

18.1.2019

Rapport fra DSKB's arbejdsgruppe

B12-relaterede analyser

Anders Berg Wulff¹, Anne Winther Larsen², Ebba Nexø (formand),³ Fie Juhl Vojdeman^{1,4}, Lene Rosenberg⁵ og Morten Mørk⁶.

¹ Herlev og Gentofte Hospital, anders.berg.wulff.01@regionh.dk (tlf. 3868 9409), ²Aarhus Universitetshospital, anlarsen@rm.dk (tlf. 4097 6516), ³Aarhus Universitetshospital, e.nexo@dadlnet.dk (tlf.:5149 0607), ⁴ Bispebjerg Frederiksberg Hospital, fi.juhl.voideman.01@regionh.dk, ⁵ Odense Universitetshospital, Lene.Rosenberg2@rsyd.dk (tlf. 21705415), ⁶Aalborg Universitetshospital, morten.moerk@rn.dk (tlf. 9766 4920).

Anvendte forkortelser

B12: Cobalamin; Hcy: Homocystein; HoloTC: Cobalamin bundet til transcobalamin, aktiv B12; MMA: methylmalonsyre; Ho: Region Hovedstaden; Mi: Region Midt; No: Region Nord; Sj: Region Sjælland; Sy: Region Syd.

Sammenfatning og anbefalinger

Internationalt anvendes B12, MMA, Hcy og holoTC og det afledte indeks cB12 til diagnostik af B12-mangel. Analyser til udredning af årsagen til B12-mangel er få og omfatter først og fremmest autoantistoffer mod intrinsic faktor og parietalceller.

- Diagnostisk anvendes i Danmark stort set kun B12 og MMA. Anvendelse af Hcy synes ikke alene at være relateret til B12-diagnostik og holoTC anvendes stort set ikke. Kun B12 og MMA er dækket i det følgende.
HoloTC anses internationalt for at være en bedre biomarkør end B12, og der bør overvejes forsøg med indførelse af denne parameter.
- Min-max per 1000 indbyggere i 2017 viser store udsving mellem regionerne, både i antal udførte analyser for B12 (170-318), og for MMA (8-22) og i antal patienter med patologiske værdier.
Der er behov for udarbejdelse af kliniske retningslinjer, så ensartet brug af analyserne kan sikres på tværs af landet.
- Analyserne rekvireres overvejende fra primærsektoren.
Det vil være vigtigt at inddrage primærsektoren i udarbejdelse af kliniske retningslinjer.
- Fordeling af analyser på køn og alder viser ingen væsentlige kønsforskelle, men der ses høje B12-værdier for børn i alderen 2-10 år, samt høje værdier for MMA navnlig i gruppen +60 år. Der er mindre forskelle i referenceintervaller mellem regionerne.
Referenceintervaller bør ensrettes på tværs af regioner. Børnereferenceintervaller for B12 bør indføres i alle regioner. Referenceinterval for MMA bør vurderes for + 60 år.
- B12 diagnostik med automatisk udførelse af MMA for B12-værdier i intervallet 125-250 pmol/L udføres alene i Region Midt. Brug af 2cB12, der udregnes ud fra B12, MMA og alder, har endnu ikke vundet udbredelse i klinikken.
Kliniske retningslinjer bør forholde sig til brug af B12 diagnostik/2cB12.
- Analyser til udredning af årsagen til vitamin B12-mangel (autoantistoffer og B12-absorptionstesten CobaSorb) anvendes i yderst begrænset omfang.
Kliniske retningslinjer bør forholde sig til udredning af årsager til B12-mangel.
- Omkring 25 % af de udførte B12-analyser er gentagne analyser på samme patient inden for året 2017.
Kliniske retningslinjer bør forholde sig til brug af gentagne analyser, herunder specielt brug af analyser i forbindelse med behandlingsopfølgning.
- Laboratoriernes vejledninger til rekvirenter varierer både mellem og indenfor de enkelte regioner.
Når kliniske retningslinjer foreligger, vil der være behov for ensretning af disse informationer.

Baggrund og rapportens omfang

DSKB nedsatte i foråret 2018 en arbejdsgruppe bestående af Ebba Nexø (formand) og en yngre læge fra hver af de fem regioner: Ho: Fie Juhl Vojdeman, Mi: Anne Winther Larsen, Sy: Lene Rosenberg, Sj: Anders Berg Wulff og No: Morten Mørk. De yngre læger blev udpeget efter indstilling fra YLKB (Yngre læger i klinisk biokemi).

Arbejdsgruppen blev bedt om at skabe en oversigt over analyser (art og antal), analysepakker og lokale vejledninger udbudt i de enkelte regioner. Arbejdet skal kunne danne grundlag for, at DSKB i samarbejde med andre kliniske selskaber kan udarbejde retningslinjer for diagnostik og opfølgning af patienter mistænkt for B12-relaterede sygdomme.

Rapporten gennemgår brug af B12-relaterede analyser i Danmark i årene 2015-2017 og præsenterer detaljerede resultater for første analyse udført på den enkelte patient i år 2017.

Kort introduktion til B12-relaterede laboratorieanalyser.

