abbildung 6) erkennbarer Grenze zwischen zwei Verteilungen. Bei Annahme einer Mischung zweier Normalverteilungen zeichnete sich jeweils eine Gruppe oberhalb und unterhalb dieser Grenze ab. 13 Proben bildeten eine Gruppe mit einem Durchschnitt der Verhältnisse der Messwerte von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ zu Gesamt-Vitamin B₁₂ von 0,64 (bei einer Standardabweichung SD = 0,09). Bei der auszuwertenden Gruppe von 156 Proben wurde ein Durchschnitt der Verhältnisse der Messwerte von 0,24 gefunden (SD = 0,07) (Schritt 5).

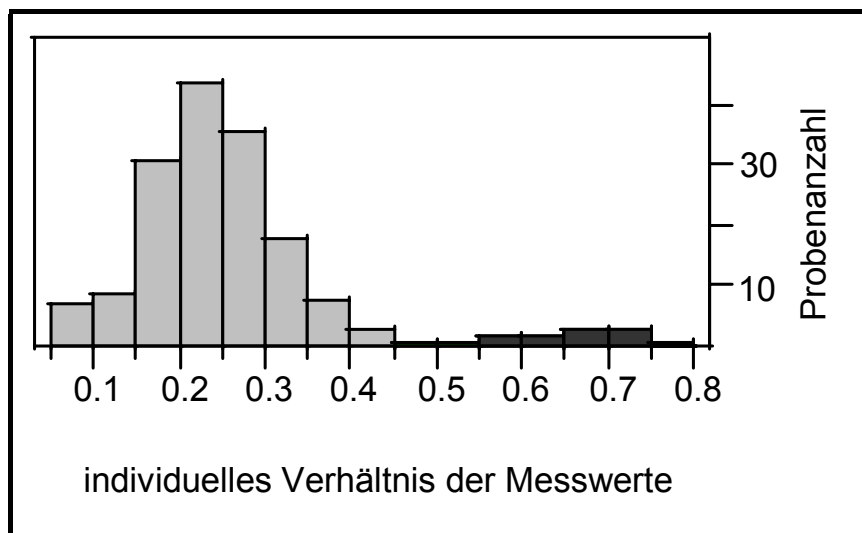


Abbildung 6: Verteilung der individuellen Verhältnisse der Messwerte von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ zu Gesamt-Vitamin B₁₂ vor Anwendung des dritten Ausschlusskriteriums

Tabelle 9 veranschaulicht die nacheinander auf die Gesamtheit der ursprünglich 231 Proben angewendeten Ausschlusskriterien mit der jeweils zugehörigen Anzahl der in den Schritten 1 bis 5 ausgeschlossenen Proben. In einem vorhergehenden Schritt bereits weggefallene Proben sind gesondert aufgeführt, wenn sie aufgrund mehrerer Kriterien auszuschließen waren.

Abbildung 7 zeigt den Datensatz 2 (DS2) als Streudiagramm mit der Winkelhalbierenden für $cB_{12} = cTCII$.

Tabelle 9: Entwicklung der ausgewerteten Datensätze (DS1 und DS2) aus den ursprünglich 231 Proben

Schritt	Ausschlussgrund	auszuschließende Proben	davon bereits ausgeschlossen wegen			neu ausgeschlossenen	übrige Proben
			kein cB ₁₂	< 15 oder > 320 pmol/l	cTCII ≥ cB ₁₂		
1	kein cB ₁₂	45				45	186
2	< 15 oder > 320 pmol/l	10	2			8	178 (DS1)
3	≥ 175 pmol/l	9	2	5		2	176
4	cTCII ≥ cB ₁₂	7				7	169
5	Verh. ≥ 0,45	14			1	13	156 (DS2)

kein cB₁₂: Die Probenmenge reichte nicht für die Bestimmung beider Konzentrationen aus
 < 15 oder > 320 pmol/l: Messwerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ außerhalb des vom Hersteller zugelassenen Quantifizierungsintervalls
 ≥ 175 pmol/l: Proben mit Messwerten für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ deutlich über normal hohen Konzentrationen
 cTCII ≥ cB₁₂: Proben mit unlogischen Wertepaaren
 Verh. ≥ 0,45: Proben mit einem individuellen Verhältnis der Messwerte cTCII zu cB₁₂ größer oder gleich 0,45

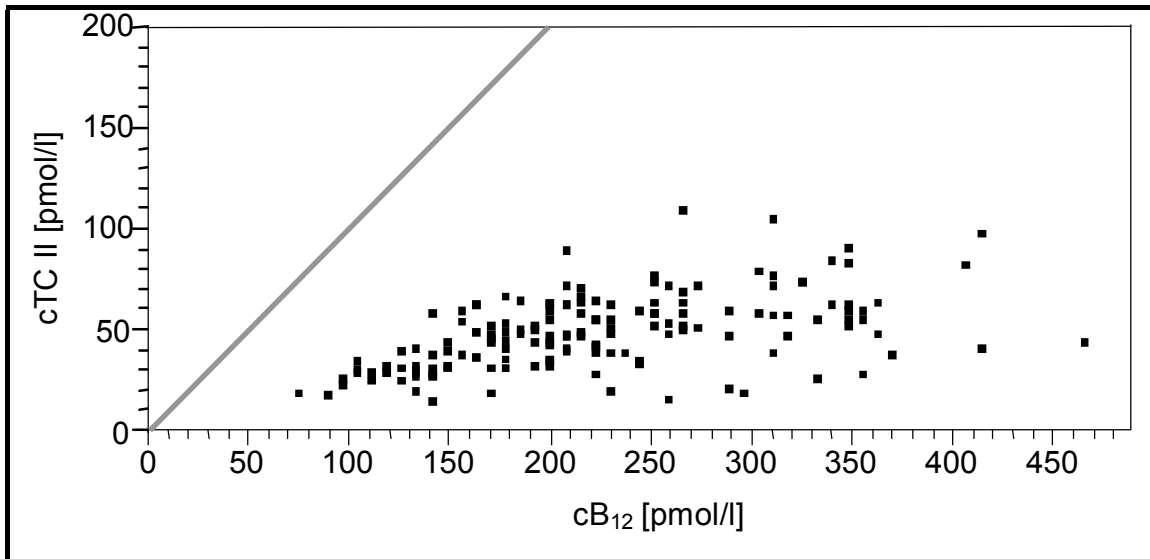


Abbildung 7: Datensatz 2 als Streudiagramm aller darin enthaltener Proben mit Winkelhalbierender (grau)

Für diese beiden Auswertedatensätze wurden nun in einem ersten Verfahren Hauptkomponentenregressionen von Logarithmen der Messwerte des neuen Holo TC RIA auf Logarithmen der Messwerte der Routinemethode zur Ermittlung eines Umrechnungsfaktors bei konstantem relativem Fehler durchgeführt. Die Anwendung einer Hauptkomponentenregression liegt in der Tatsache begründet, dass bei beiden zu vergleichenden Methoden Fehler auftreten sowie unterschiedliche Varianzen existieren können. Gründe für die Logarithmierung waren zum einen die Normalverteilungsannahme, zum anderen geht die Regressionskurve hierdurch zwangsläufig durch den Ursprung, wenn auch dieser Vorteil letztendlich nicht genutzt wurde.

Zusätzlich erfolgte der Vergleich des neuen Holo TC RIA mit der seitherigen Routine-Bestimmung von Vitamin B₁₂ vor dem Hintergrund, dass stets ein Teil der Gesamt-Vitamin B₁₂-Menge im Serum in Form des holo-TC II vorliegt. Aus diesem Grund wird eine Regressionsanalyse durchgeführt, die die Regressionsgerade nicht durch den Nullpunkt zwingt, also einen Achsenabschnitt auf der Auftragungsachse der Konzentrationen des TC II-gebundenen Vitamin B₁₂ zulässt. Dies ist bei der Regressionsanalyse nach Passing und Bablok der Fall (9, 38, 47, 97, 98). Es wird hierbei ein

Umrechnungsfaktor gebildet und der stets vorhandene Anteil an TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ unter der Annahme, beide Messmethoden seien fehlerhaft, geschätzt.

5.4 Vergleich mit dem Schilling-Test

Ergebnisse von Schilling-Testen lagen von 14 Patienten mit Verdacht auf Cobalaminmangel vor. Der Vergleich dieser Daten mit den Ergebnissen des neuen Holo TC RIA für die Blutproben derselben Patienten wurde mit Hilfe einer Vierfeldertafel und Angabe von Sensitivität und Spezifität angestellt.

5.5 Software

Datenerfassung und Berechnungen erfolgten mit der Statistik-Software JMP 5.0.1.2, SAS Institute Inc. 2003.

Die Regressionsanalyse nach Passing und Bablok wurde mit dem Programm Analyse-it 1.70, Analyse-it Software, Ltd. 2003 durchgeführt.

V ERGEBNISSE

Den folgenden Berechnungen liegt die Modellannahme zugrunde, dass die Residuen normalverteilt sind. Dies wurde im Quantil-Quantil-Plot bestätigt.

1. Beurteilung der Testgüte

1.1 Interne Qualitätssicherung

Als Grundlage der internen Qualitätssicherung diene folgendes Kontrollproben-System zur Beurteilung von Präzision und Richtigkeit (vgl. 19):

Bei jeder Analysenserie wurden vor den zu testenden Proben jeweils die Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ zweier Kontrollseren mitbestimmt, von denen sich eines im niederen Konzentrationsbereich (control low, CL), eines im höheren Konzentrationsbereich (control high, CH) bewegte. Zielwerte für die jeweiligen Konzentrationen waren für CL 38 pmol/l, für CH 98 pmol/l. Die vom Hersteller vorgegebene maximale Abweichung sollte jeweils +/- 15 % nicht überschreiten, dementsprechend ergab sich für CL ein Kontrollbereich von 32 bis 44 pmol/l, für CH ein Bereich von 83 bis 113 pmol/l. Für die durchgeführten elf Analysenserien ergaben sich die in Abbildung 8 dargestellten Kontrollkurven. Die Schwankungen um einen engen Konzentrationsbereich, sowohl für CL als auch für CH, weisen auf eine gute Präzision hin. Die insgesamt niedrigen Werte für CH, hierbei insbesondere der außerhalb des Kontrollbereiches liegende Wert bei der Analysenserie 8, schränken jedoch die Richtigkeit der Messergebnisse ein.

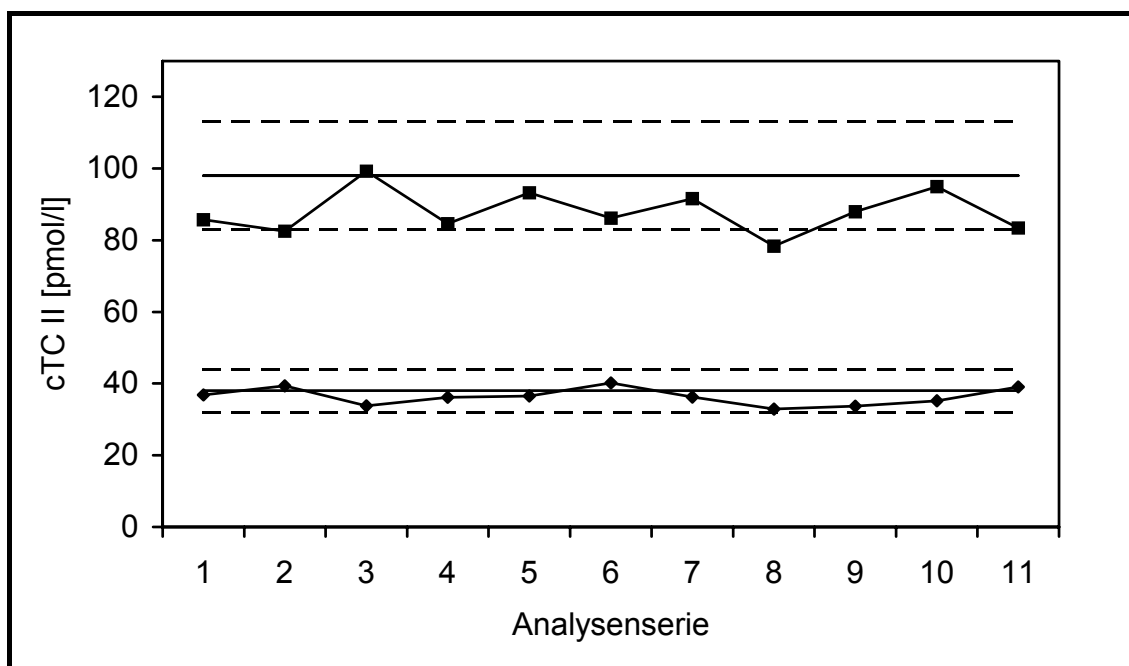


Abbildung 8: Kontrollkurven für den niederen Kontrollbereich CL (◆) und den hohen Kontrollbereich CH (■) über die durchgeführten elf Analysenserien

———— Zielwert
 - - - - - Zielwert +/- 15 % (Kontrollbereich)

1.2 Präzision in der Serie

Es wurden die 111 Proben aus dem Serum-Pool herangezogen. Da diese alle dieselben Konzentrationen an TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ haben, wurden zur Beurteilung der Präzision Varianzanalysen durchgeführt.

Über die Präzision in der Serie gibt die Intra-Assay-Standardabweichung (Intra-Assay-SD) Auskunft. Ermittelt wurde sie durch mehrmaliges Messen derselben Proben aus dem Serum-Pool innerhalb einzelner Testansätze, getrennt für die unterschiedlichen Lagerungstemperaturen. Die Intra-Assay-SD sowie der Intra-Assay-Variationskoeffizient (Intra-Assay-VK) für diesen Konzentrationsbereich sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Der Intra-Assay-VK als relative Standardabweichung wurde berechnet als Quotient aus der Intra-Assay-SD und dem jeweiligen Mittelwert.

Tabelle 10: Intra-Assay-Standardabweichungen und Intra-Assay-Variationskoeffizienten der Bestimmungen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ in den Poolseren bei verschiedenen Lagerungstemperaturen

Lagerungstemperatur	insgesamt getestete Proben	Mittelwert [pmol/l]	Intra-Assay-Standardabweichung [pmol/l]	Intra-Assay-Variationskoeffizient [%]
Gefriertruhe (PG)	43	64,1	3,28	5,1
Kühlraum (PK)	34	67,7	5,31	7,8
Raumtemperatur (PRT)	34	67,1	4,67	7,0

In Tabelle 10 zeigt sich, dass sich die Lagerungstemperatur auf die Intra-Assay-Standardabweichung sowie den Intra-Assay-Variationskoeffizienten auswirkt.

1.3 Präzision von Analysenserie zu Analysenserie

Die Inter-Assay-Standardabweichung diente zur Beurteilung der Güte der Bestimmung bei Wiederholung der Messung der gleichen Probe von Tag zu Tag. Sie wurde bestimmt durch Messung von insgesamt 111 Pool-Proben in zehn aufeinander folgenden Analysenserien an zehn verschiedenen Tagen.

Die Wurzel aus der Varianzkomponente des Faktors Analysenserie wurde als **Inter-Assay-Standardabweichung** interpretiert und betrug **3,13 pmol/l**. Sie berücksichtigt die Proben aller Lagerungstemperaturen.

1.4 Gesamtbeurteilung

Die Intra-Assay-Varianz und die Inter-Assay-Varianz addieren sich zur Gesamt-Varianz. Durch Ziehen der Wurzel hieraus kann so aus den oben angegebenen Standardabweichungen eine **Gesamt-Standardabweichung** für das neue Testverfahren berechnet werden. Diese beträgt etwa **6 pmol/l**.

2. Einfluss von Lagerungsdauer, Lagerungstemperatur und Analysenserie auf die Messergebnisse

Es sollte die Probenstabilität in Bezug auf den neuen Holo TC RIA beurteilt werden. Hierzu wurden je 1/3 der Pool-Proben gefroren (PG, < -20 °C), im Kühlschrank (PK, +2 bis +8 °C) und bei Raumtemperatur (PRT, +20 bis +25 °C) gelagert und auf eine signifikante Änderung der Messwerte bei einer Lagerungsdauer von bis zu 136 Tagen untersucht. In dieser Zeit wurden insgesamt zehn Analysenserien durchgeführt. Jeweils 5 Analysenserien wurden für statistische Zwecke unter der Lagerdauer „kurz“ und „lang“ genestet, in praxi also nach kurzer und nach langer Lagerdauer gemessen.

Wie Abbildung 9 entnommen werden kann, lagen die Messwerte hierbei alle so dicht beieinander, dass keine Ausreißer vorhanden waren. So musste hierauf nicht gesondert eingegangen werden.

Mittels p-Wert-Berechnungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Lagerungsdauer, die Lagerungstemperatur als auch die Analysenserie Einfluss auf die Messergebnisse nehmen. Freiheitsgrade (FG) dieser Faktoren und die zugehörigen p-Werte sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

Tabelle 11: p-Werte der Faktoren, die möglicherweise Einfluss auf die Messergebnisse für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ nehmen

Faktor	FG	Chi-Quadrat	p-Wert
Lagerungsdauer	1	18,85	< 0,0001
Lagerungstemperatur	2	13,75	0,0010
Analysenserie, genestet unter der Lagerungsdauer	8	57,60	< 0,0001

Insgesamt unterschieden sich die Streuungen je nach Lagerungstemperatur (Maximum-Likelihood-Quotienten-Test (MLQT), $p = 0,0126$). Die Streuung der Messwerte war am geringsten bei Einlagerung der Proben in der Gefriertruhe, am höchsten bei Aufbewahrung im Kühlraum. Die Streuungen der Messwerte derjenigen Proben, welche bei Raumtemperatur und Kühlraumtemperatur gelagert wurden, unterschieden sich nicht signifikant, da das approximative 95 %-Konfidenzintervall für das Verhältnis der Standardabweichungen (0,7 bis 2,2) die 1 enthielt.

Die Messwerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ waren bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben insgesamt höher, jedoch praktisch ebenso konstant wie die bei den anderen Lagerungstemperaturen angesammelten Proben. Die Änderung der im Holo TC RIA ermittelten Konzentrationen in den Poolproben in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer hin zu größeren Messwerten verdeutlicht Abbildung 9.

Wie Tabelle 12 zeigt, waren die Messwerte bei Lagerung in der Gefriertruhe im Mittel um 2,2 pmol/l kleiner, bei Kühlraum-Lagerung um 1,4 pmol/l größer und bei Lagerung bei Raumtemperatur um 0,8 pmol/l größer als der Mittelwert aller Messungen. Insgesamt unterschieden sich die Mittelwerte der „kurz“ und „lang“ gelagerten Proben um 4,1 pmol/l. Dies ist ein signifikanter Anstieg, da das 95 %-Konfidenzintervall die Null nicht enthält.

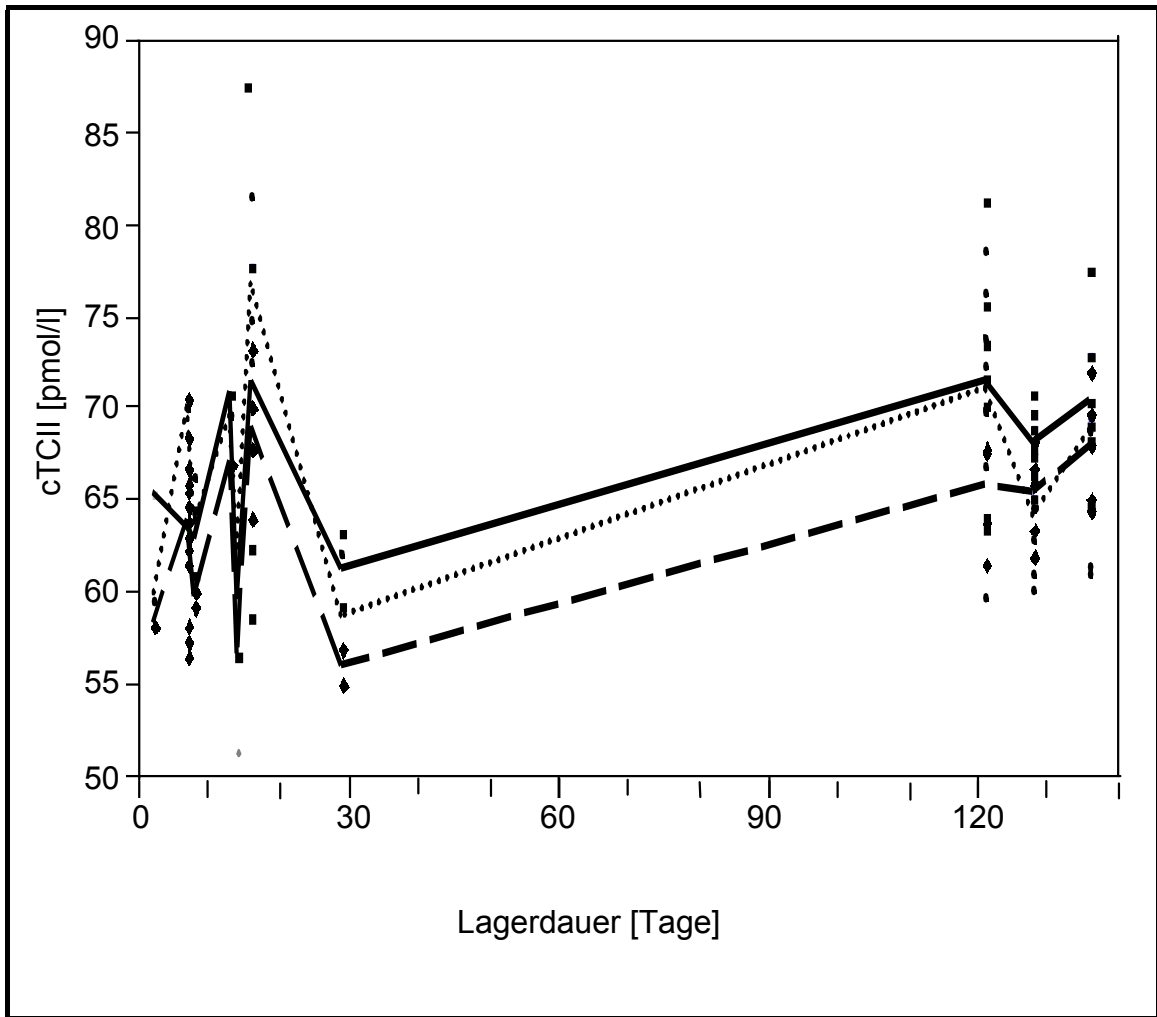


Abbildung 9: Konzentrationsänderung von Poolproben, die mit dem Holo TC RIA analysiert wurden (cTCII) in Abhängigkeit von Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur. Mittelwerte gleicher Lagerungstemperatur sind verbunden:

- Gefriertruhe ◆ - - - -
- Kühlraum ■ ————
- Raumtemperatur ●

Tabelle 12: Schätzungen der Mittelwertabweichungen

	Schätzwert [pmol/l]	95 %-Konfidenzintervall [pmol/l]
Gesamtmittelwert	66,3	65,6 bis 66,9
Mittelwertabweichung PG	-2,2	-3,0 bis -1,4
Mittelwertabweichung PK	+1,4	0,4 bis 2,3
Mittelwertabweichung PRT	+0,8	+0,0 bis 1,6
Mittelwertabweichung zwischen Lagerdauer „kurz“ und „lang“	+4,1	2,9 bis 5,4

Mittels p-Wert-Berechnungen zur Beurteilung der statistischen Signifikanz wurde zusätzlich auf das Vorhandensein von Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Faktoren untersucht, die Einfluss auf die Messergebnisse nehmen können, und zwar zwischen den Faktoren Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur, sowie zwischen Lagerungstemperatur und Analysenserie. Die Anzahl der Freiheitsgrade (FG) für den jeweiligen getesteten Effekt kann den Tabellen 13 und 14 entnommen werden.

Zunächst wurden diese beiden möglichen Wechselwirkungen gemeinsam betrachtet. Sie sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: p-Wert der Wechselwirkungen (1)

Wechselwirkung zwischen	FG	Chi-Quadrat	p-Wert
Lagerungsdauer ↔ Lagerungstemperatur	2	1,95	0,38
Lagerungstemperatur ↔ Analysenserie	16	9,57	0,89

FG: Freiheitsgrade

Anschließend erfolgte die Re-Analyse ohne Berücksichtigung der Wechselwirkung mit dem größeren p-Wert ($p = 0,89$), um zu erkennen, ob die andere Wechselwirkung zwischen der Lagerungsdauer und der Lagerungstemperatur ebenfalls als nicht signifikant zu bezeichnen ist. Der zugehörige p-Wert ist der Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: p-Wert der Wechselwirkungen (2)

Wechselwirkung zwischen	FG	Chi-Quadrat	p-Wert
Lagerungsdauer ↔ Lagerungstemperatur	2	3,29	0,19

Es konnte somit gezeigt werden, dass auch die Wechselwirkung zwischen den Faktoren Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur nicht berücksichtigt werden sollte, wenn man auf die Haupteffekte Geschlecht, Alter und Mess-Datum testet (vgl. Tabelle 15).

Der Anteil der durch die systematischen Effekte, also durch den Einfluss der drei berücksichtigten Faktoren Lagerungsdauer, Lagerungstemperatur und Analysenserie, erklärbaren Varianz (R^2) betrug 51 %. Dieser Anteil verringerte sich auf 45 %, berücksichtigte man die Möglichkeit, dass eventuell zu viele Faktoren miteinbezogen wurden (adjustierter Anteil).

Der Mittelwert der Messwerte war auch nach Berücksichtigung von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer noch abhängig von der jeweiligen Analysenserie.

3. Ermittlung eines Referenzintervalls

Die 112 vorliegenden Blutproben von Spendern der Tübinger Blutbank dienten als repräsentative Stichprobe zur Ermittlung eines Referenzintervalls für Gesunde. Das Referenzintervall muss zur Verwendung des neuen Labortests für Routine-Untersuchungen bekannt sein.

Individuelle Faktoren, die einzelne Probe betreffend, können derartige Berechnungen mitunter beeinflussen. Hier war an das Alter des Probanden beziehungsweise Patienten, an sein Geschlecht sowie an das Datum des jeweiligen Testansatzes zu denken. Vor den Berechnungen zur Ermittlung des Referenzintervalls waren daher diese Faktoren zu beurteilen.

Wie die Varianzanalyse zeigt (Tabelle 15), hatte lediglich das Geschlecht einen Einfluss. Eine Wechselwirkung zwischen Geschlecht und Alter des Probanden war nicht zu erkennen.

Tabelle 15: Effekt Tests (Testung auf die Haupteffekte, die die Messwerte beeinflussen können)

Quelle der Variation	FG	Quadratsumme	F	p-Wert
Geschlecht	1	4290,6	16,83	< 0,0001
Alter	1	203,0	0,80	0,37
Wechselwirkung zwischen Geschlecht und Alter	1	19,5	0,08	0,78
Mess-Datum	3	1627,6	2,13	0,10

Für einige Verfahren zur Referenzwertberechnung war die Kenntnis der Verteilung der Spiegel des TC II-gebundenen Vitamin B₁₂ nötig. Sie konnte als eine Normalverteilung angenommen werden, wie das Quantil-Quantil-Plot (Abbildung 10) bestätigt.

Zusätzlich wurde die Varianzhomogenität in einem Diagramm der Residuen nach den vorhergesagten Werten verifiziert. Die Residuen errechneten sich hierbei als Differenz zwischen den geschlechtsspezifischen Messwerten und dem jeweiligen Mittelwert.

Durch gemeinsame Betrachtung dieser Residuen und bei Annahme derselben Streuung für beide Geschlechter ließ sich eine **Reststreuung von 16,1 pmol/l** angeben. Der Mittelwert der 112 Beobachtungen lag bei 51,8 pmol/l.