Vitamin B12 (B12) blev oprenset i 1948 efter at være opdaget som det vitamin, der kan helbrede pernicious anæmi, en autoimmun sygdom hvor produktionen af intrinsic faktor i ventriklen hæmmes. Intrinsic faktor er nødvendig for optagelse af B12 (1).

Blandt de tidligste analytiske værktøjer var den i dag obsolete Schillings test (2), der undersøgte patientens evne til at optage vitaminet. Også analyse af **autoantistoffer mod intrinsic faktor** eller **parietalcellerne** så tidligt dagens lys (1). Analyserne kan i dag udføres på automatiseret udstyr.

De første analyser for **B12** i plasma dukkede op i 1950'erne og var baseret på bakterievækst (3). I løbet af de følgende årtier fulgte in-house proteinbindingsanalyser, der målte summen af B12 og inaktive former af vitaminet (4,5). De blev afløst af in-house-analyser specifikke for B12 (6), som blev anvendt indtil automatiserede analyser i midt halvfemserne tog over (7).

I halvfemserne blev analyse af de to metabolitter, der ophobes ved B12-mangel introduceret. Methylmalonsyre (**MMA**) analyseres med MS-baserede metoder (8). Homocystein (**Hcy**) analyseres med MS / HPLC eller automatiserede immunologiske metoder (9).

I nulletten blev en ELISA til analyse af den del af B12, der kan komme ind i cellerne, **holoTC** (aktivt B12), introduceret. Den diagnostiske sensitivitet blev vurderet at være bedre end for B12 (10). Også denne analyse er i dag automatiseret. Tabel 1 giver en summarisk oversigt over de B12-relaterede analyser, B12, holoTC, MMA og Hcy, herunder deres diagnostiske sensitivitet og specificitet overfor 4cB12 som guldstandard (se næste afsnit).

Metoder til bedre udnyttelse af to eller flere af de nævnte analyser er udviklet i form af en **diagnostisk strategi** med brug af B12 og MMA (11,12). Strategien indebærer at meget lave B12 værdier (< 125 pmol/L) understøtter B12 mangel. Patienter med B12 værdier i gråzoneområdet (125-250 pmol/L) anbefales undersøgt for MMA. En høj MMA (>0,75 µmol/L) understøtter B12-mangel, medens patienter med MMA-værdier i gråzoneområdet anbefales genundersøgt efter 1 år. Ved resultatvurderingen er det vigtigt at være opmærksom på, at MMA øges ved nedsat nyrefunktion. Kombineret brug af flere analyser er forsøgt med brug af et indeks, (**cB12**), der kan udregnes på basis af to, tre eller fire målte parametre, og som også inddrager patientens alder.

Klassificering af patienterne på baggrund af 4cB12 (B12, holoTC, MMA og Hcy) anses i dag af førende internationale eksperter for den sikreste diagnostik, der kan tilbydes fra laboratoriets side (1, 13). Den udbydes

fra et laboratorium i England under navnet Fedosov Factor (<https://nutris.viopath.co.uk>), men endnu mangler mere omfattende erfaring med rutine brug. 4cB12 er selvsagt en "laboratoriediagnose", men der findes i dag ikke nogen bedre "guldstandard" for diagnosen B12-mangel. 4cB12 er derfor anvendt som "sandheden" ved udregning af tal for den diagnostiske sensitivitet og specificitet i tabel 1.

Tabel 1.

Karakteristik af analyser anvendt til diagnostik af vitamin B12-mangel.

Analyse	Metoder	Pris	Cut-off grænser	Diagnostisk sensitivitet*	Diagnostisk specificitet*
B12 pmol/L	Diverse platforme	Lav	<125	80	97
			<200	97	77
HoloTC pmol/L	Diverse platforme	Middel	<25	93	94
			<40	99	76
MMA µmol/L	Massespektrometri (MS)	Høj	>0,75	86	98
			>0,40	96	90
Hcy µmol/L	Diverse platforme	Høj/middel	>20	88	96
			>15	97	87
			>12	99	74

*Beregning er baseret på klassificering af patienter med 4cB12 og cut-off -1.5 (13), og angiver værdier, hvis den anførte analyse var anvendt som den eneste. Beregninger er foretaget af Sergey S Fedosov og er baseret på tal fra (13), n=5.498.

Som erstatning for den obsolete Schillings test blev **CobaSorb** udviklet i nullerne. Den er baseret på måling af holoTC før og efter indtag af vitamin B12 (15).

Udover de nævnte analyser er der over årene udviklet en række forskningsanalyser, der også kan anvendes til udredning af patienter med sjældne B12-relaterede sygdomme. Disse analyser omfatter først og fremmest **måling af de B12-bindende proteiner i plasma** (15, 16).

Fra laboratoriets side er målet at kunne udbyde de analyser, der "cost-effectivt" kan finde alle, der har behandlingskrævende B12-mangel, kan fastslå om disse patienter skal have livslang farmakologisk behandling og som kan følge behandlingsresponsen.

Metoder

Arbejdsgruppen har holdt tre møder, det første den 9.5.2018 og det sidste 4.12.2018. Arbejdsgruppen har supplerende arbejdet via mail.

Arbejdet bygger på dataindsamling fra de enkelte regioner. Fokus er de hyppigst anvendte analyser, B12, MMA og Hcy, men også mere sjældent anvendte analyser, holoTC, CobaSorb, B12-bindende proteiner og autoantistoffer er inddraget.