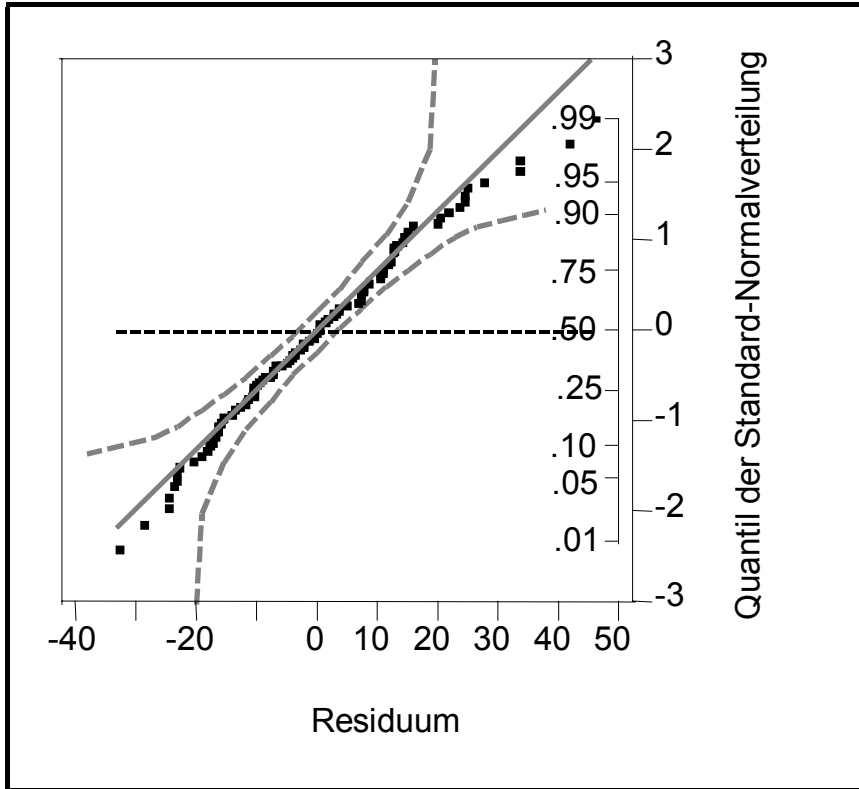


Abbildung 10: Quantil-Quantil-Plot zur Prüfung der Normalverteilungsannahme der Spiegel des TC II-gebundenen Vitamin B₁₂ in den Blutbankproben bei unterschiedlichen Mittelwerten für beide Geschlechter (auf das Geschlecht bedingte cTCII-Spiegel)

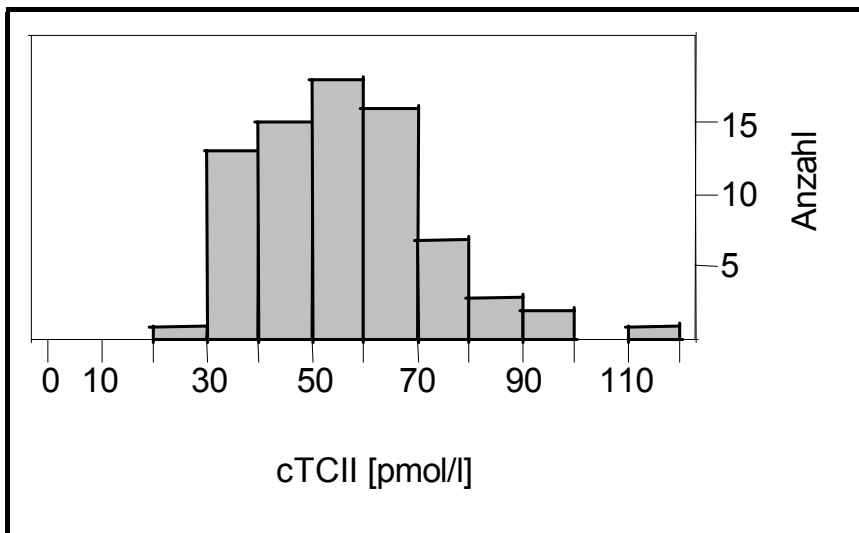


Abbildung 11: Häufigkeitsverteilung der Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ (cTCII) in der Gruppe der Männer, dargestellt als Histogramm

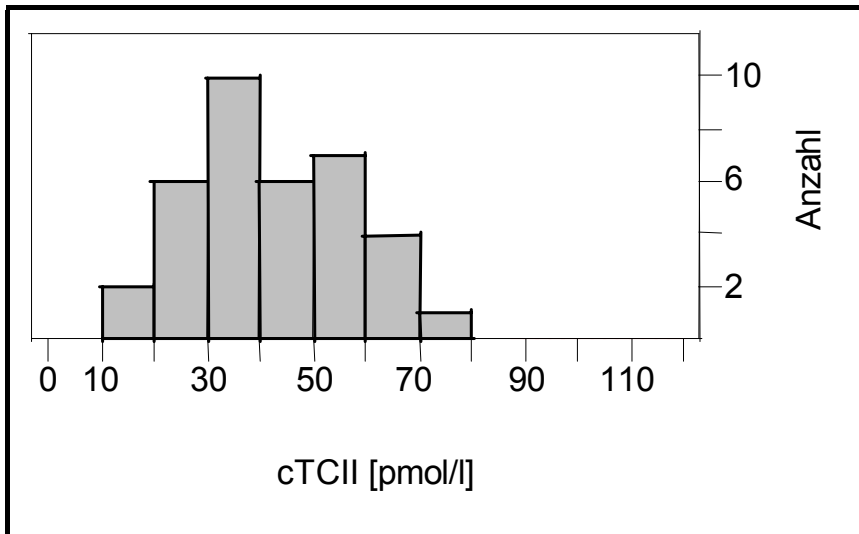


Abbildung 12: Häufigkeitsverteilung der Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ (cTCII) in der Gruppe der Frauen, dargestellt als Histogramm

Drei Möglichkeiten der Referenzwertbestimmung wurden angewandt:

1. Wurde die Normalverteilung angenommen und eine unterschiedliche Streuung (unterschiedliche Varianzen) der Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ der Blutbankproben zugelassen, ergab sich für **Männer ein Toleranzintervall von 18 bis 94 pmol/l, für Frauen von 6 bis 80 pmol/l**. Die Konfidenz war hier mit 0,95 angesetzt, die Überdeckung ebenfalls mit 0,95.

2. Bei der Annahme gleicher Varianzen der Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ für beide Geschlechter, einer Überdeckung von 0,95 und einer Konfidenz von 0,5 ergaben sich **Referenzintervalle für Männer von 24 bis 88 pmol/l, für Frauen von 11 bis 75 pmol/l**.

Im Durchschnitt besitzen Männer Konzentrationen, die um **12,9 pmol/l höher** sind als bei Frauen. Das Konfidenzintervall reichte hierbei von 6,5 pmol/l bis 19,4 pmol/l.

3. Als weitere Möglichkeit wurde das Referenzintervall durch Abzählen ermittelt. Es wurde also im Vergleich zu den beiden zuvor beschriebenen Methoden ohne Verteilungsannahme nur die vorliegende Stichprobe zur Ermittlung des Normbereiches herangezogen. Hierbei wurde nach den Richtlinien der IUPAC (99) vorgegangen: Für die Männer war demnach die zweitgrößte und die zweitkleinste Beobachtung heranzuziehen, für die Frauen die größte und die kleinste Beobachtung. Dies ergab **Normbereiche für Männer von 19,4 bis 95,7 pmol/l, für Frauen von 16,1 bis 73,0 pmol/l** mit 95 %-Konfidenzintervallen für die Überdeckung von 0,92 bis 0,99 (Männer) beziehungsweise von 0,93 bis 1 (Frauen).

4. Vergleich der Bestimmungsmethoden

Zunächst war von Interesse, ob die Messwerte der zwei zu vergleichenden Methoden, d. h. diejenigen der Routine-Bestimmung des Gesamt-Vitamin B₁₂ und diejenigen der Bestimmung des an TC II gebundenen Vitamin B₁₂ mittels des Holo TC RIA-Testkit, ineinander umrechenbar sind. Ein Umrechnungsfaktor wurde für zwei verschiedene Auswertedatensätze (DS1 und DS2) mit unterschiedlichen Ausschlusskriterien, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, berechnet. Hierzu erfolgten Hauptkomponentenregressionen mit konstantem relativem Fehler, sowie zum Vergleich die Regressionsanalyse nach der Methode von Passing und Bablok.

Ermittlung des Umrechnungsfaktors aus Datensatz 1 (DS1):

- Schätzung des Umrechnungsfaktors aus der Hauptkomponentenregression von log cTCII und log cB₁₂ mit relativem Messfehler (rel. E) bei beiden Größen:

$$\begin{aligned}
 cTCII &= 10^{-0,2} \cdot 10^{\log cB_{12} \cdot 0,8} \cdot \text{rel. E} \\
 &= 10^{-0,2} \cdot cB_{12}^{0,84} \cdot \text{rel. E} \\
 &= 0.6 \cdot cB_{12}^{0,84} \cdot \text{rel. E} \qquad (1)
 \end{aligned}$$

Approximiert aus der linearen Regression der vorhergesagten Werte ergibt sich:

$$cTCII = 8,6 + 0,216 \cdot cB_{12}^1 \quad (2)$$

Für diese beiden Ergebnisse gilt:

$$0.6 \cdot cB_{12}^{0,84} \cdot \text{rel. E} \approx 8,6 + 0,216 \cdot cB_{12}^1$$

Der Exponent 0,84 in Gleichung (1) hat ein Konfidenzintervall von 0,4 bis 1,8, was bedeutet, dass er = 1 sein könnte. Es ergab sich ein geschätzter Umrechnungsfaktor von **cTCII = 0,216 cB₁₂ + 8,6 pmol/l**.

Das Streudiagramm des DS1 mit der entsprechenden Regressionsgeraden zeigt die Abbildung 13.

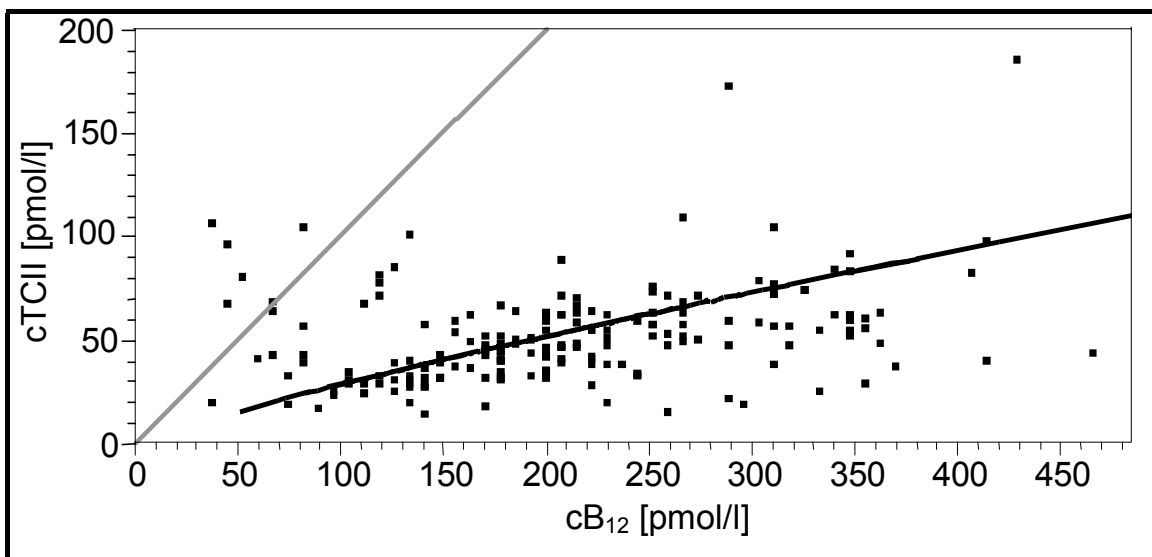


Abbildung 13: Hauptkomponentenregression von Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ auf die Konzentrationen an Gesamt-Vitamin B₁₂ im Datensatz 1 (DS1).

grau: Winkelhalbierende

schwarz: Hauptkomponenten-Regressionslinie der Logarithmen (log cTCII und log cB₁₂)

- Schätzung des Umrechnungsfaktors nach Passing und Bablok:

Bei diesem Verfahren konnte eine nicht-lineare Beziehung zwischen den beiden untersuchten Messverfahren nachgewiesen werden ($p < 0,01$). Somit lassen sich die Werte nicht einfach umrechnen. Soll die Umrechnung erfolgen, kann dies geschätzt nach der Formel **$cTCII = 0,23 cB_{12} + 2,55 \text{ pmol/l}$** geschehen.

Die 95 %-Konfidenzintervalle für die Steigung und den Achsenabschnitt sind der Tabelle 16 zu entnehmen, die grafische Darstellung erfolgt in Abbildung 14.

Tabelle 16: Regressionsgerade für DS1

	Wert	95 %-Konfidenzintervall
Achsenabschnitt	2,55	-6,36 bis 10,38
Steigung	0,23	0,19 bis 0,28

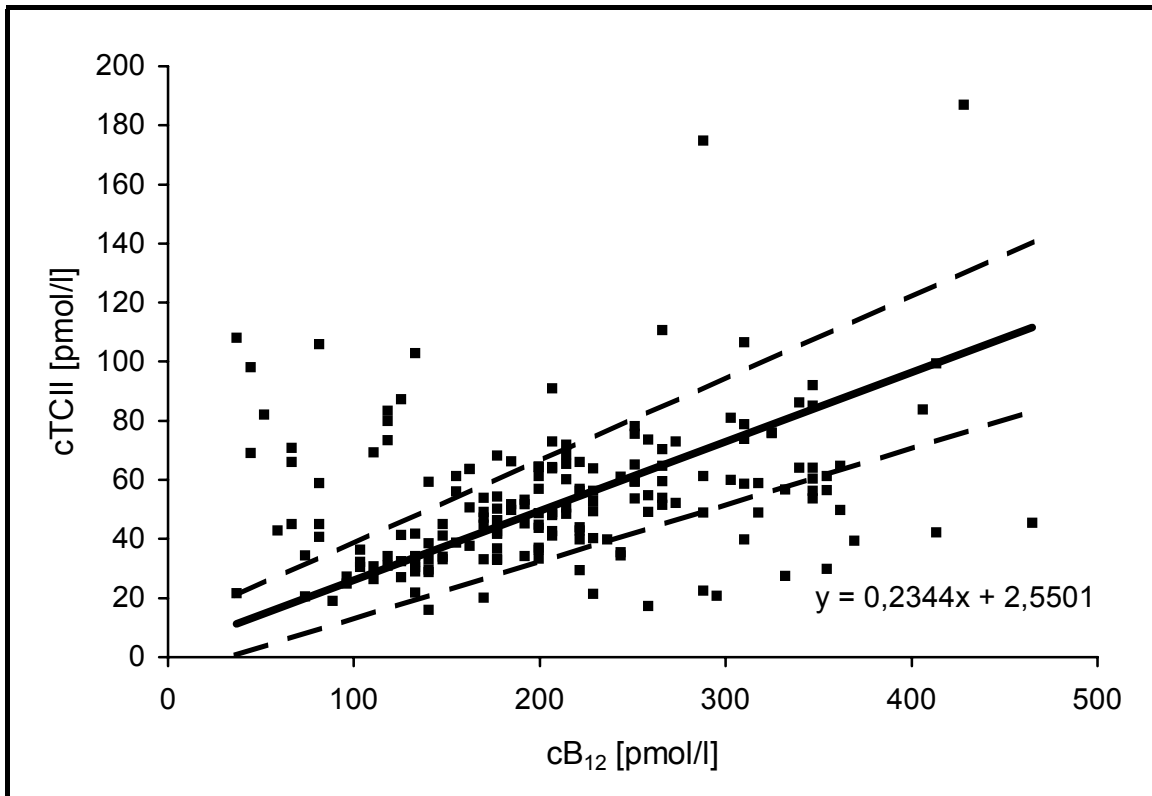


Abbildung 14: Regression von cTCII auf cB₁₂ nach Passing und Bablok im Datensatz 1 (DS1).

durchgezogene Linie: Regressionsgerade

gestrichelte Linien: Grenzen des 95 %- Konfidenzintervalls der Steigung

Ermittlung des Umrechnungsfaktors aus Datensatz 2 (DS2):

- Schätzung des Umrechnungsfaktors aus der Hauptkomponentenregression von log cTCII und log cB₁₂ mit relativem Messfehler bei beiden Größen:

$$cTCII = -0,775 \cdot cB_{12}^{1,05} \quad (1)$$

Approximiert aus der linearen Hauptkomponentenregression der vorhergesagten Werte ergibt sich:

$$cTCII = -2,6 + 0,24 \cdot cB_{12}^1 \quad (2)$$

Es gilt:

$-0,775 \cdot cB_{12}^{1,05} \approx -2,6 + 0,24 \cdot cB_{12}^1$. Es kann somit ein Umrechnungsfaktor von **cTCII = 0,24 cB₁₂ - 2,6 pmol/l** angegeben werden.

Die folgende Abbildung 15 veranschaulicht die Lage der Regressionsgeraden im Streudiagramm des DS 2.

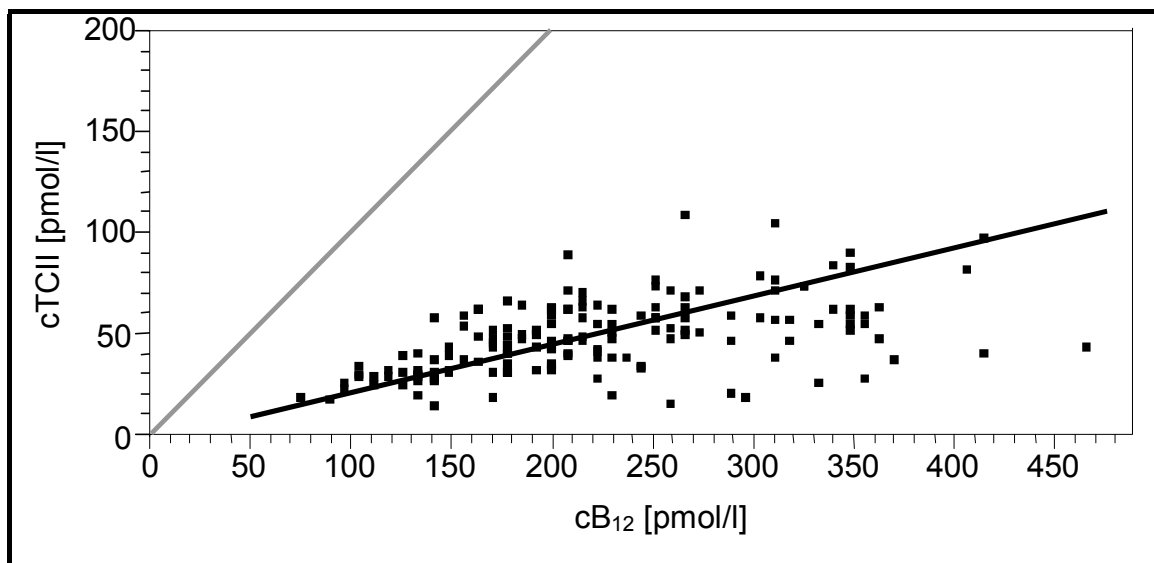


Abbildung 15: Hauptkomponentenregression von Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ auf die Konzentrationen an Gesamt-Vitamin B₁₂ im Datensatz 2 (DS2).

grau: Winkelhalbierende

schwarz: Hauptkomponenten-Regressionslinie der Logarithmen

- Schätzung des Umrechnungsfaktors nach Passing und Bablok:

Bestätigt wurde die nicht-lineare Beziehung zwischen den Ergebnissen der beiden Messverfahren ($p < 0,01$).

Hier lautet die Umrechnungsformel **cTCII = 0,24 cB₁₂ - 0,17 pmol/l** mit 95 %-Konfidenzintervallen wie in Tabelle 17 dargestellt. Die grafische Darstellung erfolgt in Abbildung 16.

Tabelle 17: Regressionsgerade für DS2:

	Wert	95 %-Konfidenzintervall
Achsenabschnitt	-0,17	-7,67 bis 7,11
Steigung	0,24	0,20 bis 0,28

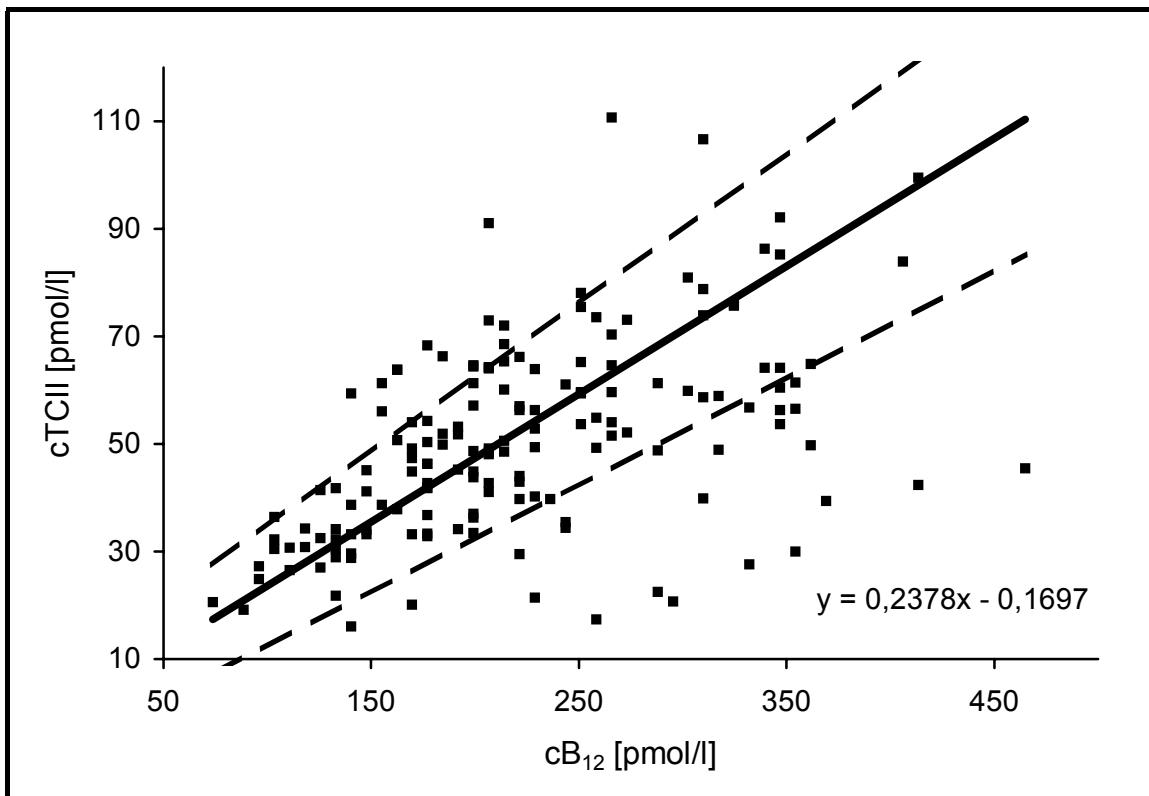


Abbildung 16: Regression von cTCII auf cB₁₂ nach Passing und Bablok im Datensatz 2 (DS2).

durchgezogene Linie: Regressionsgerade

gestrichelte Linien: Grenzen des 95 %- Konfidenzintervalls der Steigung

5. Vergleich mit dem Schilling-Test

Die Vierfeldertafel in Abbildung 17 veranschaulicht den Zusammenhang der 14 Schilling-Test-Ergebnisse mit den Resultaten aus der Bestimmung der im Holo TC RIA ermittelten Konzentrationen bei denselben Patienten. Es wurde für beide Geschlechter gemeinsam getestet.

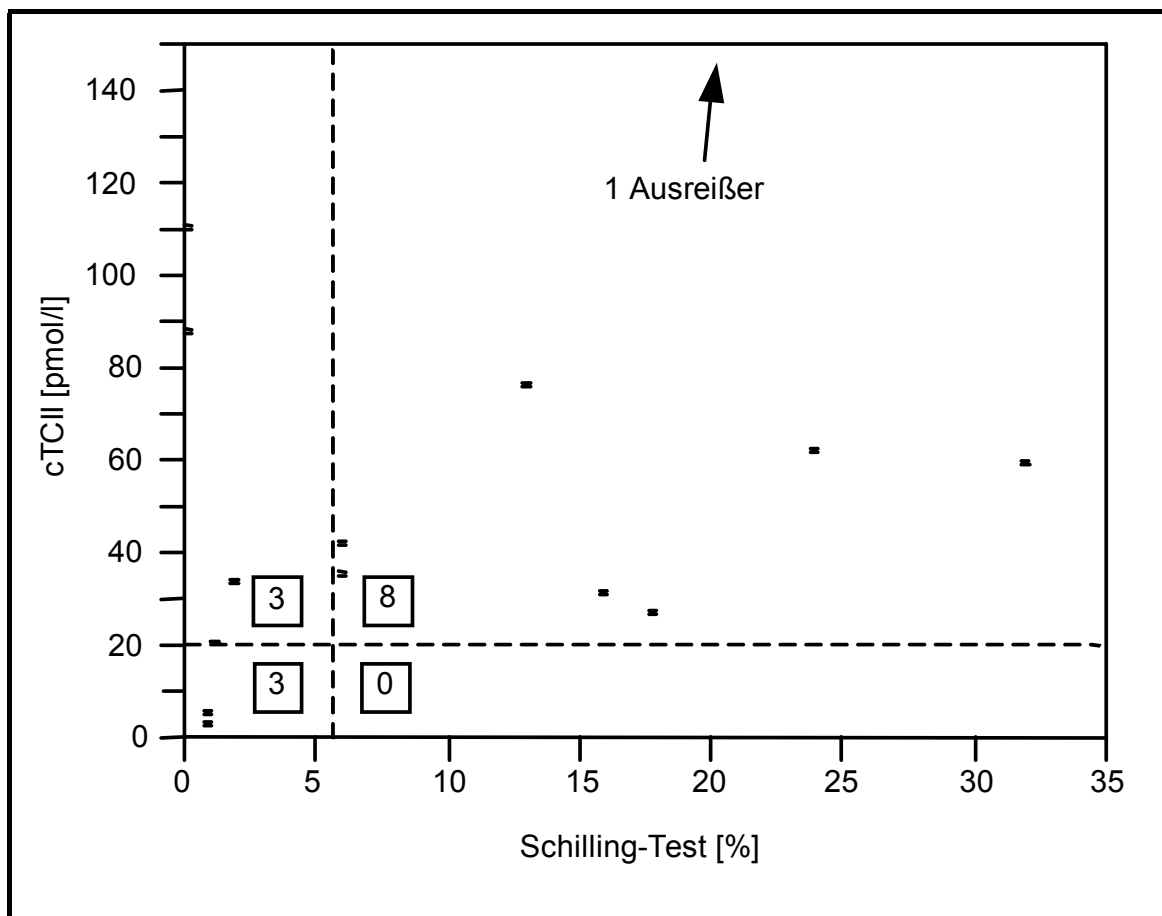


Abbildung 17: Vierfeldertafel zum Vergleich Holo TC RIA / Schilling-Test. Als Grenzen zwischen normalen und erniedrigten Werten wurden beim Holo TC RIA für cTCII 20 pmol/l, beim Schilling-Test für die Urinexkretion 6 % angesetzt.

Bei den angesetzten Grenzen zwischen normalen und erniedrigten Werten von 20 pmol/l für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ beziehungsweise 6 % ⁵⁷Co-Vitamin B₁₂ Urinexkretion beim Schilling-Test ergaben sich für die **Sensitivität: 3 von 6 (50 %)**, für die **Spezifität: 8 von 8 (100 %)**.

VI DISKUSSION

Die auch in neuesten Studien bestätigte hohe Prävalenz des Vitamin B₁₂-Mangels auf der einen Seite, sowie die Nichterkennung davon betroffener, meist älterer Patienten auf der anderen Seite, unterstreicht die Forderung nach Optimierung der aktuellen Diagnostik (32, 63, 96). Hinzu kommt die ständig wachsende Tragweite des Cobalaminmangels weit über Blutbildveränderungen und neurologische Störungen hinaus. Erst jüngst konnte auch eine negative Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch einen Vitamin B₁₂-Mangel gezeigt werden (117).

Die Diskussion um das beste diagnostische Vorgehen ist voll entbrannt (107). Einigkeit herrscht inzwischen darüber, dass Transcobalamin II als Vitamin B₁₂-Bindungsprotein durch schnelle Reaktion auf Veränderungen im Cobalamin-Stoffwechsel als interessanter Laborparameter zur frühzeitigen Diagnose des Cobalaminmangels anzusehen ist (63, 64, 79, 94). Vitamin B₁₂ steht nur in Form des holo-Transcobalamin II für den menschlichen Stoffwechsel zur Verfügung. In der klinischen Routine wird dieser Marker deshalb so selten angewandt, weil kein allgemein anerkannter und etablierter Labortest für seine Bestimmung zur Verfügung steht. Die Suche nach einem solchen Test ist in vollem Gange und die Ideen und Ansätze hierzu sind vielfältig. Dies betrifft die Wahl des Verfahrens zur Isolierung des TC II ebenso wie die Bestimmung der isolierten Menge.

Zur Zeit ist die endgültige diagnostische Bedeutung des holo-TC II als Laborparameter noch nicht abzusehen (70). Die Hoffnung jedenfalls ist, durch seine Anwendung Cobalamin-defiziente Patienten mit augenscheinlich normalem Gesamt-Vitamin B₁₂-Status frühzeitiger zu erkennen. Auch unnötige Substitutionstherapien bei Menschen mit niedrigem Gesamt-Vitamin B₁₂ bei ausreichend biologisch verfügbarem, TC II-gebundenem Cobalamin (holo-TC II) könnten vermieden werden.

Mit dem neuen Holo TC RIA, der in dieser Studie untersucht wurde, ist ein Labortest auf dem Markt, der ohne Umwege oder Umrechnungen die direkte

Bestimmung des Spiegels von an TC II gebundenem Vitamin B₁₂ in Serum oder EDTA-Plasma ermöglicht.

Die Beurteilung seiner Durchführbarkeit in der Alltags-Routine und seiner verfahrenstechnischen Qualität, die Definition eines Referenzbereiches für die gemessene Größe sowie der Vergleich mit etablierten Methoden sind die Ziele dieser Studie.

1. Durchführbarkeit im Routine-Labor

1.1 Vorteile

Neben dem Testkit des Holo TC RIA sind keine außergewöhnlichen Geräte nötig, die nicht in einem standardmäßig ausgestatteten RIA-Labor vorhanden sind.

Der Testablauf ist durchaus mit dem anderer üblicher Radioimmunoassays vergleichbar. Probleme bei der Eingliederung des untersuchten Tests in die Alltags-Routine dürften demnach nicht zu erwarten sein.

Ein Vorteil, vor allem im Vergleich zu ähnlichen Testverfahren, ist die schwache radioaktive Markierung des Assays und die daraus resultierende Reduzierung der Gefahren beim Umgang mit radioaktiven Materialien.

1.2 Nachteile

Trotz der gewählten schwachen radioaktiven Markierung des Tracers kann auf die üblichen notwendigen Vorkehrungen, die sich aus dem Umgang mit radioaktivem Material ergeben, nicht verzichtet werden.

Eine Folge der schwachen Markierung ist eine lange Messdauer der einzelnen Proben im Gammacounter von bis zu zehn Minuten, die nötig ist, um eine ausreichende Zählstatistik zu erreichen. Meist sind hier eine bis fünf Minuten üblich, um 10000 Impulse zu zählen. Der statistische Zählfehler liegt dann unter 1 %.