De overordnede tal for 2015-2017 er hentet fra laboratoriernes analysestatistikker og laboratoriedatasystemer

og omfatter totalt antal rekvirerede analyser.

Indbyggertal er hentet fra Danmarks Statistik (www.statistikbanken.dk/statbank5a/default.asp?w=1920).

Detaljeret dataindsamling fra Ho, Mi, Sy og No for B12, MMA og Hcy for året 2017 er gennemført via anonymiserede udtræk fra laboratoriedatasystemer. For Sj har sådanne data ikke været tilgængelige. For en række af talbehandlinger er der alene anvendt første udførte analyse på den enkelte patient i 2017.

Kommenterede resultater

Information til brugerne og referenceintervaller

Information til brugerne viser i varierende grad intra- og interregionale forskelle. Arbejdsgruppen finder det hensigtsmæssigt, at evt. tilpasning udskydes til der i samspil med andre kliniske selskaber er udarbejdet kliniske retningslinjer.

Referenceintervaller og beslutningsgrænser for B12, MMA og Hcy viser mindre forskelle (tabel 2). Det skønnes, at referenceintervallerne med de nedenfor anførte forbehold umiddelbart kan samordnes. Beslutningsgrænser, der i de enkelte regioner vil medføre råd om yderligere analyser, skønnes ikke at kunne ensrettes. Det vil kræve kliniske retningslinjer samt en lokal "cost-effectiveness" overvejelse.

Rekvirerede analyser for B12, MMA og Hcy

Antal analyser udført i de enkelte regioner i årene 2015-2017 er vist i tabel 3 og figur 1. Alene Region Mi har rekvisitionen "B12 diagnostik", der indebærer at MMA automatisk udføres for værdier af B12, som ligger i intervallet 125-250 pmol/L. Denne rekvisitionsform tegner sig for ca. halvdelen af de udførte B12-analyser i regionen.

B12 rekvireres i 2017 i gennemsnit (min-max for regioner) 218 (170-318) pr. 1000 indbyggere. Tilsvarende tal for MMA er 14 (8-22) og for Hcy 4 (2-6). Rekvisitioner for B12 viser svagt stigende tendens, for MMA både stigende og faldende tendens, medens Hcy viser faldende tendens for perioden 2015-17. Gentagne analyser på samme patient udgør ca. 25 % for B12 og ca. 15 % for MMA.

Tabel 2.

Referenceintervaller og (gråzone interval) for de hyppigste B12-relaterede analyser i danske regioner.

Region	B12 pmol/L	MMA-µmol/L	Bemærkninger
Ho	>200 (140-200)	<0.28	
Mi	200-600 (125-250)	<0.29 (0.29-0.75)	B12 diagnostik: MMA måles hvis 125<B12<250 pmol/L
Sy	130-700	<0,29	MMA udføres efter rekvisition alene hvis B12 har ligget mellem 125 og 250 pmol/L indenfor de sidste 3 måneder
Sj	150-800* (125-220)	<0,29 (0,29-0,75)	
No	200-600 (125-250)	<0.29 (0,29-0,75)	
Bemærkninger	Højere værdier hos 2-10 årige**	Behov for alders justering?	

*Børn og unge op til 19 år har andre selvstændige referenceintervaller.

**Se ref. (17)

Tabel 3.

Rekvisition og analyse af B12, MMA og Hcy i årene 2015-2017 i danske regioner.

Tal for rekvisitioner er angivet pr. 1000 indbyggere.

	Rekvisitioner	Ho	Mi	Sy	Sj	No	Total
B12	2015	100*	163	200	247	276	178
	2016	186	169	212	274	306	214
	2017	182	170	226	283	318	218
	Gent. %**	27	24		-	29	
MMA	2015	7	27	5***	12	16	13
	2016	9	26	6***	14	19	15
	2017	8	22	5***	14	20	14
	Gent. %*	15	12			18	
Hcy	2015	5	9	2	9	3	6
	2016	4	7	2	8	3	5
	2017	2	6	2	6	3	4
	Gent. %*	31	14		-	7	
Indb. (2017), mio		1,81	1,31	1,22	1,22	0,59	5,76

* Rekvisitionstal omfatter ikke analyser udført på de praktiserende lægers laboratorium (KPLL). Disse analyser blev overtaget af regionen i 2016.