Als manueller Labortest erfordert der Holo TC RIA ein standardisiertes, routiniertes Vorgehen sowie Erfahrung beim Pipettieren und Aufschütteln paramagnetischer Mikrosphären.

Lange Inkubations- und Mischungszeiten von bis zu 60 Minuten, die für die Doppelbestimmung von etwa 40 bis 50 Patientenproben - mit Kontrollen und Standards also etwa 100 bis 120 Probenröhrchen – einen Zeitaufwand von etwa vier Stunden erfordern, sind ein weiterer Nachteil.

Eine gewisse Organisation wird durch die begrenzte Lagerungsbeständigkeit der angemischten Reagenzien von teilweise nur zwei Tagen (Tracer-Reductant-Mischung) nötig.

1.3 Gesamtbeurteilung

Das dem neuen Holo TC RIA zugrunde liegende Prinzip stellt kein außergewöhnliches Verfahren dar, erfordert aber wegen der vielen manuellen Schritte eine gewisse Erfahrung. Die Messung der Radioaktivität im Gammazähler und die Auswertung der Ergebnisse lässt sich automatisieren. Dagegen ist die Bestimmung des Gesamt-Vitamin B₁₂ auf dem ADVIA-Centaur-Gerät voll automatisiert.

Letztendlich ist bei Einführung des Holo TC RIA in die Routine-Diagnostik sicher auch bei diesem neuen Verfahren eine Teilautomatisierung möglich und zu erwarten. Bis dahin bleiben die besseren diagnostischen Aussagen das Hauptargument für die Durchführung dieses Labortests.

Da ein Testkit auf die Bestimmung von etwa 50 Patientenproben (etwa 120 Probenröhrchen) ausgelegt ist und die oben erwähnte Lagerungsbeständigkeit Grenzen setzt, ist ein Sammeln von Blutproben für einen gemeinsamen Ansatz durchaus sinnvoll.

Für den anfordernden Arzt bleibt die relativ große abzunehmende Probenmenge von 0,8 ml für die Doppelbestimmung zu beachten.

2. Beurteilung der Testgüte

2.1 Interne Qualitätssicherung

Die Kontrollkurven in Abbildung 8 zeigen für die Folge der elf Analysenserien eine sehr gute Präzision. Dies ist daran zu erkennen, dass sich die tatsächlich gefundenen Konzentrationswerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ bei beiden Kontrollserien in einem Bereich bewegen, der in etwa nur halb so breit ist wie zulässig.

Die Richtigkeit muss als weniger gut beurteilt werden. Grund hierfür ist die zu niedrige gemessene Konzentration für die Kontrolle im hohen Konzentrationsbereich (CH) in der Analysenserie 8, der den Kontrollbereich von +/-15 % um den Zielwert eben gerade nach unten verlässt. Es ist folgende Einschränkung zu machen:

Einschränkung: Die Richtigkeit der erhaltenen Messwerte für die Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ der in der Analysenserie 8 verwendeten Proben ist als reduziert zu beurteilen. Aufgrund der über alle elf Analysenserien nachgewiesenen sehr guten Präzision konnten auch die betroffenen Daten ohne Bedenken mit in die weiteren Berechnungen einbezogen werden. Als Folge ist lediglich zu berücksichtigen, dass die im Abschnitt Methodenvergleich ermittelten Umrechnungsfaktoren mitunter vernachlässigungswürdig größer ausfallen könnten.

Diese Einschränkung wird hinfällig, sollte sich nach weiteren Untersuchungen zeigen, dass Zielwert und Zielbereich für CH insgesamt nach unten zu korrigieren sind, wofür vor allem spricht, dass auch die gemessenen Werte der anderen Analysenserien für CH im unteren Abschnitt des Kontrollbereiches liegen.

2.2 Präzision in der Serie

Da die 111 für diese Untersuchung verwendeten Serumproben demselben Pool entnommen wurden, lagen die zu erwartenden Messwerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ alle in einem engen Konzentrationsbereich. Aus diesem Grund wurde zur Beurteilung der Präzision eine Varianzanalyse zur Ermittlung der Intra-Assay-Standardabweichung (Intra-Assay-SD) durchgeführt – dies im Unterschied zur Bestimmung des sonst oftmals üblichen Variationskoeffizienten (VK). Auch der VK wurde berechnet und dient in Anlehnung an Testverfahren für gängige Laborparameter zur Einordnung der hier gefundenen Präzision (vgl. 19). Getrennt für die drei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen ergaben sich für die Intra-Assay-SD und den Intra-Assay-VK: PG: 3,28 pmol/l und 5,1 %, PK: 5,31 pmol/l und 7,8 %, PRT: 4,67 pmol/l und 7,0 % (vgl. Tabelle 10).

Es zeigt sich hier die Auswirkung der jeweiligen Lagerungstemperatur auf die Intra-Assay-SD und somit auf die Messwerte, worauf unten näher eingegangen wird.

2.3 Präzision von Analysenserie zu Analysenserie

Für die Bestimmung der Präzision von Analysenserie zu Analysenserie wurde die Inter-Assay-Standardabweichung (Inter-Assay-SD) bestimmt. Diese beträgt für die zehn in diese Berechnung eingehenden Analysenserien 3,13 pmol/l.

2.4 Gesamtbeurteilung der Präzision

Die Gesamt-Standard-Abweichung, die sich wie oben beschrieben aus der Intra-Assay-SD und der Inter-Assay-SD berechnen ließ, beträgt etwa 6 pmol/l.

2.5 Schlussfolgerung

Als bislang nicht routinemäßig bestimmter Laborparameter gibt die entsprechende Richtlinie der Bundesärztekammer (19) für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ keine bindenden Grenzwerte für die Intra-Assay-SD oder den Intra-Assay-VK an. Die hier gefundenen Variationskoeffizienten unter 8 % und Standardabweichungen bis 6 pmol/l sind aber durchaus mit den für andere Stoffe geltenden VK und SD vergleichbar. Eine ausreichende Präzision beim Holo TC RIA wird somit als gegeben betrachtet.

Durch die hier gefundenen Werte konnten zudem die Ergebnisse anderer Studien zum Holo TC RIA bestätigt werden: Ulleland et al. (2002) fanden für den Intra-Assay-VK einen Wert von 5 %, für den Gesamt-VK 8-9 % (120). Loikas et al. (2003) konnten für den Intra-Assay-VK Werte von 4-7 %, für den Inter-Assay-VK 6-8 % ermitteln (80). Obeid et al. (2004) geben Variationskoeffizienten von 5-8 % an (96).

3. Einfluss von Lagerungsdauer, Lagerungstemperatur und Analysenserie auf die Messergebnisse

Um Richtlinien für den Umgang mit Blutproben, die für die Bestimmung von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ vorgesehen sind, geben zu können, wurde nach eventuell vorhandenen Einflüssen verschiedener Lagerungsbedingungen auf die Messergebnisse gesucht. Studien hierzu existieren bislang nicht (80). Als Faktoren, die im klinischen Alltag von Interesse sind, wurden die Lagerungstemperatur, die Zeitdauer zwischen Blutabnahme und Auswertung sowie die jeweilige Analysenserie untersucht. Auch etwaige Wechselwirkungen zwischen diesen Faktoren sollten gefunden werden.

Ausreißer unter den Messwerten gab es bei diesen Untersuchungen nicht, sodass hierauf nicht weiter eingegangen werden musste.

3.1 Lagerungsdauer

Der Einfluss der Lagerungsdauer muss durch den ermittelten p-Wert ($p < 0,0001$) (vgl. Tabelle 11) als statistisch signifikant angesehen werden. Auch der Anstieg der Konzentrationen von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ um 4,1 pmol/l, der sich beim Vergleich der kurz und der lang gelagerten Proben herausstellte, ist statistisch signifikant. Als Hauptgrund ist hierfür wohl ein über die Zeit stattfindender Wasserverlust mit Konzentrierung der eingelagerten Proben anzunehmen. Auch eine Umlagerung von freiem und an andere Bindungsproteine gebundenem Cobalamin an Transcobalamin II ist vorstellbar, jedoch weniger wahrscheinlich.

Zu beachten bleibt, dass die dieser Untersuchung zugrunde liegenden Lagerungszeiten von bis zu 136 Tagen nicht den in der Alltagsroutine üblichen kürzeren Aufbewahrungszeiten für Blutproben entsprechen.

3.2 Lagerungstemperatur

Als zu untersuchende Aufbewahrungsmöglichkeiten mit den entsprechenden Temperaturen wurden gewählt: der Arbeitsraum, der Kühlraum und die Gefriertruhe. Einen vorhandenen Einfluss auf die Messwerte bestätigt der p-Wert von 0,001 (vgl. Tabelle 11).

Bemerkenswert ist, dass die Messwerte der in der Gefriertruhe eingelagerten Proben sowohl im Mittel am kleinsten waren als auch die kleinste Streuung zeigten. Die Mittelwerte der Messungen der bei Raumtemperatur und bei Kühlraum-Temperatur gelagerten Proben sowie deren Streuungen unterschieden sich nicht signifikant.

Die Unterschiede bei den Streuungen dürfen als zufällig angesehen werden, die Genauigkeit ist also durch die gewählte Lagerungstemperatur nicht merklich zu beeinflussen.

3.3 Analysenserie

Auch ein Einfluss der jeweiligen Analysenserie auf die Messwerte konnte gefunden werden ($p < 0,0001$) (vgl. Tabelle 11). Nach Berücksichtigung von Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur besteht noch eine Abhängigkeit der Mittel der Konzentrations-Messwerte von der jeweiligen Analysenserie. Somit muss dieser Einfluss gegenüber demjenigen von Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur als der größte betrachtet werden.

3.4 Wechselwirkungen

Vermutete Wechselwirkungen zwischen der Lagerungsdauer und der Lagerungstemperatur sowie zwischen der Lagerungstemperatur und der Analysenserie konnten nicht gefunden werden ($p = 0,38$ bzw. $p = 0,19$) (vgl. Tabellen 13 und 14).

3.5 Schlussfolgerung

Aus den Abschnitten 3.1 und 3.2 folgt für die Praxis, dass nach Möglichkeit die Gefriertruhenlagerung gewählt werden sollte, insbesondere bei längerer Aufbewahrung der Proben zwischen Blutabnahme und Auswertung. Diese Empfehlung dürfte jedoch im Rahmen klinischer Studien von größerer Bedeutung sein als in der alltäglichen Diagnostik.

Eine sichere standardisierte und routinierte Durchführung der Analyse erscheint insgesamt wichtiger als besondere Maßnahmen bei der Aufbewahrung der Proben. Unterstrichen wird diese Empfehlung durch den Anteil der durch systematische Effekte erklärbaren Varianz (R^2) von 51 % beziehungsweise adjustiert 45 %. Eine nicht standardisierte Vorgehensweise verdoppelt demnach die Varianz, die Standardabweichung steigt in der Folge um etwa 40 %.

Möglicherweise ist sogar die Einhaltung genauer Vorgaben bei der Blutentnahme zu fordern. Erste Anhaltspunkte hierfür wurden kürzlich beim

Vergleich von Messwerten für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ aus Proben nüchterner und nicht nüchterner Probanden gefunden. Im Nüchternserum waren die Messwerte im Durchschnitt um 2 pmol/l (16 %) höher als im nicht nüchternen Zustand (82).

4. Referenzbereich

Für die klinische Anwendung eines bislang nicht bestimmten Laborwertes ist die Kenntnis seines Normwertes mit Referenzintervall für Gesunde nötig. In der vorliegenden Studie dienten 112 Serumproben als gesund angenommener Spender der Tübinger Blutbank als repräsentative Stichprobe.

Um eventuell vorhandene Einflüsse auf die Berechnungen durch Faktoren, die die einzelnen Individuen betreffen, mitbeurteilen zu können, erfolgten Voruntersuchungen. Hierbei zeigte sich, dass eine Beeinflussung durch das Geschlecht besteht ($p < 0,0001$), das Alter der Probanden und das Messdatum jedoch keine Rolle spielen ($p = 0,37$ bzw. $p = 0,10$). Ebenfalls konnte keine Wechselwirkung zwischen dem Geschlecht und dem Alter des jeweiligen Probanden gefunden werden ($p = 0,78$) (vgl. Tabelle 15).

Zum Vergleich sollte nun ein Referenzintervall, aufgrund des Einflusses des Geschlechts getrennt für Männer und Frauen, auf drei verschiedenen Wegen ermittelt werden.

Mit der Kenntnis der Verteilung der Messwerte als Normalverteilung, was vorab bestätigt wurde, konnten zwei Berechnungen durchgeführt werden, die sich in den Annahmen für die Varianzen, die Konfidenz und die Überdeckung unterscheiden. Die Ergebnisse für die Toleranz- und Referenzintervalle sind in Tabelle 18 zusammengestellt.

Als dritte Möglichkeit wurde jene herangezogen, die die IUPAC in (99) vorgibt. Diese Möglichkeit berücksichtigt nur die vorliegende Stichprobe.

Tabelle 18: Toleranz- und Referenzintervalle nach den drei verschiedenen Methoden

Methoden und Annahmen	Männer [pmol/l]	Frauen [pmol/l]
Normalverteilung unterschiedliche Varianzen Konfidenz = 0,95 Überdeckung = 0,95	Toleranzintervall 18 bis 94	Toleranzintervall 6 bis 80
Normalverteilung gleiche Varianzen Konfidenz = 0,5 Überdeckung = 0,95	Referenzintervall 24 bis 88	Referenzintervall 11 bis 75
nach IUPAC Ermittlung durch Abzählen Konfidenz = 0,95	Referenzintervall 19,4 bis 95,7 (Überdeckung 0,92 bis 0,99)	Referenzintervall 16,1 bis 73,0 (Überdeckung 0,93 bis 1)

Die Ähnlichkeit der Ergebnisse aller drei verglichenen Verfahren stellt eine sichere Basis für die praktische Anwendung dar. Zu beachten bleibt, dass Männer im Durchschnitt um 12,9 pmol/l höhere Konzentrationen besitzen als Frauen.

In früheren Studien, denen ebenfalls der hier untersuchte Holo TC RIA zugrunde liegt, wurden mittels anderer Verfahren Referenzintervalle von 24 bis 157 pmol/l (120) beziehungsweise von 37 bis 171 pmol/l errechnet (80). Von Interesse ist hier insbesondere der untere Grenzwert. Er erlangt im Gegensatz zum oberen Ende des Referenzintervalls bei der Diagnostik des Cobalaminmangels besondere Bedeutung für die Klinik. Die Übereinstimmung mit Ulleland et al. (120) ist offensichtlich, jedoch ist auch hier und wahrscheinlich noch mehr bei Loikas et al. (80) die Population der herangezogenen Stichprobe zu beachten. Bei der von Loikas et al. (80) ausgewählten Population handelte es sich um Personen aus einem eng umschriebenen Landbezirk im Süden Finnlands. Die hier beschriebenen, bei

Frauen im Mittel um 11 pmol/l höheren Messwerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ im Konzentrationsbereich > 100 pmol/l stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie. Hier dürfte die untersuchte Stichprobe eine Rolle spielen. Einflussfaktoren, wie beispielsweise die zu erniedrigten Serum-Cobalaminspiegeln führende Einnahme hormoneller Kontrazeptiva (34, 66, 86, 87, 113), sprechen eher für niedrigere Messwerte bei Frauen als bei Männern. Die hier vorgelegten Resultate erscheinen somit plausibler.

5. Vergleich der Bestimmungsmethoden

5.1 Entwicklung der Datensätze

Die Messung von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ mit dem Holo TC RIA wurde an 231 Proben durchgeführt. Die Ergebnisse sollten noch mit denen der im Routine-Labor verwendeten Bestimmung des Gesamt-Vitamin B₁₂-Spiegels mit dem ADVIA Centaur Testsystem verglichen werden. Bei 45 Proben war hierfür zu wenig Material vorhanden, sodass 186 Seren von 184 Patienten in die vergleichende Auswertung eingehen konnten. Vor den ersten Berechnungen mussten noch acht weitere Proben ausgeschlossen werden, deren Konzentration von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ außerhalb des vom Hersteller zugelassenen Quantifizierungsintervalls von 15 bis 320 pmol/l lagen (drei unterhalb, fünf darüber). Somit bestand der erste Datensatz (DS1) aus 178 Proben von 177 Personen.

Die Inhomogenität innerhalb des DS1, die sich bei Betrachtung des Streudiagramms (vgl. Abbildung 5) zeigte, ließ eine mögliche starke Beeinflussung der Regressionsgeraden durch die Mittelwerte einzelner Gruppen innerhalb der Gesamtheit erwarten. Diese Beeinflussung sollte vor einem weiteren Vergleich möglichst ausgeglichen werden. Hierzu wurden drei Ausschlusskriterien festgelegt, durch die einzelne Proben des DS1 aufgrund plausibler Gründe von den Berechnungen ausgeschlossen wurden:

1. Zwei Proben wiesen Messwerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ deutlich über normal hohen Konzentrationen auf (175 pmol/l und höher). Es war dann von einer Vitamin B₁₂-Gabe vor Blutentnahme, einer Verunreinigung oder einer sonstigen Störung auszugehen. Deshalb wurden diese Proben ausgeschlossen.
2. TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ stellt einen Teil des gesamten in der Blutbahn vorhandenen Vitamin B₁₂ dar. Somit ist der Anteil des an TC II gebundenen Cobalamin kleiner als 1, maximal aber gleich 1. In letzterem Fall liegt das ganze in der Blutbahn zirkulierende Vitamin B₁₂ in Form des holo-TC II vor, symbolisiert durch die Winkelhalbierende im Streudiagramm in Abbildung 5. Diese Konstellation ist jedoch unwahrscheinlich. Sieben Proben mit einem scheinbaren holo-TC II-Anteil größer oder gleich 1 wurden deshalb ausgeschlossen.
3. Nun wurden die individuellen Verhältnisse der Messwerte für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ und Gesamt-Vitamin B₁₂ in einem Histogramm dargestellt (vgl. Abbildung 6). Bei Annahme einer Mischung zweier Normalverteilungen zeigte sich eine große Gruppe unterhalb einer Grenze von 0,45 und eine kleine Gruppe mit 13 Proben oberhalb dieser Grenze der individuellen Verhältnisse, d. h. einem TC II-gebundenen Anteil am Gesamt-Vitamin B₁₂ von 45 % und höher. Diese Gruppe wurde ausgeschlossen, da sie aufgrund der eigenen Normalverteilung als eigenständiger Cluster aufzufassen war. Auf einen nach den Berechnungen zu vermutenden möglichen weiteren kleinen Cluster mit einer weiteren Normalverteilung um ein individuelles Verhältnis von etwa 0,55 wurde ebenfalls nicht weiter eingegangen.

Nach dem Ausschluss konnte somit ein recht homogener Datensatz (DS2) mit 156 Proben ausgewertet werden (vgl. Abbildung 7).

5.2 Rechnerischer / statistischer Methodenvergleich

Mit einem rechnerischen / statistischen Methodenvergleich sollte geprüft werden, ob ein konstanter Umrechnungs-Faktor zwischen den zwei zu vergleichenden Testverfahren existiert. Die Kenntnis eines solchen Faktors würde die Bedeutung eines der Laborteste minimieren, wenn nicht sogar einen der beiden überflüssig machen.

Zwei statistische Verfahren zum Methodenvergleich wurden angewandt:

5.2.1 Hauptkomponentenregression

Nach der Hauptkomponentenregression mit konstantem relativem Messfehler ergeben sich für DS1 und DS2 geschätzte Umrechnungsformeln, die in der Tabelle 19 gegenübergestellt sind.

5.2.2 Regression nach Passing und Bablok

Der Vorteil der Methode nach Passing und Bablok ist, dass sie die Regressionsgerade nicht durch den Nullpunkt zwingt. Dies trägt der Tatsache Rechnung, dass stets ein Teil des Vitamin B₁₂ an TC II gebunden vorliegt.

Die für DS1 und DS2 geschätzten Umrechnungs-Formeln sind in Tabelle 19 aufgeführt, für DS2 ist der Achsenabschnitt mit 0,17 pmol/l vernachlässigungswürdig.

Es ist zu beachten, dass für DS1 eine nicht lineare Beziehung zwischen den zwei Messverfahren nachgewiesen wurde. Der DS2 bestätigte dies. Aus diesem Grund dürfen die Messwerte für Gesamt-Vitamin B₁₂ und TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ nicht einfach mittels eines festen Umrechnungsfaktors umgerechnet werden.

Tabelle 19: Geschätzte Umrechnungsformeln aus den verschiedenen Verfahren für DS1 und DS2

Regressionsanalyse	DS	geschätzte Umrechnungsformel
Hauptkomponenten	1	$c_{TCII} = 0,216 c_{B_{12}} + 8,6 \text{ pmol/l}$
Passing und Bablok	1	$c_{TCII} = 0,23 c_{B_{12}} + 2,55 \text{ pmol/l}$
Hauptkomponenten	2	$c_{TCII} = 0,24 c_{B_{12}} - 2,6 \text{ pmol/l}$
Passing und Bablok	2	$c_{TCII} = 0,24 c_{B_{12}} - 0,17 \text{ pmol/l}$

5.2.3 Beurteilung

Geschätzt nach den oben genannten, einander ähnlichen Umrechnungsformeln zwischen Gesamt-Vitamin B₁₂ und TC II-gebundenem Vitamin B₁₂, beträgt der Anteil des an TC II gebundenen Vitamin B₁₂ etwa 20 bis 25 %. Wie im Kapitel 2.1 bereits erwähnt, müssen diese Werte eventuell minimal nach oben korrigiert werden. Aufgrund der nachgewiesenen nicht linearen Beziehung zwischen den beiden Messverfahren und aufgrund der großen Streuungen sollte die Umrechnung jedoch prinzipiell nicht durch einen Umrechnungsfaktor erfolgen. Ist der Serumspiegel von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ bei einem Patienten von Interesse, darf auf die Bestimmung dieses Wertes mittels eines hierfür geeigneten Testverfahrens nicht verzichtet werden.

Insbesondere die mögliche Existenz einer Gruppe von Patienten mit einem ungewöhnlich niedrigen Anteil von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ am Gesamt-Cobalamin unterstreicht diese Forderung. Hinweise auf das Vorhandensein einer solchen Gruppe geben sowohl das Streudiagramm des DS2 in Abbildung 9, nach dem etwa 10 % Ausreißer nach unten plausibel erscheinen, als auch die oben erwähnte, nicht lineare Beziehung zwischen den beiden Messverfahren.

Auch Ausreißergruppen mit ungewöhnlich hohem Anteil an TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ existieren, wie im Histogramm der individuellen Verhältnisse der Messwerte (Abbildung 6) unschwer zu erkennen ist.

Derartige Gruppen werden wohl das größte klinische Interesse auf sich ziehen, da sie die bislang fälschlicherweise nicht therapierten beziehungsweise unnötig substituierten Patienten beinhalten dürften. Ihre Zuordnung und Untersuchung ist weiteren Studien vorbehalten.

6. Vergleich mit dem Schilling-Test

Der Schilling-Test wird vielfach als Referenzmethode zum Nachweis eines Vitamin B₁₂-Mangels verwendet. Auch wir haben ihn hierzu herangezogen, wenngleich andere Autoren ihm diese Bedeutung nicht zusprechen wollen (57, 58). Der Vergleich der Ergebnisse des Holo TC RIA mit denen des Schilling-Tests erfolgte für beide Geschlechter gemeinsam. Als Grenze zwischen normalen und pathologisch erniedrigten Werten wurden für die Konzentration von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ 20 pmol/l angesetzt, für den Schilling-Test eine Urin-Exkretion von 6 % der verabreichten Dosis.

Aufgrund von Abbildung 17 ist die Aussagekraft der Sensitivität mit 3/6 (50 %) und der Spezifität mit 8/8 (100 %) durch die geringe Fallzahl eingeschränkt. Trotz der zu erkennenden mäßigen Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen des Holo TC RIA und denen des Schilling-Tests bleibt dennoch folgendes zu beachten: Keiner der untersuchten Patienten wies bei erniedrigten Werten für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ im Schilling-Test normale Exkretionsraten auf.

Anders gesetzte Grenzen zwischen den als normal und als pathologisch betrachteten Werten sowie eine Auftrennung nach den Geschlechtern verändern diese Ergebnisse und sind in der Vierfeldertafel leicht zu überschauen.

7. Schlussfolgerung

Das an Transcobalamin II gebundene Vitamin B₁₂ scheint sich derzeit einen festen Platz in der Diagnostik des Vitamin B₁₂-Mangels zu erarbeiten. Selbst Autoren, die im Rahmen der Vitamin B₁₂-Diagnostik andere Parameter wie beispielsweise das Homocystein (Hcy) als die wichtigsten ansehen, relativieren deren Bedeutung zugunsten des holo-TC II unter der Voraussetzung, dass verlässliche Testsysteme für seine Messung existieren (18). Favorisierte „Gold-Standards“ zur Diagnose des Cobalaminmangels wie die Einbeziehung von klinischen Symptomen, Hcy- und Methylmalonsäure- (MMA-) Messwerten sowie der Befundbesserung nach Vitamin B₁₂-Substitution (32) erscheinen unbefriedigend. Mit dem hier untersuchten Holo TC RIA kann alternativ nun auf einen verlässlichen, präzisen und unkomplizierten Labortest zurückgegriffen werden. Inwieweit er die Vitamin B₁₂-Diagnostik sicherer und schneller zu machen vermag, wird sich künftig zeigen. Erste Studien sprechen dafür: So scheinen Sensitivität und Spezifität des TC II-gebundenen Vitamin B₁₂ in Bezug auf den Cobalaminmangel sehr gut zu sein (63, 70). Lloyd-Wright et al. (2003) empfehlen seine Bestimmung als Ersatz für die gleichzeitige Messung dreier Laborparameter (Gesamt-Vitamin B₁₂, Hcy, MMA) im Rahmen von Screening-Verfahren. Erst im Grenzbereich von 25 bis 50 pmol/l TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ sollen zur definitiven Einordnung weitere Untersuchungen wie zum Beispiel die Bestimmung von Gesamt-Vitamin B₁₂, Hcy oder MMA angeschlossen werden (79).

Einschränkungen ergeben sich bei Patienten mit Leber- und Nierenfunktionsstörungen sowie mit lymphoproliferativen Erkrankungen oder Störungen des retikulo-endothelialen Systems durch hohe holo-TC II-Konzentrationen. Hier sollte die Bestimmung von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ zumindest nicht als alleinige Stütze der Diagnose Vitamin B₁₂-Mangel verwendet werden (25, 27, 63, 70, 96). In solchen Fällen könnte jedoch die Messung von dann erhöhten Spiegeln an TC II in seiner Funktion als Akute-Phase-Protein erfolgen. Möglicherweise wird es als solches von der Leber ausgeschüttet, was dieses Bindungsprotein noch interessanter macht (88).

VII ZUSAMMENFASSUNG

Transcobalamin II (TC II) ist das entscheidende Vitamin B₁₂-Bindungsprotein, durch welches das in der Blutbahn zirkulierende Cobalamin erst biologisch verfügbar wird. Aus diesem Grund gewinnt TC II in der Vitamin B₁₂-Mangel-Diagnostik zunehmend an Bedeutung, zumal die seitherigen B₁₂-Bestimmungsmethoden Schwachstellen aufweisen und zu Fehldiagnosen führen können. Voraussetzung für seine Verwendung als diagnostischer Parameter ist jedoch ein geeigneter Labortest.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Test der Firma Axis Shield (Holo TC RIA) mit dem ADVIA Centaur Testkit für Vitamin B₁₂ (Bayer) sowie mit dem Urinexkretionstest nach Schilling verglichen. Alle Teste können in der Diagnostik des Vitamin B₁₂- Mangels eingesetzt werden. Der Holo TC RIA wird anhand seiner Testgüte sowie seiner Durchführbarkeit im Routine-Labor nach verschiedenen Kriterien beurteilt. Hierzu gehört auch die Ermittlung des Referenzbereichs für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂.

Verwendung fanden 119 Blutproben von Patienten der Tübinger Universitätsklinik sowie 112 Blutproben von Spendern der Tübinger Blutbank.

Mit Intra-Assay-Standardabweichungen von 3,28 pmol/l (Gefriertruhenlagerung), 5,31 pmol/l (Kühlraumlagerung) bzw. 4,67 pmol/l (Lagerung bei Raumtemperatur) und einer Inter-Assay-Standardabweichung von 3,13 pmol/l sowie einer Gesamt-Standardabweichung von 6 pmol/l wurden Präzisionsparameter gefunden, wie sie auch für andere klinisch-chemische Parameter akzeptiert werden. Eine ausreichende Präzision des Holo TC RIA ist somit gegeben.

Da der Test bislang nicht automatisiert ist, ist auf eine standardisierte Durchführung der Analysen zu achten. Neben dem Ablauf der Analysenserie haben auch Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur der Proben Auswirkungen auf die Messergebnisse. Diese spielen jedoch nur bei langen Lagerungszeiten, wie sie im Klinikalltag normalerweise nicht vorkommen, eine Rolle.

Das Referenzintervall für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ im Serum oder Plasma wurde auf drei verschiedenen Rechenwegen ermittelt. Es reicht für Männer von etwa 20 bis 90 pmol/l. Frauen haben im Durchschnitt um etwa 13 pmol/l niedrigere Konzentrationen an TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ als Männer.