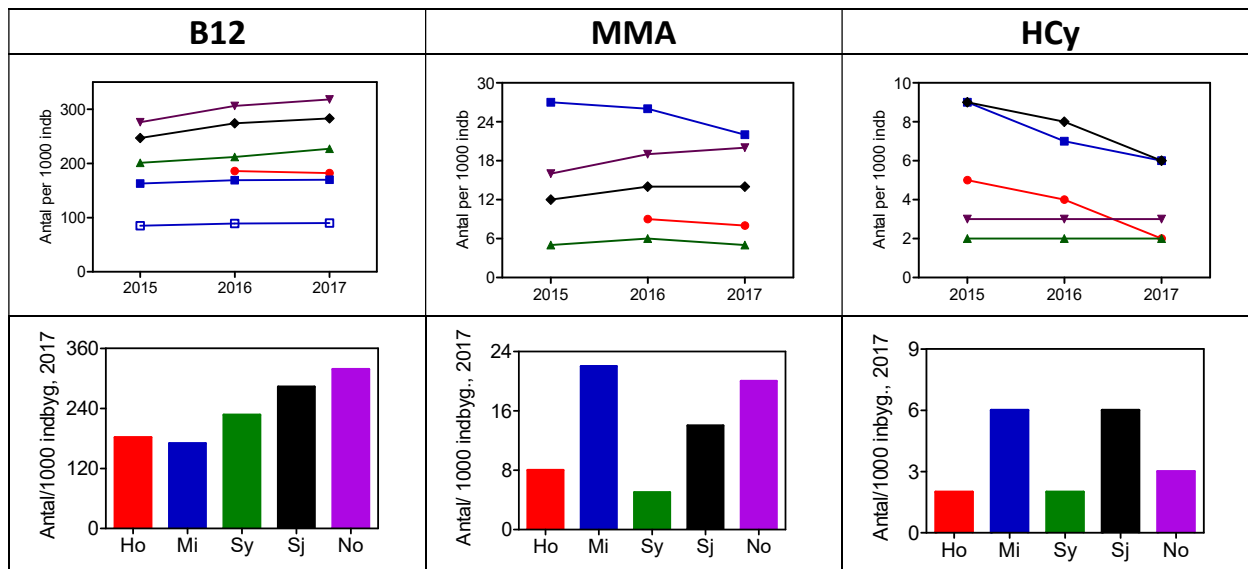
** Angiver % af analyser, der stammer fra gentagne analyser udført på samme patient.

***Angiver antal, som er bestilt. Analysen udføres dog alene for B12-værdier i gråzoneområdet (125-250 pmol/L) målt indenfor de sidste 3 måneder.

Figur 1.

Antal rekvisitioner for B12, MMA og Hcy i årene 2015-2017 fordelt på danske regioner.

Tallene er angivet som rekvisitioner pr. 1000 indbyggere i regionen. Regionerne er benævnt med: Ho: Hovedstaden, Mi: Midt, Sy: Syd, Sj: Sjælland, No: Nord. For Mi er anført både totalt antal rekvirerede B12-analyser og den delmængde, der er rekvireret som B12 diagnostik (B12 diag). Øverst udviklingen over tid. Nederst rekvisitioner for 2017. For Sy er ikke alle rekvirerede analyser for MMA udført, se tabel 3.



B12 og MMA. Første analyse udført på patienten i 2017.

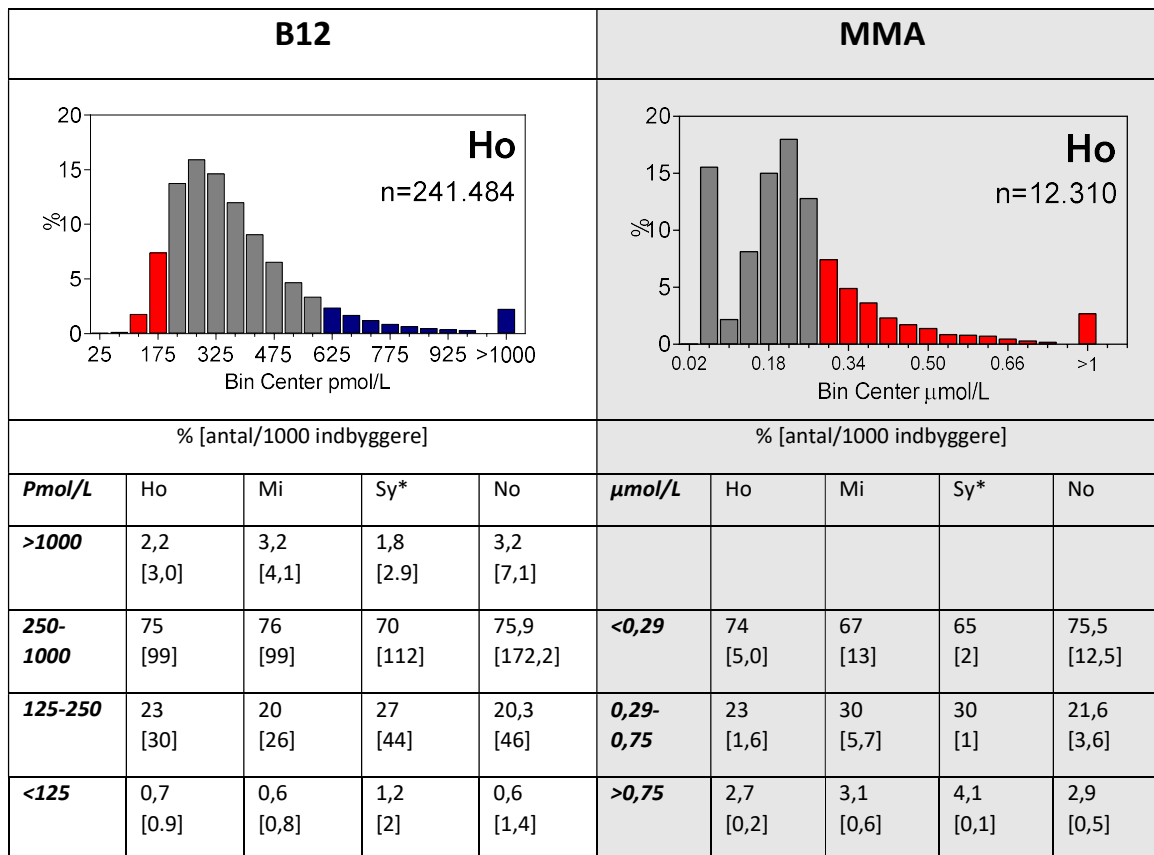
De efterfølgende figurer viser resultater for analyser renset for gentagne analyser på samme patient i 2017 for regionerne Ho, Mi, Sy og No. Alene resultater for B12 og MMA præsenteres, da den indledende gennemgang af resultaterne viser, at Hcy anvendes langt sjældnere end de to øvrige og med markant flere rekvisitioner fra hospitalssektoren. Det blev derfor konkluderet, at Hcy ikke alene anvendes til diagnostik af B12-mangel. Fordelinger af B12 og MMA viser ikke større variationer for de enkelte dataanalyser på tværs af regioner. Der vises derfor kun grafer for en enkelt region. Grafer for alle analyserede regioner kan ses i det supplerende materiale.

Figur 2 og supplerende data til figur 2 viser fordeling af de opnåede resultater. Den understående tabel viser tal for de fire regioner. Der er forskel i antal personer pr. 1000 indbyggere, der kan klassificeres som havende B12-mangel (B12<125 pmol/L og/eller MMA>0.75 µmol/L). Da dette antal med rimelighed kan antages at være det samme på tværs af regioner, sætter fundet spørgsmålstejn ved gældende rekvisitionspraksis/tolkning af data.

Figur 3 viser distribution af værdier fordelt på alder, figur 4 fordelt på køn og figur 5 fordelt på rekvirenter. Der ses ikke for nogen af analyserne større kønsvariation eller større forskel i værdier for prøver rekvireret fra praksis og hospital.

Figur 2.

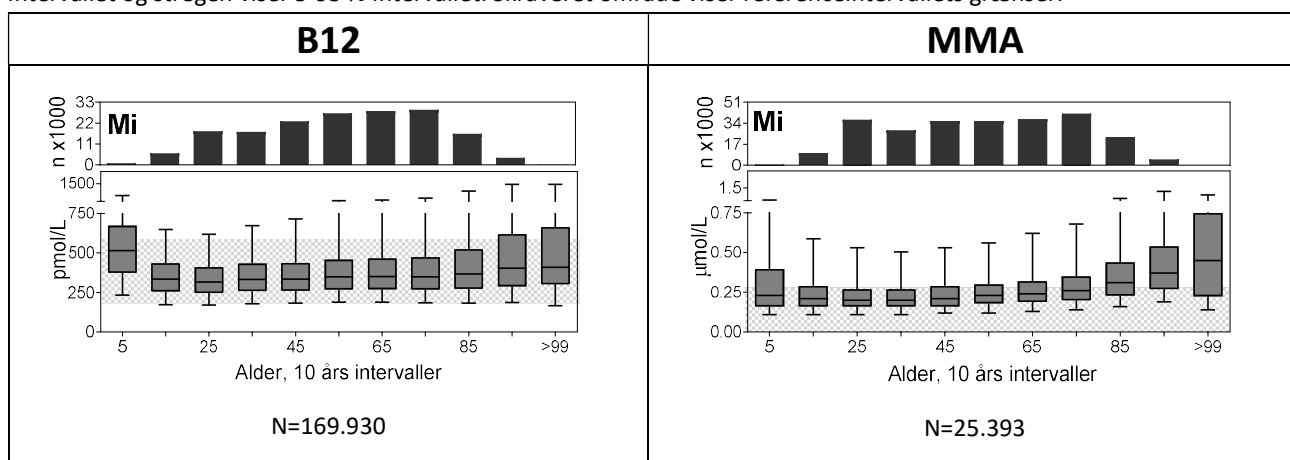
Resultater for først udførte analyse for B12 og MMA i 2017 for Ho og fordeling af værdier for Ho, Mi, Sy, No.



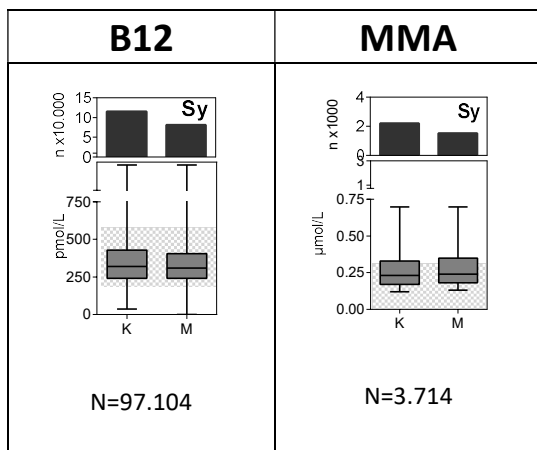
Figur 3.

Fordeling af opnåede resultater som funktion af alder for Mi.

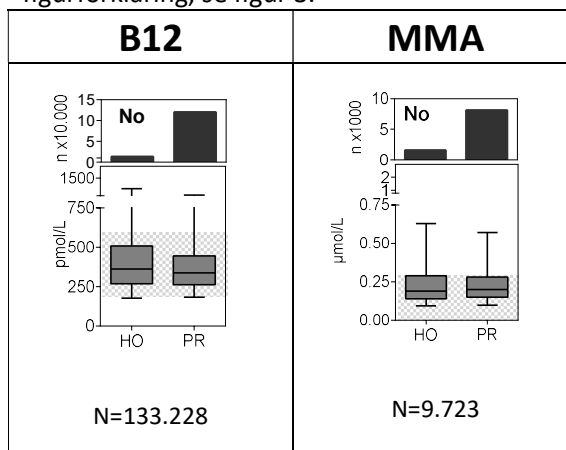
Øverste figur viser antal rekvisitioner og nederste de opnåede resultater. På nederste figur viser boksen 25-75 % intervallet og strengen viser 5-95 % intervallet. Skraveret område viser referenceintervallets grænser.



Figur 4.
Kønsfordeling af opnåede resultater, Sy.
 For figurforklaring se tekst til figur 3.



Figur 5.
Analyser fordelt på rekviert, No.
 HO: hospital, PR: primær sektor. For figurforklaring, se figur 3.



B12-analysen rekvireres helt overvejende fra primærsektoren, udføres hyppigere på kvinder end på mænd og hyppigst på personer i 60-70 årsalderen.

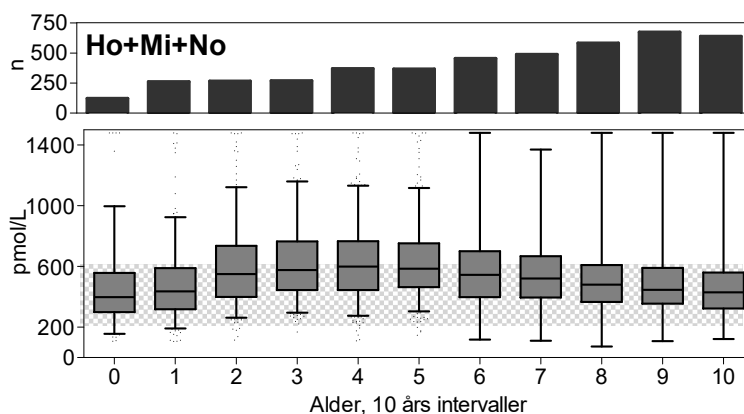
Der ses relativt høje værdier for gruppen 0-10 år i overensstemmelse med publicerede værdier for CALIPER børnerferenceintervallet (17) (som anbefales anvendt af arbejdsgruppe under DSKB og på Sundhed.dk). Desuden ses en større spredning i værdier med stigende alder. Der ses ikke markante ændringer i middelværdi eller i nederste 5 % grænse som funktion af alder. Den gældende opfattelse, at B12-mangel ses hos op til 20 % af +60-årige (1) finder vi ikke bekræftet i vores data for B12. Dette til trods for at data stammer fra personer, hvor det antageligt er størstedelen, som er mistænkt for B12-mangel, hvorfor der forventeligt ville have været >20 % med nedsat B12 blandt de +60-årige.

Resultaterne for børn er yderligere opdelt i figur 6. Beregnet på værdier for Ho, Mi og No er 5-95 [10-90] percentilerne 260-1000 [310-860] pmol/L (n=3.467). Referenceinterval på Sundhed.dk er opgivet iht. ref (17) som 1-10 år: 209-1000 pmol/L.

Figur 6.

Resultat- og aldersfordeling for B12 for børn 0-11 år.

Baseret på først udførte analyse i 2017 for Ho, Mi og No (0-10 år for No).



MMA-analysen viser samme rekvisitions- og kønsvariation som B12. Også her ses spredning af værdier at stige med alderen. Med alderen ses op til 25 % af værdierne at ligge over den i dag anvendte referencegrænse, både for en region med højt analysetal (Mi) og en region med lavt analysetal (Ho). Resultatet kan være drevet af patienter med nedsat nyrefunktion (medfører øget MMA) og af en langt snævrere indikation for MMA end for B12. Dette bør nærmere udredes, og der skønnes at være behov for at få verificeret referenceintervallet og dets mulige aldersafhængighed.

B12-diagnostik. Fordeling af resultater for B12-diagnostik i Mi fremgår af figur 7 og supplerende tabel S1. Korrelation mellem B12 og MMA er vist i supplerende figur S1-A. Det ses, at langt hovedparten af patienter med $MMA > 0.75 \mu\text{mol/L}$ har B12-værdier $< 250 \text{ pmol/L}$. Supplerende tabel S2 viser konsekvenserne for Ho ved indførelse af B12 diagnostik efter de samme retningslinjer som i Mi.

2cB12_{B12/MMA}. Indekset inddrager udover B12 og MMA også patientens alder. Indekset er udregnet som beskrevet i reference (13) på B12 diagnostik resultater fra Mi. Resultater er vist i figur 7 og supplerende tabel S3. Sammenlignet med klassificering af B12-mangel på baggrund af B12- og MMA-værdier viser 2cB12 flere patienter med svær ($2cB12 \leq -1,5$) til moderat ($2cB12 -1,49 - -1,0$) B12-mangel i gruppen med B12-værdier på 125-225 pmol/L, men finder færre patienter i disse to grupper hos patienter med B12 $> 225 \text{ pmol/L}$. Færre patienter ender i gråzoneområdet med mulig negativ B12-status ($2cB12 - 0,99 - -0,5$) og flere patienter klassificeres som havende en normal B12-status ($2cB12 > -0,5$). I gruppen med B12 på 250-600 findes ingen patienter med $2cB12 < -1,0$.

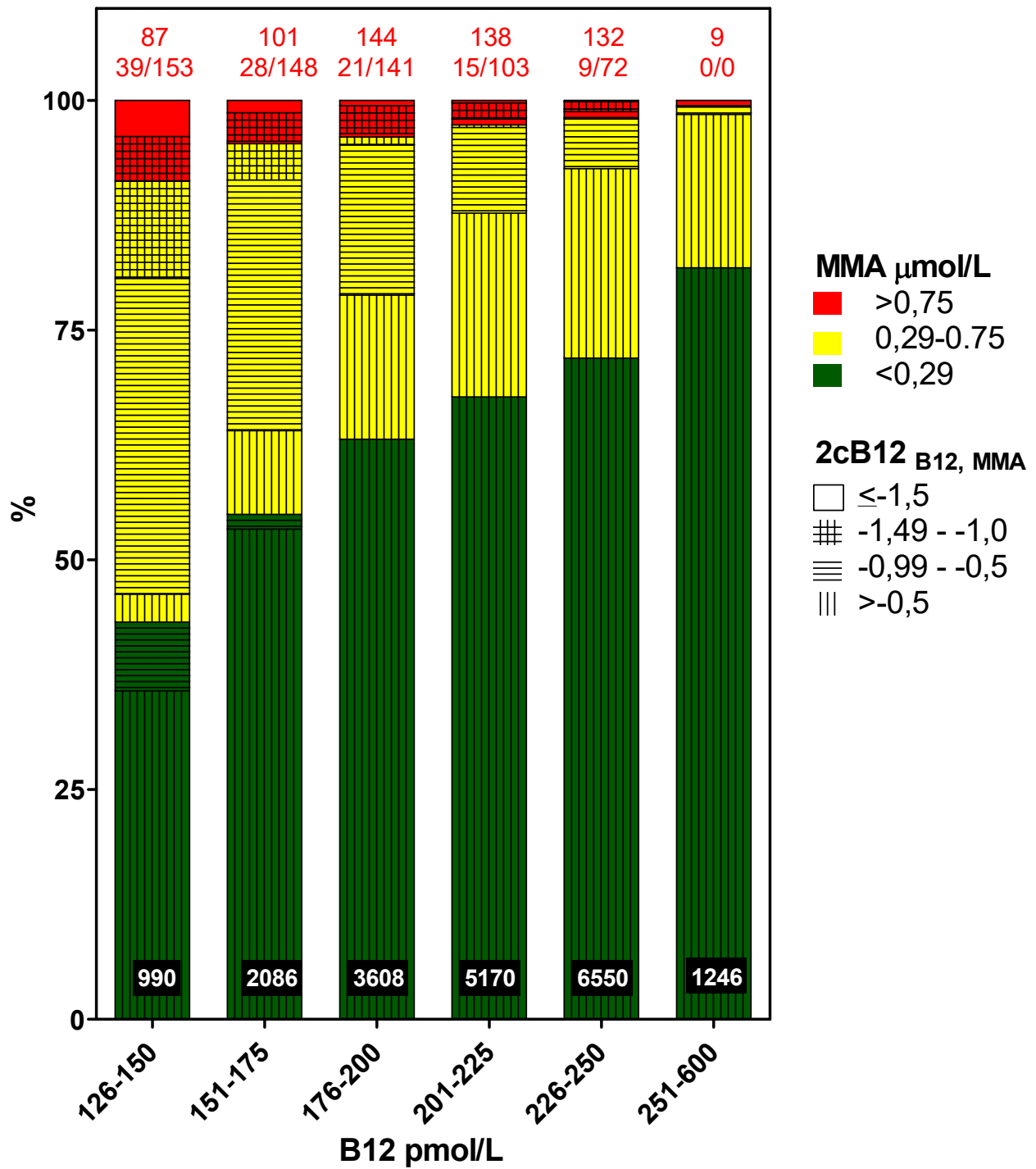
Supplerende figur S1-B og S1- C viser sammenhæng mellem B12 og 2cB12 samt MMA og 2cB12.

Figur 7.

B12 diagnostik og 2cB12_{B12/MMA}

Figuren viser fordeling af plasma-MMA og 2cB12 for forskellige værdier af B12 i intervallet mellem 125-600 pmol/L for førstegangsrekvisition af B12-diagnostik/samtidig B12 og MMA i Mi, 2017.

Røde tal over figuren angiver i øverste række antal patienter med MMA > 0.75 µmol/L og i nederste række antal patienter med 2cB12 ≤ -1,5/-1,49- -1,0 (regnes som svær/moderat B12-mangel). 2cB12 -0.99- -0,5 regnes som let B12-mangel, medens værdier > -0,5 forbindes med normal B12-status (13). Tal med hvidt angiver det totale antal analyserede prøver indenfor de forskellige intervaller for B12. For øvrig forklaring henvises til tabel S1.



De sjældent udførte analyser

Tal for rekvisition af de mindre anvendte B12-relaterede analyser er samlet i tabel 4. De relaterer sig alle til nærmere udredning af patienter med diagnosticeret B12-mangel/uafklaret diagnose. En del af analyserne udføres alene ved Aarhus Universitetshospital, der af Sundhedsstyrelsen er tildelt højt specialiseret funktion indenfor B12-området.

Tabel 4.

Rekvisition af sjældne B12-relaterede analyser.

Absolutte tal for rekvisitioner er anført.

	2015	2016	2017	Analyssteder*
Anti parietal celler	-	-	1053	Ho, Mi, Sy, No
Anti intrinsic faktor	-	-	1309	Ho, Mi, Sy, No
B12-bindende proteiner (apoTC og apoHC)	186	204	150	Mi
CobaSorb	95	76	59	Mi

-Analysetal kan ikke oplyses

*Autoantistoffer udføres enten på klinisk biokemisk eller klinisk immunologisk afdeling.

Afsluttende bemærkninger

Nærværende rapport kan først og fremmest tjene som baggrund for udarbejdelse af kliniske retningslinjer for B12-området i et samarbejde mellem DSKB og relevante andre kliniske selskaber. Når sådanne retningslinjer foreligger, vil der være behov for ensretninger af udbud og tolkning af de relevante analyser indenfor B12-området på tværs af regioner.

Parallelt med dette arbejde er der behov for projekter, der kan undersøge værdien af indførelse af nyere koncepter for udredning af patienter mistænkt for B12-mangel. Det drejer sig om brug af holoTC, indekset cB12 og B12-absorptionstesten CobaSorb.

Referenceliste

1. Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW, Molloy AM, Nexø E, Stabler S, Toh BH, Ueland PM, Yajnik C. Vitamin B12 deficiency. Nat Rev Dis Primers. 2017;3: 17040.
2. Schilling RF, Clatanoff DV, Korst DR. Intrinsic factor studies. III. Further observations utilizing the urinary radioactivity test in subjects with achlorhydria, pernicious anemia, or a total gastrectomy. J Lab Clin Med. 1955; 45: 926-34.
3. Ross, GIM. Vitamin-B12 Assay in Body Fluids using Euglena-Gracilis. J Clin Pathol. 1952; 5: 250-6.

4. Karstoft H. Assay of serum vitamin B12 using Co57B12, intrinsic factor and coated charcoal. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1967;100: 146.
5. Hippe E, Olesen H. Solid-phase cobalamin assay using cobalamin-binding protein from dog stomach. *Scand J Clin Lab Invest.* 1975;35: 577-82.
6. Nexø E, Gimsing P. Insolubilized pure human intrinsic factor used for quantitation of cobalamins in serum. *Scand J Clin Lab Invest.* 1981; 41: 465-8.
7. Arnaud J, Cotisson A, Meffre G, Bourgeay-Causse M, Augert C, Favier A, Vuillez JP, Ville G. Comparison three commercial kits and a microbiological assay for the determination of vitamin B12 in serum. *Scand J Clin Lab Invest.* 1994;54: 235-40.
8. Rasmussen K, Møller J, Ostergaard K, Kristensen MO, Jensen J. Methylmalonic acid concentrations in serum of normal subjects: biological variability and effect of oral L-isoleucine loads before and after intramuscular administration of cobalamin. *Clin Chem.* 1990;36: 1295-9.
9. Refsum H1, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem.* 2004;50: 3-32.
10. Nexø E, Hoffmann-Lücke E. Holotranscobalamin, a marker of vitamin B-12 status: analytical aspects and clinical utility. *Am J Clin Nutr.* 2011;94: 359S-365S.
11. Hvas AM, Ellegaard J, Nexø E. Diagnosis of vitamin B12 deficiency--time for reflection. *UfL.* 2003;165: 1971-6.
12. Devalia V1, Hamilton MS, Molloy AM; British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and treatment of cobalamin and folate disorders. *Br J Haematol.* 2014 ;166: 496-513.
13. Fedosov SN, Brito A, Miller JW, Green R, Allen LH. Combined indicator of vitamin B12 status: modification for missing biomarkers and folate status and recommendations for revised cut-points. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53: 1215-25.
14. Hvas AM, Morkbak AL, Hardlei TF, Nexø E. The vitamin B12 absorption test, CobaSorb, identifies patients not requiring vitamin B12 injection therapy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011; 71:432-8.
15. Nexø E, Buhl BB, Arendt JFH. Vitamin B12-mangel uden anæmi. En vigtig diagnose. *Månedsskrift for Almen Praksis.* 2017;895-904.
16. Nexø E, Arendt J. Seks spørgsmål om vitamin B12. *Klinisk Biokemi i Norden.* 2016; 4-7.
17. Bailey D1, Colantonio D, Kyriakopoulou L, Cohen AH, Chan MK, Armbruster D, Adeli K. Marked biological variance in endocrine and biochemical markers in childhood: establishment of pediatric reference intervals using healthy community children from the CALIPER cohort. *Clin Chem.* 2013;59:1393-405.