Nach dem vorgenommenen Methodenvergleich des Holo TC RIA mit dem entsprechenden Test für das ADVIA Centaur-Gerät liegen etwa 20 bis 25 % des in der Blutbahn zirkulierenden Vitamin B₁₂ an TC II gebunden vor. Eine rechnerische Abschätzung des TC II-gebundenen Vitamin B₁₂ aus dem gesamten Vitamin B₁₂ mittels Umrechnungsfaktor ist allerdings nicht zu empfehlen, da keine lineare Beziehung zwischen den beiden Größen gefunden werden konnte. Eine direkte Bestimmung des TC II-gebundenen Vitamin B₁₂ ist somit angezeigt, um bessere therapeutische Konsequenzen ziehen zu können.

Beim Vergleich des Holo TC RIA mit dem Schilling-Test als Referenzmethode zeigte sich anhand von 14 Proben, dass bei Messwerten für TC II-gebundenes Vitamin B₁₂ im festgelegten Normbereich der Schilling-Test ebenfalls normal ausfiel (Spezifität 100 %). Die Sensitivität des Holo TC RIA war bei Bezug auf den Schilling-Test allerdings auf 50 % reduziert.

Insgesamt ist der neue Holo TC RIA ein geeigneter Labortest zur Bestimmung von TC II-gebundenem Vitamin B₁₂. Einschränkungen für seine Verwendung in der Vitamin B₁₂-Mangeldiagnostik sind bei verschiedenen Erkrankung wie Leber- und Nierenfunktionsstörungen sowie bei lymphoproliferativen Erkrankungen zu erwarten, da bei diesen Erkrankungen erhöhte Spiegel an TC II-gebundenem Vitamin B₁₂ beschrieben werden.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ADCOCK BB, MCKNIGHT JT (2002)
Cobalamin pseudodeficiency due to a transcobalamin I deficiency
South-Med-J. 95(9): 1060-2
- 2 AFMAN LA, VAN DER PUT NMJ, THOMAS CMG, TRIJBELS JMF (2001)
Reduced vitamin B12 binding by transcobalamin II increases the risk of
neural tube defects
QJM. 94(3): 159-66
- 3 ALLEN RH (1975)
Human vitamin B₁₂ transport proteins
Prog-Hematol. 9: 57-84
- 4 ALLEN RH (1976)
The plasma transport of vitamin B₁₂
Br-J-Haematol. 33(2): 161-71
- 5 ALLEN RH (1992)
Megaloblastic anemias
in: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC: Cecil textbook of medicine:
846-54
W.B. Saunders Co., 19th, Philadelphia
- 6 ALLEN RH, STABLER SP, SAVAGE DG, LINDENBAUM J (1990)
Diagnosis of cobalamin deficiency I: usefulness of serum methylmalonic
acid and total homocysteine concentrations
Am-J-Hematol. 34(2): 90-8
- 7 ALPERS DH, RUSSELL-JONES GJ (1999)
Intrinsic factor, haptocorrin, and their receptors
in: Banerjee R: Chemistry and biochemistry of B₁₂: 411-40
John Wiley & Sons, New York
- 8 ARLET JB, VARET B, BESSON C (2002)
Favorable long-term outcome of a patient with transcobalamin II
deficiency
Ann-Intern-Med. 137(8): 704-5
- 9 BABLOK W, PASSING H, BENDER R, SCHNEIDER B (1988)
A general regression procedure for method transformation
Application of linear regression procedures for method comparison
studies in clinical chemistry, part III
J-Clin-Chem-Clin-Biochem. 26(11): 783-90

- 10 BAIK HW, RUSSELL RM (1999)
Vitamin B₁₂ deficiency in the elderly
Annu-Rev-Nutr. 19: 357-77

- 11 BATTERSBY AR (1998)
B₁₂-biosynthesis in an aerobic organism: how the pathway was elucidated
in: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT: Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins: 47-61
Wiley-VCH, Weinheim

- 12 BATTERSBY AR, LEEPER FJ (1999)
Biosynthesis of B₁₂ in the aerobic organism *pseudomonas denitrificans*
in: Banerjee R: Chemistry and biochemistry of B₁₂: 507-35
John Wiley & Sons, New York

- 13 BENHAYOUN S, ADJALLA C, NICOLAS JP, GUÉANT JL, LAMBERT D (1993)
Method for the direct specific measurement of vitamin B₁₂ bound to transcobalamin II in plasma
Acta-Haematol. 89(4): 195-9

- 14 BENSON RE, RAPPAZZO ME, HALL CA (1972)
Late transport of vitamin B₁₂ by transcobalamin II
J-Lab-Clin-Med. 80(4): 488-95

- 15 BIRN H, WILLNOW TE, NIELSEN R, NORDEN AGW, BÖNSCH C, MOESTRUP SK, NEXØ E, CHRISTENSEN EI (2002)
Megalin is essential for renal proximal tubule reabsorption and accumulation of transcobalamin-B₁₂
Am-J-Physiol-Renal-Physiol. 282: F408-16

- 16 BOLANDER-GOUAILLE C (2001)
Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

- 17 BOLANDER-GOUAILLE C (2003)
Homocysteine, related vitamins and neuropsychiatric disorders
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York

- 18 BRIDDON A (2003)
Homocysteine in the context of cobalamin metabolism and deficiency states
Amino-Acids. 24(1-2): 1-12

- 19 BUNDESÄRZTEKAMMER (2001 UND 2002)
Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen
Dtsch-Arztebl. 98(42): A 2747-59 und
Dtsch-Arztebl. 99(17): A 1187

- 20 CAMPBELL AT (2003)
Comparison of serum and EDTA-plasma
Inhouse-Studie Axis-Shield, Oslo
- 21 CARMEL R (1985)
The distribution of endogenous cobalamin among cobalamin-binding
proteins in the blood in normal and abnormal states
Am-J-Clin-Nutr. 41(4): 713-9
- 22 CARMEL R (1988)
Pernicious anemia. The expected findings of very low serum cobalamin
levels, anemia, and macrocytosis are often lacking
Arch-Intern-Med. 148(8): 1712-4
- 23 CARMEL R (1988)
Plasma R binder deficiency
N-Engl-J-Med. 318(21): 1401-2
- 24 CARMEL R (1996)
Prevalence of undiagnosed pernicious anemia in the elderly
Arch-Intern-Med. 156(10): 1097-100
- 25 CARMEL R (2002)
Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holo-transcobalamin II)
Clin-Chem. 48(3): 407-9
- 26 CARMEL R, HERBERT V (1969)
Deficiency of vitamin B₁₂-binding alpha globulin in two brothers
Blood. 33(1): 1-12
- 27 CARMEL R, VASIREDDY H, AURANGZEB I, GEORGE K (2001)
High serum cobalamin levels in the clinical setting - clinical associations
and holo-transcobalamin changes
Clin-Lab-Haematol. 23(6): 365-71
- 28 CAVILL I (1997)
Diagnosis of cobalamin deficiency: the old and the new
Br-J-Haematol. 97(1): 238-9
- 29 CHANARIN I, METZ J (1997)
Diagnosis of cobalamin deficiency: the old and the new
Br-J-Haematol. 97(4): 695-700
- 30 CHANARIN I, METZ J (1998)
Diagnosis of cobalamin deficiency: a reply
Br-J-Haematol. 100(3): 617-8

- 31 CHU RC, HALL CA (1988)
The total serum homocysteine as an indicator of vitamin B₁₂ and folate status
Am-J-Clin-Pathol. 90(4): 446-9
- 32 CLARKE R, REFSUM H, BIRKS J, EVANS JG, JOHNSTON C, SHERLIKER P, UELAND PM, SCHNEEDE J, MCPARTLIN J, NEXØ E, SCOTT JM (2003)
Screening for vitamin B-12 and folate deficiency in older persons
Am-J-Clin Nutr. 77(5): 1241-7
- 33 COCHRAN WG (1963)
Sampling Techniques: 283
Wiley, 2nd, New York
- 34 CONSTANZI JJ, YOUNG BK, CARMEL R (1978)
Serum vitamin B₁₂ and B₁₂-binding protein levels associated with oral contraceptives
Tex-Rep-Biol-Med. 36: 69-77
- 35 DAS KC, MANUSSELIS C, HERBERT V (1991)
Determination of vitamin B₁₂ (cobalamin) in serum and erythrocytes by radioassay, and of holo-transcobalamin II (holo-TCII) and holo-haptocorrin (holo-TCI and III) in serum by adsorbing holo-TCII on microfine silica
J-Nutr-Biochem. 2: 455-63
- 36 DIEM K (1968)
Documenta Geigy Wissenschaftliche Tabellen: 283-4
J.R.Geigy AG, Pharma, 7. Auflage, Basel
- 37 DIN ISO 5725-1 (1997)
3. Begriffe
- 38 EISENWIENER HG, BABLOK W, BARDORFF W, BENDER R, MARKOWETZ D, PASSING H, SPAETHE R, SPECHT W, VÖLKERT E (1984)
Statistische Auswertung beim Methodenvergleich
Lab-Med. 8: 232-44
- 39 EISENWIENER HG, BABLOK W, BARDORFF W, BENDER R, MARKOWETZ D, PASSING H, SPAETHE R, SPECHT W (1983)
Präzisionsangaben beim Methodenvergleich
Lab-Med. 7: 273-81
- 40 ENGLAND JM, DOWN MC, WISE IJ, LINNELL JC (1976)
The transport of endogenous vitamin B₁₂ in normal human serum
Clin-Sci-Mol-Med. 51(1): 47-52

- 41 FEDOSOV SN, BERGLUND L, FEDOSOVA NU, NEXØ E, PETERSEN TE (2002)
Comparative analysis of cobalamin binding kinetics and ligand protection
for intrinsic factor, transcobalamin, and haptocorrin
J-Biol-Chem. 277(12): 9989-96
- 42 GIMSING P, NEXØ E (1989)
Cobalamin-binding capacity of haptocorrin and transcobalamin: age-
correlated reference intervals and values from patients
Clin-Chem. 35(7): 1447-51
- 43 GREEN PD, HALL CA (1980)
Biosynthesis of transcobalamin II
Methods-Enzymol. 67: 89-99
- 44 GREEN R (1996)
Screening for vitamin B₁₂ deficiency: caveat emptor
Ann-Intern-Med. 124(5): 509-11
- 45 GRIFFITH A (1991)
Diagnosis of cobalamin deficiency
Blood. 77: 1853-4
- 46 GÜMÜRDÜLÜ Y, SERIN E, ÖZER B, KAYASELÇUK F, KUL K, PATA C,
GÜÇLÜ M, GÜR G, BOYACIOĞLU S (2003)
Predictors of vitamin B-12 deficiency: age and helicobacter pylori load of
antral mucosa
Turk-J-Gastroenterol. 14(1): 44-9
- 47 HAECKEL R, BABLOK W, GOLDSCHMITT HMJ, MÜLLER HAG, MEYERS W,
STOCKMANN W, WEBER R (1995)
Recommendations for the biometrical evaluation of method comparison.
Results from patients' samples
Ann-Biol-Clin. 53(3): 155-6
- 48 HALL CA (1977)
The carriers of native vitamin B₁₂ in normal human serum
Clin-Sci-Mol-Med. 53(5): 453-7
- 49 HALL CA (1979)
The transport of vitamin B₁₂ from food to use within the cells
J-Lab-Clin-Med. 94(6): 811-6
- 50 HALL CA, CHU RC (1990)
Serum homocysteine in routine evaluation of potential vitamin B₁₂ and
folate deficiency
Eur-J-Haematol. 45(3): 143-9

- 51 HALL CA, FINKLER AE (1966)
Function of transcobalamin II: a B₁₂ binding protein in human plasma
Proc-Soc-Exp-Biol-Med. 123(1): 55-8
- 52 HALL CA, GREEN-COLLIGAN PD, BEGLEY J (1985)
The metabolism of cobalamin bound to transcobalamin II and to glycoproteins that bind cbl in HepG2 cells (human hepatoma)
J-Cell-Physiol. 124(3): 507-15
- 53 HALL CA, HITZIG WH, GREEN PD, BEGLEY JA (1979)
Transport of therapeutic cyanocobalamin in the congenital deficiency of transcobalamin II (TC II)
Blood. 53(2): 251-63
- 54 HALL,CA (1991)
Diagnosis of cobalamin deficiency
Blood. 77(1): 206-7
- 55 HANSEN M, BRYNSKOV J, CHRISTENSEN PA, KRINTEL JJ, GIMSING P (1985)
Cobalamin binding proteins (haptocorrin and transcobalamin) in human cerebrospinal fluid
Scand-J-Haematol. 34(3): 209-12
- 56 HANSEN M, NEXØ E (1992)
Cobalamin binding proteins in human seminal plasma
Scand-J-Clin-Lab-Invest. 52(7): 647-52
- 57 HEILMANN E, POBLOTZKI F (1976)
Vergleichende Untersuchungen zwischen Schilling-Test und Vitamin-B₁₂-Bestimmung im Serum
Inn-Med. 3: 336-9
- 58 HEINRICH HC (1979)
Aktuelle Aspekte und Fehlermöglichkeiten bei der Diagnostik des Vitamin B₁₂-Mangels
Dtsch-Med-Wochenschr. 104: 889
- 59 HERBERT V (1994)
Staging vitamin B-12 (cobalamin) status in vegetarians
Am-J-Clin-Nutr. 59(5 Suppl): 1213S-22S
- 60 HERBERT V, COLMAN N, PALAT D, MANUSSELIS C, DRIVAS G, BLOCK E, AKERKAR A, WEAVER D, FRENKEL E (1984)
Is there a "gold standard" for human serum vitamin B₁₂ assay?
J-Lab-Clin-Med. 104(5): 829-41

- 61 HERBERT V, FONG W, GULLE V, STOPLER T (1990)
Low holotranscobalamin II is the earliest serum marker for subnormal vitamin B₁₂ (cobalamin) absorption in patients with AIDS
Am-J-Hematol. 34(2): 132-9
- 62 HEROLD G (2002)
Innere Medizin 2002: 26-9
Gerd Herold, Köln
- 63 HERRMANN W, OBEID R, SCHORR H, GEISEL J (2003)
Functional vitamin B₁₂ deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk
Clin-Chem-Lab-Med. 41(11): 1478-88
- 64 HERRMANN W, SCHORR H, OBEID R, GEISEL J (2003)
Vitamin B-12 status, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians
Am-J-Clin Nutr. 78(1): 131-6
- 65 HERZLICH B, HERBERT V (1988)
Depletion of serum holotranscobalamin II. An early sign of negative vitamin B₁₂ balance
Lab-Invest. 58(3): 332-7
- 66 HJELT K, BRYNSKOV J, HIPPE E, LUNDSTRÖM P, MUNCK O (1985)
Oral contraceptives and the cobalamin (vitamin B₁₂) metabolism
Acta-Obstet-Gynecol-Scand. 64: 59-63
- 67 HODGKIN DC (1965)
The x-ray analysis of complicated molecules
Science. 150(699): 979-88
- 68 HOM BL (1967)
Plasma turnover of ⁵⁷Cobalt-vitamin B₁₂ bound to transcobalamin I and II
Scand-J-Haematol. 4(5): 321-32
- 69 HOM BL, OLESEN HA (1969)
Plasma clearance of ⁵⁷Cobalt-labelled vitamin B₁₂ bound in vitro and in vivo to transcobalamin I and II
Scand-J-Clin-Lab-Invest. 23(3): 201-11
- 70 HVAS AM, NEXØ E (2003)
Holotranscobalamin as a predictor of vitamin B₁₂ status
Clin-Chem-Lab-Med. 41(11): 1489-92

- 71 INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY (IFCC) (1983)
The theory of reference values
Part 5. Statistical treatment of collected reference values –
Determination of reference limits
J-Clin-Chem-Biochem. 21(11): 749-60
- 72 JACOB E, HERBERT V (1975)
Measurement of unsaturated "granulocyte-related" (TCI and TCIII) and
"liver-related" (TCII) B₁₂ binders by instant batch separation using a
microfine precipitate of silica (QUSO G32)
J-Lab-Clin-Med. 86: 505-12
- 73 KAIKOV Y, WADSWORTH LD, HALL CA, ROGERS PCJ (1991)
Transcobalamin II deficiency: case report and review of the literature
Eur-J-Pediatr. 150(12): 841-3
- 74 KOOLMAN J, RÖHM KH (1998)
Taschenatlas der Biochemie: 348-9
Georg Thieme Verlag, 2. Auflage, Stuttgart-New York
- 75 LINDEMANS J, SCHOESTER M, VAN KAPEL J (1983)
Application of a simple immunoabsorption assay for the measurement of
saturated and unsaturated transcobalamin II and R-binders
Clin-Chim-Acta. 132(1): 53-61
- 76 LINDENBAUM J, SAVAGE DG, STABLER SP, ALLEN RH (1990)
Diagnosis of cobalamin deficiency II: Relative sensitivities of serum
cobalamin, methylmalonic acid, and total homocysteine concentrations
Am-J-Hematol. 34(2): 99-107
- 77 LINDGREN A, BAGGE E, CEDERBLAD A, NILSSON O, PERSSON H,
KILANDER AF (1997)
Schilling and protein-bound cobalamin absorption tests are poor
instruments for diagnosing cobalamin malabsorption
J-Intern-Med. 241(6): 477-84
- 78 LINDGREN A, KILANDER A, BAGGE E, NEXØ E (1999)
Holotranscobalamin - a sensitive marker of cobalamin malabsorption
Eur-J-Clin-Invest. 29(4): 321-9
- 79 LLOYD-WRIGHT Z, HVAS AM, MØLLER J, SANDERS TAB, NEXØ E (2003)
Holotranscobalamin as an indicator of dietary vitamin B₁₂ deficiency
Clin-Chem. 49(12): 2076-8

- 80 LOIKAS S, LÖPPÖNEN M, SUOMINEN P, MØLLER J, IRJALA K, ISOAHO R, KIVELÄ SL, KOSKINEN P, PELLINIEMI TT (2003)
RIA for serum holo-transcobalamin: method evaluation in the clinical laboratory and reference interval
Clin-Chem. 49(3): 455-62
- 81 MATCHAR DB, MCCRORY DC, MILLINGTON DS, FEUSSNER JR (1994)
Performance of the serum cobalamin assay for diagnosis of cobalamin deficiency
Am-J-Med-Sci. 308(5): 276-83
- 82 MCCADDON A, HUDSON P, MCCRACKEN C, ELLIS R, MCCADDON A (2003)
Biological variation of holo-transcobalamin in elderly individuals
Clin-Chem. 49(9): 1542-4
- 83 MILLER A, SLINGERLAND DW, HALL CA, CHU RC (1998)
Food-bound B12 absorption and serum total homocysteine in patients with low serum B12 levels
Am-J-Hematol. 59(1): 42-5
- 84 MOESTRUP SK (1998)
Cellular surface receptors important for vitamin B₁₂ nutrition
in: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT: Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins: 477-89
Wiley-VCH, Weinheim
- 85 MORELLI TA, SAVAGE CR JR, BEGLEY JA, HALL CA (1977)
Radioimmunoassay for serum transcobalamin II
J-Lab-Clin-Med. 89(3): 645-52
- 86 MÜH U (1997)
Isolierung von Transcobalaminen im Serum und Referenzwertbestimmungen für Transcobalamin II, die R-Binder (Transcobalamine I und III) sowie Vitamin B₁₂ und Folsäure im Serum gesunder Blutspender
Med. Dissertation, Universität Tübingen
- 87 MÜNDLER M (1997)
Über Vitamin B₁₂, ungesättigte Vitamin-B₁₂-Bindungskapazität, Folsäure sowie Schilling-Test bei Patienten mit verschiedenen internistischen, neurologischen, ophthalmologischen und psychiatrischen Erkrankungen
Med. Dissertation, Universität Tübingen
- 88 NEALE G (1990)
B₁₂ binding proteins
Gut. 31(1): 59-63

- 89 NEXØ E (1998)
Cobalamin binding proteins
in: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT: Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins:
461-475
Wiley-VCH, Weinheim
- 90 NEXØ E, ANDERSEN J (1977)
Unsaturated and cobalamin saturated transcobalamin I and II in normal
human plasma
Scand-J-Clin-Lab-Invest. 37(8): 723-8
- 91 NEXØ E, CHRISTENSEN AL, HVAS AM, PETERSEN TE, FEDOSOV SN (2002)
Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B₁₂ deficiency
Clin-Chem. 48(3): 561-2
- 92 NEXØ E, CHRISTENSEN AL, PETERSEN TE, FEDOSOV SN (2000)
Measurement of transcobalamin by ELISA
Clin-Chem. 46(10): 1643-9
- 93 NEXØ E, HANSEN M, RASMUSSEN K, LINDGREN A, GRÄSBECK R (1994)
How to diagnose cobalamin deficiency
Scand-J-Clin-Lab-Invest-Suppl. 219: 61-76
- 94 NEXØ E, HVAS AM, BLEIE O, REFSUM H, FEDOSOV SN, VOLLSET SE,
SCHNEEDE J, NORDREHAUG JE, UELAND PM, NYGARD OK (2002)
Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin
homeostasis. A randomized placebo-controlled study
Clin-Chem. 48(10): 1768-71
- 95 NORMAN EJ (1998)
Urinary methylmalonic acid/creatinine ratio defines true tissue cobalamin
deficiency
Br-J-Haematol. 100(3): 614-5
- 96 OBEID R, SCHORR H, ECKERT R, HERRMANN W (2004)
Vitamin B₁₂ status in the elderly as judged by available biochemical
markers
Clin-Chem. 50(1): 238-41
- 97 PASSING H, BABLOK W (1983)
A new biometrical procedure for testing the equality of measurements
from two different analytical methods
Application of linear regression procedures for method comparison
studies in clinical chemistry, part I
J-Clin-Chem-Clin-Biochem. 21(11): 709-20

- 98 PASSING H, BABLOK W (1984)
Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes
Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, part II
J-Clin-Chem-Clin-Biochem. 22(6): 431-45
- 99 POULSEN OM (1997)
International union of pure and applied chemistry: Calculation and application of coverage intervals for biological reference values
Pure-Appl-Chem. 69(7): 1601-11
- 100 PSCHYREMBEL KLINISCHES WÖRTERBUCH (1998)
Walter de Gruyter, 258. Auflage, Berlin-New York
- 101 QIAN L, QUADROS EV, REGEC A, ZITTOUN J, ROTHENBERG SP (2002)
Congenital transcobalamin II deficiency due to errors in RNA editing
Blood-Cells-Mol-Dis. 28(2): 134-42
- 102 RICKES EL, BRINK NG, KONIUSZY FR, WOOD TR, FOLKERS K (1948)
Comparative data on vitamin B₁₂ from liver and from a new source: *Streptomyces griseus*
Science. 108: 634-5
- 103 ROSENBLATT DS, FENTON WA (1999)
Inborn errors of cobalamin metabolism
in: Banerjee R: Chemistry and biochemistry of B₁₂: 367-84
John Wiley & Sons, New York
- 104 ROTHENBERG SP, QUADROS EV, REGEC A (1999)
Transcobalamin II
in: Banerjee R: Chemistry and biochemistry of B₁₂: 441-73
John Wiley & Sons, New York
- 105 SAVAGE DG, LINDENBAUM J, STABLER SP, ALLEN RH (1994)
Sensitivity of serum methylmalonic acid and total homocysteine determinations for diagnosing cobalamin and folate deficiencies
Am-J-Med. 96(3): 239-46
- 106 SCALABRINO G, BUCCELLATO FR, TREDICI G (1998)
Methylmalonic acid as a marker for cobalamin deficiency: fact or fantasy? Elucidations from the cobalamin-deficient rat
Br-J-Haematol. 100(3): 615-6

- 107 SCHNEEDE J (2003)
Prerequisites for establishing general recommendations for diagnosis and treatment of vitamin B₁₂ deficiency and cost-utility evaluation of these guidelines
Scand-J-Clin-Lab-Invest. 63(5): 369-75
- 108 SCHNEIDER Z (1987)
Biosynthesis of vitamin B₁₂
in: Schneider Z, Stroiński A: Comprehensive B₁₂: 93-110
Walter de Gruyter, Berlin-New York
- 109 SCHNEIDER Z (1987)
Non-enzymatic vitamin B₁₂ binding proteins in man and animals
in: Schneider Z, Stroiński A: Comprehensive B₁₂: 267-333
Walter de Gruyter, Berlin-New York
- 110 SCOTT AI (1998)
How nature synthesizes B₁₂ without oxygen. Discoveries along the ancient, anaerobic pathway
in: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT: Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins: 81-100
Wiley-VCH, Weinheim
- 111 SCOTT AI, ROESSNER CA, SANTANDER PJ (1999)
B₁₂ biosynthesis: the anaerobic pathway
in: Banerjee R: Chemistry and biochemistry of B₁₂: 537-56
John Wiley & Sons, New York
- 112 SEETHARAM B, BOSE S, LI N (1999)
Cellular import of cobalamin (vitamin B-12)
J-Nutr. 129: 1761-4
- 113 SHOJANIA AM, WYLIE B (1979)
The effect of oral contraceptives on vitamin B₁₂ metabolism
Am-J-Obstet-Gynecol. 135: 129-34
- 114 SIGAL SH, HALL CA, ANTEL JP (1987)
Plasma R binder deficiency and neurologic disease
N-Engl-J-Med. 317(21): 1330-2
- 115 STABLER SP (1999)
B₁₂ and nutrition
in: Banerjee R: Chemistry and biochemistry of B₁₂: 344-65
John Wiley & Sons, New York
- 116 STABLER SP, ALLEN RH, SAVAGE DG, LINDENBAUM J (1990)
Clinical spectrum and diagnosis of cobalamin deficiency
Blood. 76(5): 871-81

- 117 STONE KL, BAUER DC, SELLMAYER D, CUMMINGS SR (2004)
Low serum vitamin B-12 levels are associated with increased hip bone loss in older women: a prospective study
J-Clin-Endocrinol-Metab. 89(3): 1217-21
- 118 SUMNER AE, CHIN MM, ABRAHM JL, BERRY GT, GRACELY EJ, ALLEN RH, STABLER SP (1996)
Elevated methylmalonic acid and total homocysteine levels show high prevalence of vitamin B₁₂ deficiency after gastric surgery
Ann-Intern-Med. 124(5): 469-76
- 119 THIBAUT D, BLANCHE F, CAMERON B, CROUZET J, DEBUSSCHE L, RÉMY E, VUILHORGNE M (1998)
Vitamin B₁₂ biosynthesis in *pseudomonas denitrificans*
in: Kräutler B, Arigoni D, Golding BT: Vitamin B₁₂ and B₁₂-proteins: 63-79
Wiley-VCH, Weinheim
- 120 ULLELAND M, EILERSTEN I, QUADROS EV, ROTHENBERG SP, FEDOSOV SN, SUNDREHAGEN E, ÖRNING L (2002)
Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum
Clin-Chem. 48(3): 526-32
- 121 VAN KAPEL J, WOUTERS NMH, LINDEMANS J (1988)
Application of heparin-conjugated sepharose for the measurement of cobalamin-saturated and unsaturated transcobalmin II
Clin-Chim-Acta. 172(2-3): 297-310
- 122 WICKRAMASINGHE SN, FIDA S (1993)
Correlations between holo-transcobalamin II, holo-haptocorrin, and total B₁₂ in serum samples from healthy subjects and patients
J-Clin-Pathol. 46(6): 537-9
- 123 WICKRAMASINGHE SN, RATNAYAKA ID (1996)
Limited value of serum holo-transcobalamin II measurements in the differential diagnosis of macrocytosis
J-Clin-Pathol. 49(9): 755-8

IX DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Richard Wahl danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die ausgesprochen freundliche und kompetente Betreuung bei der Planung und Ausarbeitung dieser Arbeit, die ich jederzeit in Anspruch nehmen konnte.

Frau Inge Benz gilt mein besonderer Dank für ihre große Unterstützung bei der Organisation und Durchführung der Arbeit im Isotopenlabor.

Herrn Dr. rer. pol. Reinhard Vonthein danke ich für sein unermüdliches Engagement bei der statistischen Auswertung und Interpretation der Laborergebnisse, durch das die ausgefeilten Überlegungen und Berechnungen möglich wurden.

Den Damen im RIA-Labor sowie den Zivildienstleistenden des Isotopenlabors danke ich für ihre Dienste, die mir viel Mühe erspart haben.

Besonders zu danken habe ich außerdem meiner Tanja für ihre Unterstützung und Motivierung in jeder Form, für ihre Ratschläge bei der Arbeit am Rechner und für's Korrekturlesen.

Meinen Eltern schulde ich ebenfalls großen Dank. Durch sie wurde mein Studium und damit diese Arbeit erst möglich.

X LEBENS LAUF

Robert Schrempf	<u>Persönliche Daten</u>
10. Juni 1976	Name
Crailsheim	Geburtsdatum
ledig	Geburtsort
deutsch	Familienstand
	Staatsangehörigkeit
	<u>Schulbildung</u>
1982 – März 1986	Georg-Mangold-Schule, Bischofsheim (Hessen)
März 1986 – Juli 1986	Hofherrnschule, Aalen / Württ.
1986 - 1995	Schubart-Gymnasium Aalen
Juni 1995	Allgemeine Hochschulreife
	<u>Zivildienst</u>
Juli 1995 – Juli 1996	Lebenshilfe für Menschen mit geistiger Behinderung, Aalen
	<u>Hochschulausbildung</u>
von WS 96/97 bis WS 98/99	Studium Zahnmedizin, Universität Ulm
Oktober 1997	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
März 1999	Zahnärztliche Vorprüfung
SS 99 bis WS 03/04	Studium Medizin, Universität Tübingen
August 1999	Ärztliche Vorprüfung
WS 99/00	Wiederaufnahme Studium Zahnmedizin, Universität Tübingen
April 2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
28. Mai 2002	Zahnärztliche Prüfung
Juni 2002	Approbation als Zahnarzt
März 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2003 bis März 2004	Praktisches Jahr, Marienhospital Stuttgart
12. Mai 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung