



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Biologisk variation av B12 och folsyra hos hund

Biological variation of canine B12 and folic acid

Marie Häggmark

Uppsala

2020

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Biologisk variation av B12 och folsyra hos hund

Biological variation of canine B12 and folic acid

Marie Häggmark

Handledare: Emma Strage, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Inger Lilliehöök, Institutionen för kliniska vetenskaper

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2020

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: B12, folsyra, folat, biologisk variation, variationskoefficient, individualitet, analys, kvalitetsmål, serum, hund.

Key words: B12, folic acid, folate, biological, variation, coefficient of variation, intra-individual, between-subject, inter-individual, analytical, index of individuality, reference change value, quality goals, serum, dog, canine.

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

De två B-vitaminerna B12 och folsyra används i dagsläget främst för att utreda mag- och tarmstörningar hos hund, då rubbningar i nivåerna av dessa vitaminer är mycket specifika för störningar i vissa delar av mag- och tarmkanalen.

Det vanligaste sättet att analysera B12 och folsyra är att mäta totala nivåer med automatiserade instrument i serum/plasma och att jämföra provsvaren med ett referensintervall baserat på en grupp friska hundar, s.k. populationsbaserat referensintervall, som fastställts av det laboratorium där analysen utförs.

Ett annat sätt att ta reda på om en förändring är kliniskt signifikant är att använda sig av den biologiska variationen. Det är den förändring som ses, utöver fysiologiska och analytiska faktorer, och som varierar kring kroppens naturliga inställningspunkt, d.v.s. det värde som kroppen försöker upprätthålla.

Den biologiska variationen av B12 och folsyra fanns inte rapporterad hos hund. Syftet med denna studie var att fastställa den biologiska variationen av B12 och folsyra i blodprov från hund för att kunna ge råd till veterinärer om hur provsvar från sjuka hundar bäst skall utvärderas samt ge objektiva kvalitetsmål till laboratorier som analyserar B12 och folsyra.

Studien utformades så att åtta friska hundar av olika ras, ålder och kön provtogs genom blodprovstagning var femte-sjunde dag under totalt sju tillfällen per hund. Inför varje provtagning hade hundarna fastat minst 12h och en standardiserad klinisk undersökning gjordes. Alla serumproverna analyserades i slumpmässig ordning, i duplikat med Immulite 2000 vid ett och samma tillfälle.

Utifrån provresultaten fastställdes bland annat variationskoefficient inom (CV_I) och mellan (CV_G) individer, index på analytens individualitet (II) samt reference change value (RCV) för tolkning av kliniskt signifikanta förändringar vid upprepade provtagningar.

Både B12 och folsyra hade en tydlig individualitet, vilket talar för att det populationsbaserade referensintervallet (som används för att upptäcka sjukdom) inte är optimalt för dessa analyter. Istället bör om möjligt RCV användas, där två på varandra tagna prover jämförs för att hitta en kliniskt signifikant förändring.

SUMMARY

Vitamin B12 and folic acid are currently used primarily to investigate gastric and intestinal disorders in dogs, as disturbances in the levels of these vitamins are very specific for disorders of certain parts of the gastrointestinal tract.

The most common way to analyze B12 and folic acid is to measure total serum or plasma levels with automated analyzers and compare the test results with a reference interval based on a group of healthy dogs, also known as population-based reference interval, determined by the laboratory in which the analysis is performed.

Another way to find out if a change is clinically significant, is to use the biological variation. It is the variation of an analyte that is seen, in addition to physiological and analytical factors, and that varies around the body's natural setting point, i.e. the value the body is trying to maintain.

The biological variation of B12 and folic acid has not been reported in dogs. The purpose of this study was to determine the biological variation of B12 and folic acid in dog serum in order to advise veterinarians how to best evaluate patient data and to provide objective quality goals to laboratories that analyze B12 and folic acid.

In the present study eight healthy dogs of different breeds, ages and genders had blood sampled weekly for a total of seven occasions per dog. Preparatory to each sampling, the dogs had fasted for at least 12 hours and a clinically standardized examination was performed. Serum was analyzed using Immulite 2000, in randomized order at the same occasion.

Based on the test results, the coefficient of variation within (CV_I) and between (CV_G) individuals, index of the analyte's individuality (II) and reference change value (RCV, which is used to interpret clinically significant changes in repeated sampling) were determined.

Both B12 and folic acid had a distinct individuality, which indicates that the population-based reference interval is not optimal for these analytes. Instead, RCV should be used when possible, whereby two consecutive samples are compared to find a clinically significant change.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT.....	2
Biologisk variation.....	2
Studiedesign för att fastställa biologisk variation	2
Index of individuality	3
Reference change value.....	3
Biologisk variation och laboratoriers kvalitetsmål.....	4
Vitamin B12.....	4
Fysiologi.....	4
Orsaker till onormala serumkoncentrationer	5
Kliniska tecken vid B12-brist.....	5
Diagnostik	6
Folsyra	7
Fysiologi.....	7
Orsaker till onormala serumkoncentrationer	7
Kliniska tecken vid avvikande nivåer	8
Diagnostik	8
MATERIAL OCH METODER.....	9
Hundar i studien.....	9
Studiedesign.....	9
Analysmetoder	10
Immulite 2000 - Vitamin B12	10
Immulite 2000 - Folsyra.....	10
Statistik	11
RESULTAT.....	12
Vitamin B12.....	12
Folsyra	14
Beräkningar.....	16
DISKUSSION	17
Konklusion.....	19
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING.....	20
REFERENSER.....	22

FÖRKORTNINGAR

CV _I	Variation inom individen (eng: within-subject variation)
CV _G	Variation mellan individer (eng: between-subject variation)
CV _A	Analytisk variation (eng: analytical variation)
II	Index of Individuality
RCV	Reference Change Value
IF	Intrinsic Factor
FBP	Folatbindande protein

INLEDNING

Vitamin B12 och folsyra (d.v.s. Vitamin B9) är viktiga beståndsdelar i många metaboliska reaktioner i kroppen hos alla däggdjur. Bland annat spelar dessa en betydande roll i DNA-syntes, celledelning och bildandet av aminosyror och lipider. (Wagner, 1996; Dossin, 2011).

Analys av B12 och folsyra i blodprov används främst vid utvärdering av mag/tarmstörningar hos hund (Davenport *et al.*, 1994). Tidigare har analyserna ansetts ha ett värde vid utredning av hematologiska avvikelser, men senare forskning visar att de båda B-vitaminerna inte har lika stor betydelse i hematopoesen hos hund som hos människa, undantaget ärftliga rubbningar (Stanley *et al.*, 2019). I dagsläget finns ingen ”gold standard” för vilken analysmetod som ska användas vid kvantifiering av B12 och folsyra hos hund (McLeish *et al.*, 2019). Det vanligaste är att mäta totala nivåer i serum/plasma och att provsvaren jämförs med ett referensintervall baserat från en grupp friska hundar, s.k. populationsbaserat referensintervall, som fastställts av det laboratorium där analysen utförs.

Alla analyter uppvisar en naturlig biologisk variation inom och mellan individer. För analyter som uppvisar stor variation inom en individ i relation till mellan individer, är referensintervall baserat på en grupp friska individer ett bra sätt att utvärdera ett provsvar från en patient. Om däremot analyten uppvisar liten variation inom en individ i relation till mellan individer, finns risk att signifikanta ändringar inte upptäcks med populationsbaserade referensintervall. För dessa analyter rekommenderas istället ”reference change value” vilket räknas ut med hjälp av data baserat på analytens biologiska variation och analysmetodens variationskoefficient (Fraser, 2001). Genom att använda sig av biologisk variation tar man hänsyn till varje enskild analyts naturliga fluktuation och kan med större säkerhet uttala sig om en förändring är tillräckligt stor för att räknas som kliniskt signifikant (Walton, 2012).

Den biologiska variationen av B12 och folsyra finns inte rapporterad hos hund. Syftet med denna studie var att fastställa den biologiska variationen av B12 och folsyra i blodprov från hund för att kunna ge råd till veterinärer om hur patientdata bäst skall utvärderas samt ge objektiva kvalitetsmål till laboratorier som analyserar B12 och folsyra.

LITTERATURÖVERSIKT

Biologisk variation

I alla levande varelser sker en naturlig, ständig förändring, vilken kan mätas via provtagning av bland annat blod och urin. Vissa förändringar är beroende av kön, ålder, fysisk aktivitet eller cyklicitet. Utöver dessa faktorer ses en förändring som varierar kring en homeostatisk inställningspunkt, det vill säga ett värde som kroppen försöker upprätthålla. Denna förändring gör att en serie provtagningar från en och samma individ inte kommer att ge provsvar med exakt likadana värden. Denna föränderlighet kallas för biologisk variation (Fraser, 2001).

Vid tolkning av provsvar på humansidan började man ta hänsyn till den biologiska variationen på 1970-talet, men det dröjde till slutet av 1980 innan den uppmärksammades på djursidan. Många studier finns i dagsläget inom ämnet. Man har upptäckt att den biologiska variationen skiljer sig mycket mellan olika arter, varför området är än mer komplext på den veterinärmedicinska sidan. Biologisk variation skiljer sig inte bara mellan olika arter och individer, utan även mellan olika analyser. Utöver preanalytiska faktorer (såsom provtagningsställe, centrifugeringstid, hållbarhet o.s.v.) samt slumpmässiga och systematiska fel som sker i samband med analys, försvårar analytens naturliga variation tolkningen av provsvar ytterligare (Freeman *et al.*, 2017).

Den biologiska variation som kan uppmätas mellan de olika provtagningarna brukar uttryckas som variationskoefficient, CV, och räknas ut genom att dividera standardavvikelsen med medelvärdet från variansanalysen. Variationen inom samma individ kallas intra-individuell biologisk variation (CV_I), medan den som ses mellan individer kallas för inter-individuell (CV_G). Utöver dessa ses en variation till följd av analysmetodens slumpmässiga variation, denna kallas analytisk variation (CV_A) (Fraser, 2001). Vid tolkning av patientprover bör CV_A fastställas internt i de olika laboratorierna, vilket i sin tur även medför en variation av det värdet (Ricós *et al.*, 2004).

Studiedesign för att fastställa biologisk variation

För att fastställa den biologiska variationen krävs en mindre grupp friska djur av det djurslag man önskar undersöka. Varje individ provtas upprepade gånger med ett konstant intervall. Tidigare studie av Fraser & Harris (1989) på humansidan anger att det behövs olika antal friska individer för olika analyser. När CV_I är känt kan man enligt denna studie räkna ut antalet friska individer som behövs genom formeln $n=(Z*CV_{A+I}/D)^2$ där $Z = 1,96$ (vilket motsvarar 95 % konfidensintervall) och D är den procentuella avvikelser från den homeostatiska inställningspunkten.

En nyligen publicerad studie av Freeman *et al.* (2017) anger att det på veterinärsidan rekommenderas att provta 10-15 djur veckovis under minst 4-6 veckors tid (förutsatt att $CV_A:CV_I$ är ≤ 0.5). Antalet djur som rekommenderas är beroende av hur mycket den undersökta analyten varierar inom ett djur (CV_I). Om det är första gången en analyt undersöks så är det omöjligt att veta CV_I , då data saknas.

Provtagningen utformas så att preanalytiska faktorer försöker minskas i så hög utsträckning som möjligt. Proven fryses omgående och bevaras frysta tills alla prov kan analyseras vid ett och samma tillfälle. Proven analyseras i duplikat, för att få ett mått på den analytiska variationen och kunna lägga in den analytiska variationen som en faktor i den statistiska modellen. Outliers, d.v.s. kraftigt avvikande värden, elimineras och därefter estimeras variansen, antingen genom nested analysis of variance (nested ANOVA) eller mixed model med restricted maximum likelihood (REML) (Freeman *et al.*, 2017). Utifrån variansen fås standardavvikelsen, vilken tillsammans med medelvärdet används för att räkna ut CV_I , CV_G samt CV_A . CV_A kan också räknas ut från de sammanlagda resultat som erhållits via laboratoriet (Fraser, 2001).

Index of individuality

En analyt kan variera kring sin naturliga inställningspunkt. Det spann inom vilket analyten kan variera kallas för Index of Individuality (II). Utifrån sina provsvar från upprepade provtagningar kan man räkna ut ett index på analytens variation för att ta reda på huruvida man rekommenderas använda sig av populationsbaserat referensintervall för bedömning av sina provsvar eller inte.

II räknas ut genom formeln $II = CV_G / (CV_A^2 + CV_I^2)^{0.5}$. Ett högt II ($>1,67$) innebär att analyten har en hög individualitet och det populationsbaserade referensintervallet är således mindre lämpligt att använda sig av till följd av för vida gränser. Om man istället har ett lågt II ($<0,7$) innebär detta att det populationsbaserade referensintervallet är mer användbart till följd av att variationen hos varje individ sträcker sig över större delen av referensintervallet (Freeman *et al.*, 2017). Värden däremellan räknas som intermediära och innefattar de flesta analyter. För dessa är populationsbaserat referensintervall av begränsat värde (Harr *et al.*, 2013).

Om man istället använder sig av formeln från Fraser (2001); $II = (CV_A^2 + CV_I^2)^{0.5} / CV_G$ alternativt den förenklade formeln CV_I / CV_G (om $CV_A < CV_I$), får man omvänd innebörd. Gränsvärdena ligger då på $<0,6$ och $>1,4$ för hög respektive låg individualitet. Relativt få analyter har ett II som överstiger 1,67 (Freeman *et al.*, 2017) eller understiger 0,6 (Fraser, 2001).

Reference change value

Om ett värde har högt II (Freeman *et al.*, 2017) eller lågt II (Fraser, 2001) bör man helst inte använda sig av det populationsbaserade referensintervallet. Istället används Reference Change Value (RCV), vilket ger en uppskattning på hur man ska tolka skillnader mellan prover från samma individ. RCV anges i procent och baseras på CV_I och CV_A . Genom att jämföra två på varandra tagna prover med hjälp av RCV kan man räkna ut hur mycket ett analytiskt värde procentuellt får avvika från det tidigare värdet innan förändringen räknas som kliniskt signifikant (Walton, 2012). RCV räknas ut genom formeln $2^{0.5} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{0.5}$ där Z väljs utifrån den sannolikhet som önskas. Oftast räcker det att beräkna utifrån 95 % konfidensintervall ($P < 0,05$), vilket enligt statistiska tabeller ger $Z = 1,96$ vid beräkning bilateralt, d.v.s. i båda riktningar (Fraser, 2001; Freeman *et al.*, 2017).

Biologisk variation och laboratoriers kvalitetsmål

Det finns ett flertal olika metoder för att fastställa ett laboratoriums kvalitetsmål, det vill säga de krav som ställs på laboratoriets prestanda av de olika analysmetoderna. De analytiska kvalitetsmålen kan bland annat baseras på biologisk variation, exempelvis genom fastställande av hur högt CV_A för en viss analyt får vara (Fraser & Harris, 1989).

Om ett prov analyseras upprepade gånger så fås inte exakt samma analys svar. Denna variation kan delas upp i inom-körningsvariation, vilket är variationen (CV_A) inom samma körning (t.ex. om proverna analyseras direkt efter varandra) och mellan-körningsvariation (t.ex. om proverna analyseras olika dagar) (Fraser *et al.*, 1997). Det CV_A som användes vid denna studie baserades på inom-körningsvariation. Den statistiska modellen som användes i denna studie separerar ut analytisk variation (d.v.s. CV_A), variation inom ett djur (CV_I) och mellan djur (CV_G). Eftersom alla proverna analyserades vid samma tillfälle inkluderar denna variation endast inom-körningsvariationen. I praktiken analyseras patientprover olika dagar och för att få ett mer realistiskt mått på den analytiska variationen användes därför laboratoriets egna data för CV_A vilka baseras på mellan-körningsvariationen.

För att fastställa vilka analytiska mål för CV_A som ett laboratorium har, behöver man fastställa hur stor slumpmässig analytisk variation som ska tillåtas utöver den variation som redan ses inom en individ (CV_I). För ett önskvärt CV_A (CV_{DES}) krävs att $CV_A < 0,5 * CV_I$, d.v.s. att den analytiska imprecisionen är mindre än $0,5 * CV_I$. För ett optimalt CV_A (CV_{OPT}) krävs att $CV_A < 0,25 * CV_I$ och för minsta godtagbara CV_A (CV_{MIN}) bör $CV_A < 0,75 * CV_I$. Detta ger ett CV_A som vid optimum endast ger 3 % ökad variabilitet, vid önskvärt 12 % samt vid minimum som mest 25 % ökad variabilitet utöver CV_I (Fraser *et al.*, 1997).

Vitamin B12

Fysiologi

Vitamin B12, även kallat kobalamin, är en vattenlöslig vitamin som fått sitt namn utifrån sitt innehåll av grundämnet kobolt. Vitamin B12 är en av åtta olika B-vitaminer, som medverkar i bland annat metabolismen av aminosyror och lipider. Den har även en betydande roll i DNA-syntesen, brist på B12 drabbar därför i första hand celler med snabb celledelning i exempelvis benmärg och tarm (Dossin, 2011).

Trots att B12 upptäcktes för ca 70 år sedan så har man fortfarande inte lyckats fastställa alla dess biokemiska, fysiologiska och neurologiska effekter. Senare forskning på humansidan tror att njurarna har en betydande roll i metabolismen av B12 (Solomon, 2007). Studier visar att det finns ett stort antal receptorer för upptag av intrinsic factor-bundet B12 i njurarna hos däggdjur, troligen för att resorbera B12 från urinen (Seetharam, 1999). Det diskuteras även huruvida B12 påverkar regleringen av cytokiner och tillväxtfaktorer. B12 tros även delta i fler processer i kroppen än vad som i dagsläget är känt (Solomon, 2007).

Upptaget av B12 i digestionskanalen är receptormedierat och komplext. Proteinbundet B12 från födan frisätts med hjälp av pepsinogen och magsyra, för att från fri form binda in till haptocorrin (glykoprotein från saliven) som transporterar vitaminen genom magsäcken till duodenum.

Här bryts haptocorrinbindningarna med hjälp av pankreasenzymer. B12 binder till intrinsic factor (sekretoriskt glykoprotein), som hos hund produceras i både magsäck och pankreas (Marcoullis *et al.*, 1980) och endast i pankreas hos katt (Ruaux, 2013). Intrinsic factor hjälper B12 i transporten från tarmarna till portasystemet, men transporten över cellmembran kan endast ske med hjälp av en specifik intrinsic factor-kobalaminreceptor (IFCR) som finns i ileum. För transport i blodet krävs en annan typ av bindningsprotein, transkobalamin II. Transkobalaminbundet B12 kan sedan tas upp av alla celler (Seetharam, 1999). Vitamin B12 deltar i två olika enzymatiska processer i cellerna; metioninsyntasreaktionen och metylmalonyl-CoA-mutasreaktionen där två enzymer har fastställts som B12-beroende hos däggdjur; metioninsyntas och metylmalonyl-CoA-mutas. I metioninsyntasreaktionen omvandlas homocystein till metionin med hjälp av metioninsyntas, vilket är ett viktigt steg i DNA-syntesen. I metylmalonyl-CoA-mutasreaktionen ombildas metylmalonyl-CoA till succinyl-CoA, som sedan ingår i citronsyracykeln och är en prekursor i bland annat hematopoesen och fettsyra-syntesen (Banerjee & Ragsdale, 2003).

Orsaker till onormala serumkoncentrationer

Brist på vitamin B12 hos hund och katt till följd av för lågt intag via födan har inte kunnat påvisas i någon peer-reviewlitteratur. Studier har visat att dieter med förhållandevis lågt innehåll av B12 ändå överstiger hundens basala behov (Ruaux, 2013). Brist kan däremot ses vid en rad olika patologiska tillstånd i framför allt pankreas, tarmar och lever. Bland annat har brist uppmätts i samband med exokrin pankreasinsufficiens (EPI) till följd av brist på produktion av intrinsic factor (Ruaux, 2013; Soetart *et al.*, 2019). Även sjukdomar i tunntarmarna och intestinalt lymfom med påverkan på ileums tarmepitel, kan leda till att antalet IFCR minskar, vilket minskar upptaget (Ruaux, 2013). Bakteriell överväxt i tunntarmarna ger en konkurrens om B12, då bakterierna komplexbinder B12 i magsäcken, vilket försämrar upptaget (Batt & Morgan, 1982; Suchodolski & Steiner 2003). Hos katt ses även brist vid leverlipidos, troligen till följd av kronisk enteropati eller kolangiohepatit (Ruaux, 2013). Fysiologiska tillstånd hos hund som kan ge upphov till brist är dräktighet, där behovet av vitaminen ökar (Kalender *et al.*, 2006). Det finns även en ärftlig variant av primär B12-malabsorption (Imerslund-Gräsbecksyndromet), som främst drabbar schnauzer, border collie, australian shepherd, beagle (Hanisch *et al.*, 2018), shar-pei och schäfer (Dossin, 2011).

Ökade nivåer kan på humansidan ses vid bland annat hepatocytiska, tumörer och hög supplementering av B12 (Arendt & Nexo, 2012). För hund finns inga studier i dagsläget som påtalar vikten av eller orsaken till förhöjda B12-nivåer, men hos katt har man sett en association till leversjukdom eller neoplasi (Trehya *et al.*, 2014).

Kliniska tecken vid B12-brist

Då B12-brist hos hund vanligen uppstår till följd av andra tillstånd, såsom EPI, inflammatorisk tarmsjukdom och andra sjukliga tillstånd i GI-kanalen, är dessa symptom de mest dominerande. Dålig tillväxt hos unga hundar, neutropeni, anemi och megaloblastiska förändringar i benmärgen har påvisats vid den ärftliga varianten (Fyfe *et al.*, 1991). Till skillnad från människa så har inga fall av neurologisk påverkan rapporterats hos hund (Ruaux, 2013). I en tysk studie av Hanisch *et al.* (2018) omnämns dock neuropati som ett kliniskt tecken, men utan hänvisning

till vidare studier. I en studie av Davenport *et al.* (1994) omnämns B12 som en bra mätmetod för att utreda neurologiska sjukdomar hos hund och katt, med referens till Fyfe *et al.* (1991) och en humanstudie. Inga neurologiska avvikelser hos hund omnämns i dessa studier.

Diagnostik

Vitamin B12 analyseras vanligtvis med immunologiska metoder, där immunologiska reaktioner eller antigen identifieras eller mäts med hjälp av antikroppar. I denna studie analyserades B12 med Immulite 2000 (Siemens, München, Tyskland). Enligt instrumentets användarmanual för prover från människor anges att blod i serumrör bör ha koagulerat före centrifugering för att undvika fibrin i provet. Provet bör köras inom 8 timmar eller frysas ned (provet är stabilt i 6-8 veckor vid -20°C). B12 påverkas varken av hemolys (>4 g/L) eller bilirubin. Lipemiska prover bör köras i ultracentrifug. EDTA kan ha en signifikant effekt på resultatet, plasma från EDTA-rör bör därför inte användas vid analys av B12 (Siemens, 2018).

För att diagnosticera B12-brist på humansidan analyseras utöver koncentrationen av B12, även homocystein och metylmalonylsyra som indikerar funktionell B12-brist, samt holotranskobalamin som en mätning av metaboliskt aktivt cirkulerande B12 i blodet (Solomon, 2007). På djur används i första hand totalt B12 i serum, men vissa laboratorier kan även analysera homocystein och metylmalonylsyra (Toresson *et al.*, 2019). Det finns inga studier för analys av holotranskobalamin på husdjurssidan (Ruaux, 2013).

B12-brist har en hög specificitet för att upptäcka dysfunktion i GI-kanal, pankreas eller lever hos djur. Det är dock inte ett särskilt specifikt test för att diagnosticera grundsjukdomen som orsakar ändringen av B12-koncentrationen i blodet och därför krävs ofta vidare diagnostik för att ställa sin diagnos (Ruaux, 2013). B12 i serum används ofta som en markör för tunntarmsdysfunktion, på grund av den strikta förekomsten av IFCR i den distala delen av tunntarmarna (Batt & Morgan, 1982). Att mäta B12-nivåer i serum/plasma hos hund med hjälp av immunoanalys har en god tillförlitlighet (McLeish *et al.*, 2019).

Vid brist på vitamin B12 kan inte omvandling från homocystein till metionin ske, vilket ökar mängden homocystein. På samma sätt ackumuleras metylmalonylsyra, då omvandling till succinyl-CoA ej är möjlig (Ruaux, 2013). Ökad mängd homocystein i serum förknippas ofta med B12-brist på humansidan och kan även på veterinärsidan mätas initialt vid misstanke (Ruaux, 2013). I två studier gjorda på hund, sågs tydligt förhöjda nivåer av homocystein hos hundar med medfödd B12-brist. Hos dessa var även metylmalonylsyra tydligt förhöjt (Fyfe *et al.*, 1991; Lutz *et al.*, 2012). Homocystein är dock inte ett särskilt specifikt fynd, då förhöjda nivåer även setts vid exempelvis folsyrabrist och medfödda enzymfunktionsfel (Ruaux, 2013). Homocystein kan även stiga vid exempelvis nedsatt njurfunktion, hjärtsjukdomar och hypothyroidism (Gołyński *et al.*, 2017). I en studie av Heilmann *et al.* (2017) förekom förhöjda nivåer av homocystein i större utsträckning hos friska greyhounds än hos greyhounds med B12-brist.

Vid riktad misstanke om B12-brist är mätning av metylmalonylsyra av högre kliniskt värde än homocystein och totalt B12 i serum, då metylmalonylsyra bättre speglar B12-nivåerna i vävnad (Stabler *et al.*, 1996; Ruaux, 2013). I ett försök med 555 hundar sågs en tydlig relation mellan

B12 i serum och metylmalonylsyra (Berghoff *et al.*, 2011). Metylmalonylsyra kan även stiga vid nedsatt njur- eller leverfunktion (Ruaux, 2013). I vissa studier har man observerat motsatta förhållanden, där resultaten uppvisat lågt metylmalonylsyra vid lågt B12 i serum eller högt metylmalonylsyra trots normala B12-nivåer (Berghoff *et al.*, 2011; Lutz *et al.*, 2012). Det finns flera teorier till dessa missvisande resultat, bland annat att de låga B12-nivåerna som uppmätts i serum inte speglar de faktiska, normala nivåerna i vävnad, varpå metylmalonylsyra-nivåerna förefaller opåverkade (Solomon, 2007).

Hos katt har ingen ökning av homocystein vid B12-brist kunnat påvisas, även om bristen varit mycket uttalad. Detta troligen till följd av att katter har ett större metioninintag via födan och därmed mindre metioninsyntasaktivitet. Däremot sågs ofta ett kraftigt ökat metylmalonylsyra hos katter och shar-peihundar med rasrelaterade problem med B12-upptag (Ruaux, 2013).

Folsyra

Fysiologi

Folsyra, eller Vitamin B9, är ett annat namn på en vattenlöslig B-vitamin som finns i flera olika former. Folat är den naturliga varianten av vitaminen, som finns naturligt i föda. Folsyra är den mest oxiderade och stabila formen och existerar i väldigt liten utsträckning naturligt i föda, men är den variant som ofta framställs på syntetisk väg. Folat/folsyra spelar en viktig roll i bildandet av tymidylatsyntas, ett enzym som krävs för bildandet av DNA och således även har betydelse för tillväxt, celledelning och hematopoes (Wagner, 1996; Stanley *et al.*, 2019). Folsyra är, precis som vitamin B12, nödvändigt för metioninsyntasreaktionen och upprätthållandet av normala nivåer av homocystein (Combs & McClung, 2017).

Vid intag av folat som finns naturligt i föda, förekommer den främst i form av polyglutamater. Folat hydrolyseras sedan från polyglutamat, som är svårare för kroppen att ta upp, till mer lättillgängliga monoglutamater med hjälp av tarmenzymet folatdekonjugas. Monoglutamaterna tas sedan upp av specifika receptorer som endast finns i den proximala tunntarmen (Suchodolski & Steiner, 2003). Folat transporteras via portasystemet till levern i fri form eller med hjälp av folatbindande protein (FBP) eller albumin. Folat kan sedan ta sig in i vävnader via aktiva pumpar. I vävnad ombildas monoglutamaterna åter till polyglutamater med hjälp av polyglutamatsyntas, för att hållas kvar inne i cellerna. För att transporteras ut i blodet igen krävs åter dekonjugering (Combs & McClung, 2017).

Orsaker till onormala serumkoncentrationer

Låga nivåer av folsyra i serum ses vid bland annat tarmsjukdomar som orsakar epitelskador i främre delen av tunntarmen (där folsyra normalt absorberas). Även antibiotikabehandling kan sänka nivåerna av folsyra, då antibiotikan påverka normalfloran i tarmen och därmed även de folsyraproducerande tarmbakterier som finns naturligt i tarmen (Batt & Morgan, 1982; Thomson, 2018).

Låga nivåer folsyra hos hund kan även ses till följd av lågt intag via födan, eller vid exempelvis dräktighet och tillväxt, där behovet ökar (Afonsky, 1954). Tidigare ansågs hundar inte behöva tillskott av folsyra i fodret, men i en studie av Afonsky (1954) påvisades ett fall med folsyrabrist

till följd av bristfälligt innehåll i fodret. Afonsky konstaterade därför att vissa hundar kan vara i behov av folsyratillskott i fodret. Folsyra tillsätts i de flesta hundfoder (Dossin, 2011).

Ökade nivåer kan ses vid EPI samt bakteriell överväxt av folsyraproducerande bakterier i proximala tunntarmen (Batt & Morgan, 1982; Soetart *et al.*, 2019). Vid överväxt i ileum eller kolon har inte någon ökning av folsyra i serum kunnat påvisas då upptaget av folsyra sker i mycket liten utsträckning distalt i tarmen (Batt & Morgan, 1982). Ökade nivåer har även setts vid koprofagi, då bakterier i distala tunntarmen och kolon producerar folsyra vilket ger ett högt folsyrainnehåll i faeces (Dossin, 2011).

Kliniska tecken vid avvikande nivåer

Då rubbningar i folsyranivåer hos hund vanligen uppstår till följd av andra tillstånd, såsom EPI, inflammatorisk tarmsjukdom och andra sjukliga tillstånd i GI-kanalen, är dessa symptom de mest dominerande. Det finns mycket lite data att tillgå på veterinärsidan när det kommer till kliniska tecken till följd av rubbningar i folsyranivåer. Hos hund finns benmärgshypoplasi och atrofisk glossit beskrivet (Afonsky, 1954).

Diagnostik

Folsyra analyseras vanligtvis med immunologiska metoder d.v.s. metoder där immunologiska reaktioner eller antigen identifieras eller mäts med hjälp av antikroppar. I denna studie analyserades folsyra med Immulite 2000 (Siemens, München, Tyskland). Enligt instrumentets användarmanual för prover från människor anges att blod i serumrör bör ha koagulerat före centrifugering för att undvika fibrin i provet. Provet bör köras inom 8 timmar eller frysas ned (provet är stabilt i 6-8 veckor vid -20°C). Lipemiska prover bör köras i ultracentrifug. EDTA kan ha en signifikant effekt på resultatet, plasma från EDTA-rör bör därför inte användas vid analys av folsyra (Siemens, 2017). Folsyra kan få falskt höga värden vid hemolys, då nivåerna av folsyra i röda blodkroppar är höga (Suchodolski & Steiner, 2003). Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS har gjort egna studier på hund där man sett en tydlig ökning av folsyra vid hemolysgrad 1 g/L.

De två metoder som beskrivs på hund är mätning av totalt folsyra i serum samt i röda blodkroppar. Man kan även mäta homocystein som indikator för folsyrabrist. Totalt folsyra i serum är den metod som ofta används för att fastställa folsyranivåer i blodet, vilken anses ha god tillförlitlighet (McLeish *et al.*, 2019). Serumkoncentrationen anses, tillsammans med andra metoder, vara ett värdefullt diagnostiskt test om det används och tolkas korrekt (Lindenbaum *et al.*, 1988).

För att utreda om folsyrabrist föreligger är mätning av folsyrahalten i röda blodkroppar en relativt säker metod för uppskattning av halten i vävnad (Batt & Morgan, 1982). Cirkulerande nivåer påverkas av födointag och kan uppvisas normala trots brist av folsyra, vilket medför att mätning av nivåerna i blodet inte är ett lika pålitligt index för nivåerna i vävnad. Enligt studier på humansidan tar blodkropparna inte upp folsyra när de kommit ut i cirkulationen, utan detta sker endast i utvecklingsstadiet i benmärgen, varpå de mer långsiktiga folsyranivåerna i vävnad speglas bättre (Institute of Medicine, 1998).

MATERIAL OCH METODER

Hundar i studien

Provtagningen till denna studie utfördes våren 2019. Till studien användes åtta privatägda hundar i åldern 1 - 12 år, av båda kön och skild ras och storlek (Tabell 1). Hundarna bedömdes kliniskt friska och stod inte på någon medicinering. Hundarna provtogs var femte-sjunde dag under sammanlagt sju tillfällen.

Tabell 1. *Hundar i studien*

Ras	Kön	Ålder
Jämthund	Hankastrat	11 år
Jämthund	Hona	1 år
Cocker spaniel	Hona	2 år
Cocker spaniel	Hankastrat	6 år
Labrador	Hona	2 år
Jämthund	Hona	6 år
Pointer	Hona	2 år
Whippet	Hona	12 år

Studiedesign

Djurägarna informerades om studien skriftligt och kunde när som helst välja att avbryta sitt deltagande. Djurägarna fick skriva på ett medgivande om att deras hundar användes i studien. Försöket godkändes enligt Jordbruksverket och Uppsala djurförsöksetiska nämnd, tillståndsnummer 5.8.18-15533/2018.

För att bedöma att hundarna var friska gjordes en standardiserad klinisk undersökning av varje hund före varje provtagning, innefattande följande:

- Allmäntillstånd
- Hudturgor
- Hjärtauskultation
- Lungauskultation
- Bedömning av slemhinnor och CRT
- Palperbara lymfknotor
- Bukpalpation
- Övriga avvikelser, t.ex. tandsten

Djurägarna fick även svara på följande frågor inför varje tillfälle:

- Upplevs hunden frisk?
- Står hunden på någon medicinering?
- Äter/dricker/kissar/bajsar hunden normalt?
- Har hunden haft problem med kräkningar/diarré senaste veckan?
- Något annat avvikande i hundens skötsel och hälsa senaste veckan?

Hundarna provtogs på morgonen, då de fastat under minst 12h. Till provtagningen användes butterflykanyl av modell BD Vacutaine® Safety-Lok 0,8mm (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) samt serumrör av modell Vacuette® Z serum clot activator 9mL (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österrike). Proverna togs från *vena cephalica* på sittande hund, centrifugerades efter 30 - 60 min och serum avskildes direkt efter centrifugering för omgående nedfrysning i -20°C. Proverna förvarades i -20°C under 1-6 dagar för att sedan frysas i -80°C under 2-6 veckor innan alla prover kunde analyseras. Proverna förflyttades i fryst tillstånd mellan frysarna. Innan analys delades varje prov upp i två rör (duplikat). Alla prover analyserades sedan i slumpmässig ordning vid ett tillfälle med Immulite 2000 vid Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS.

Analysmetoder

Immulite 2000 - Vitamin B12

Denna immunologiska, kompetitiva analysmetod baseras på att endogent vitamin B12 från det tagna provet tävlar med immobiliserat B12 i instrumentets reagens om att binda till porcins intrinsic factor (IF). Först denatureras B12-bindande proteiner med hjälp av en alkalisk lösning så att endogent B12 frigörs. Därefter inkuberas provet med B12-coatade polystyrenkulor och porcins IF. Det fria B12 tävlar då med det bundna B12 om att binda till IF. Därefter tillsätts en märkt antikropp mot porcins IF som endast binder till de B12-IF-komplex som är immobiliserade på kulorna. Obundna enzymer avlägsnas med en centrifugal tvätt. Därefter tillsätts kemiluminiscenssubstrat och provet läses av med en luminometer. Om provet har en låg koncentration av B12 kommer en stor mängd IF och därmed även en stor mängd antikropp att binda in till det B12 som är bundet till polystyrenkulorna, vilket medför att man får en hög ljusstyrka.

Immulite 2000 - Folsyra

Denna analysmetod bygger också på en immunologisk, kompetitiv kemiluminiscens. Serum eller plasma innehållande endogen folsyra blandas med ligandmärkt folsyra. Alkalisk denaturering av endogena bindningsproteiner sker, därefter tillsätts folatbindande protein (FBP) samt polystyrenkulor täckta med antikroppar mot FBP. Endogen och ligandmärkt folsyra tävlar om att binda in till FBP, som i sin tur binder till antikropparna på polystyrenkulorna. Märkta anti-ligander tillsätts, vilka endast binder till ligandbundet folsyra. Slutligen tvättas obundna enzymer bort genom centrifugaltvätt och kemiluminiscenssubstrat tillsätts för avläsning med luminometer. Då de märkta anti-liganderna endast binder till ligandmärkt folsyra, kommer ett prov med låg halt endogent folsyra att få en hög ljusstyrka.

Statistik

Serum från de provtagna hundarna analyserades i slumpmässig ordning i duplikat. JMP pro (Version 14, SAS Institute, Cary, NC) och Excel (Version 16.29.1) användes för de statistiska analyserna. Outliers mellan replikat och inom en hund utvärderades med Cochran's test och outliers mellan hundar med Reeds criterion. Varianserna för replikaten, inom-individ samt mellan individer fastställdes med REML. Hund och dag sattes som slumpmässig effekt och dag sattes som beroende av hund. Residualplottar från den statistiska analysen granskades för normalfördelning och outliers. Från variansen räknades standardavvikelsen ut, vilken tillsammans med medelvärden användes för att räkna ut CV inom en individ (CV_I) och mellan individer (CV_G) för de åtta hundarna i studien (Freeman *et al.*, 2017).

CV_A räknades både ut utifrån de åtta hundarna i försöket (CV_{REML}) samt från laboratoriets interna kontrollprover (Lyphocheck, Biorad, USA. Nivåer för B12; låg koncentration 235 nmol/L och hög koncentration 496 nmol/L. Nivåer för folsyra; låg koncentration 9 nmol/L och hög koncentration 18 nmol/L). Medelvärden räknades ut för hög och låg koncentration av B12 och folsyra ($CV_{A(hög)}$ respektive $CV_{A(låg)}$). Dessa användes för att räkna ut formlerna nedan. För att räkna ut ett optimalt CV_A (CV_{OPT}) användes formeln $CV_A < 0,25 * CV_I$. För önskvärt CV_A (CV_{DES}) användes formeln $CV_A < 0,5 * CV_I$. För minsta godtagbara CV_A (CV_{MIN}) användes $CV_A < 0,75 * CV_I$ (Fraser, 2001; Freeman *et al.*, 2017).

För uträkning av reference change value (RCV) används formeln $2^{0,5} * Z * (CV_A^2 + CV_I^2)^{0,5}$ där man multiplicerar med 2 för att ta formeln två gånger, då man jämför två olika värden med varandra. Då det är patientdata som analyseras är både ökning och minskning intressanta, därför användes $Z=1,96$, vilket är konfidensintervallet för dubbelsidiga förändringar (95 %). RCV räknades ut för både hög och låg koncentration av B12 och folsyra, genom att använda laboratoriets CV_A (Fraser, 2001; Freeman *et al.*, 2017).

Index of Individuality står för förhållandet mellan de olika variationskoefficienterna och räknades ut genom formeln $CV_G / (CV_A^2 + CV_I^2)^{0,5}$. II räknades ut för både hög och låg koncentration av B12 och folsyra, genom att använda laboratoriets CV_A (Freeman *et al.*, 2017).

RESULTAT

Vitamin B12

Inga prover var lipemiska, men två hade en svag hemolys och analyserades därför för att fastställa hemolysindex. Provernas hemolysgrad var 0,3 g/L respektive 0,5 g/L. Gränser för hemolys i prover för analys av B12 låg på 5 g/L enligt Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS, båda analyserna inkluderades därför.

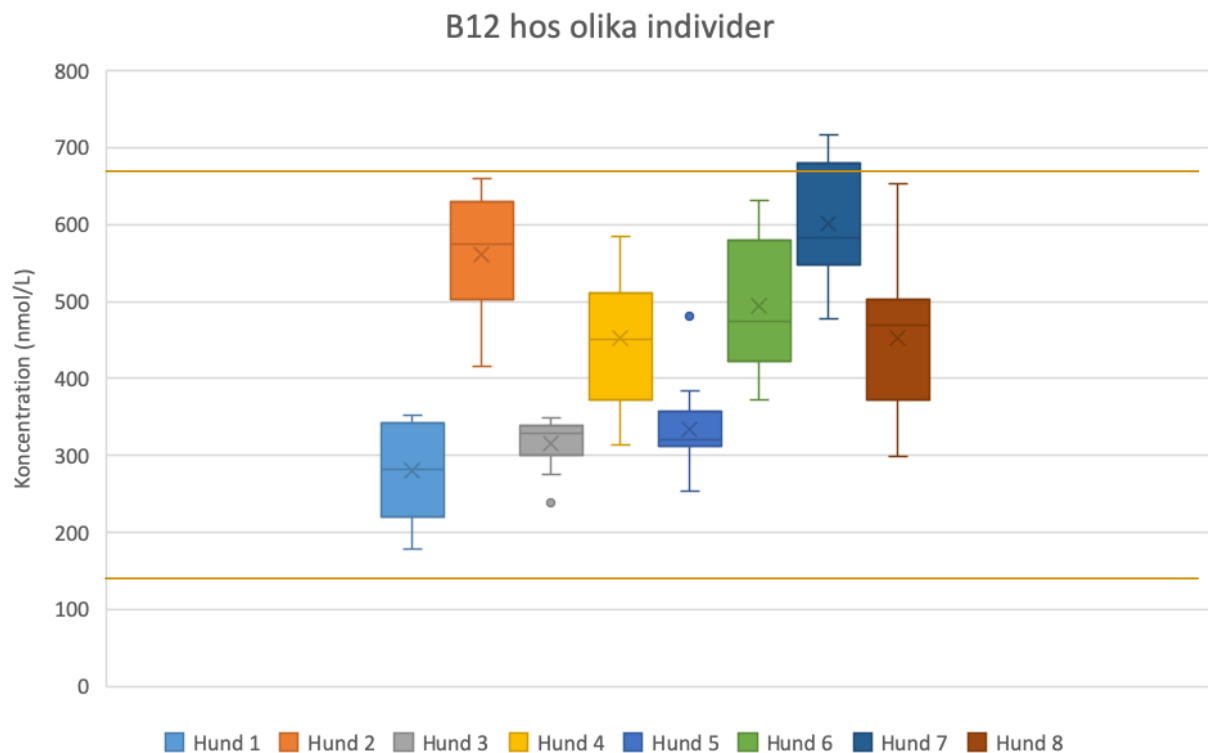
Inga hundar hade diarré vid provtagningsstillfället, men hälften av hundarna hade haft GI-störning vid enstaka tillfälle, 1-5 dagar innan provtagningen (se tabell 2). Hos de hundar som haft störningar var det endast ett prov (prov 1, replikat 1 hos hund 6) som avvek. Detta värde var något lägre än jämförande prover från samma hund vid övriga provtagningsstillfälle, men då endast ett av de två replikaten var lågt så kopplades det till analysvariation snarare än diarré inför provtagningen. Inget av proverna från hundar med tidigare GI-störning flaggade ut som outlier eller hamnade under det fastställda referensintervallet och alla inkluderades därför i studien.

Hos alla hundar utom hund 7, där enstaka värden avviker, ligger samtliga värden inom populationsbaserat referensintervall (se figur 1).

Tabell 2. Resultat B12 från upprepad provtagning av 8 hundar vid 7 olika tillfällen per hund. Värdena anges i nmol/L. Rödmarkerade serumprover hade GI-störning 1-5 dagar före provtagningen. Blåmarkerade serumprover hade svag hemolys.

* Outliers

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 7	Hund 8
Prov 1, repl 1	191	416	333	502	253	373	709	356
Prov 1, repl 2	196	488	292	485	343	409	688	404
Prov 2, repl 1	179	477	336	582	254	413	>738*	298
Prov 2, repl 2	229	507	339	584	314	483	>738*	373
Prov 3, repl 1	255	635	275	364	309	466	658	482
Prov 3, repl 2	352	644	308	458	315	457	717	499
Prov 4, repl 1	288	627	238	445	314	587	593	369
Prov 4, repl 2	336	660	310	537	324	525	574	490
Prov 5, repl 1	272	520	328	375	355	581	547	512
Prov 5, repl 2	346	526	331	480	481	579	561	457
Prov 6, repl 1	351	599	345	329	349	529	547	402
Prov 6, repl 2	317	583	339	440	363	632	647	539
Prov 7, repl 1	340	565	302	313	316	426	502	499
Prov 7, repl 2	277	598	348	440	384	465	477	653



Figur 1. Spridningen i B12-koncentration för respektive av de 8 hundarna i studien. Medelvärdet markeras med x, medianen med horisontell linje. Övre och undre kvartil markeras med lådans övre och undre kant. Översta och understa kvartil med vertikal linje med det högsta och lägsta värdet i ytterkanterna. Värderna som ligger mer än 3 x över eller under kvartilavståndet (dvs längden på lådan) markeras med en färgad punkt. Det existerande referensintervallet som används av Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS markeras med streckade linjer.

Hund 7 hade även 2 replikat som var omätbart höga (>738 nmol/L), dessa har räknats som outliers och exkluderats från de statistiska beräkningarna och även från detta diagram pga avsaknad av numeriskt värde.

Folsyra

Inga prover var lipemiska, men två hade en svag hemolys och analyserades därför för att fastställa hemolysindex. Provernas hemolysgrad var 0,3 g/L respektive 0,5 g/L. För folsyra rekommenderades i litteraturen att utesluta prover med hemolys, p.g.a. risken för förhöjda nivåer. Enligt Klinisk kemiska laboratoriets egna hemolysstudier hos hund låg gränsen på 0,5 g/L för ökning som ansågs av klinisk relevans, båda analyserna inkluderades därför.

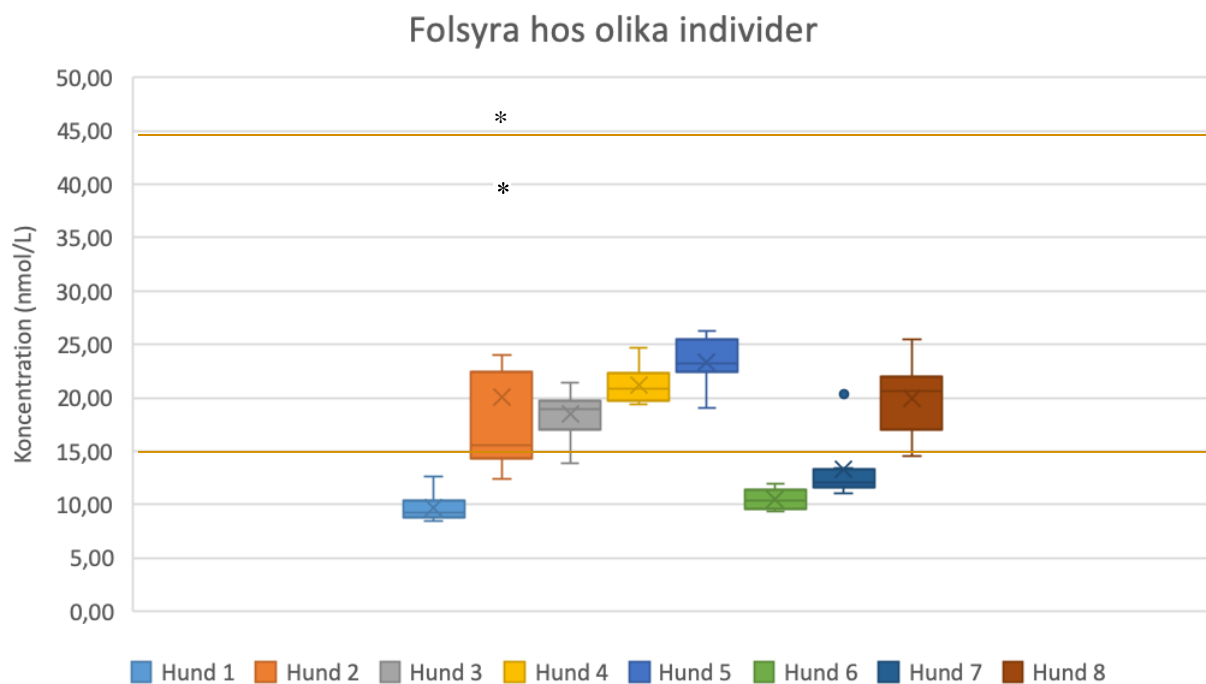
Inga hundar hade diarré vid provtagningstillfället, men hälften av hundarna hade haft GI-störning vid enstaka tillfälle, 1-5 dagar innan provtagningen (se tabell 3). Hos de hundar som haft störningar var det endast ett prov (prov 6, replikat 2 hos hund 3) som avvek. Detta värde var något lägre än jämförande prover från samma hund vid övriga provtagningstillfällen, men då endast ett av de två replikaten var lågt så kopplades det till analysvariation snarare än diarré inför provtagningen. Det replikatet flaggade inte ut som outlier och inkluderades därför i studien.

Flera av hundarna (hund 1, 6 och 7) ligger under referensintervallet vid samtliga provtagningar. Hund 2, 3 och 8 har enstaka värden som understiger och hund 2 har ett värde som överstiger referensintervallet (se figur 2).

Tabell 3. Resultat folsyra från upprepad provtagning av 8 hundar vid 7 olika tillfällen per hund. Värdena anges i nmol/L. Rödmarkerade hade GI-störning 1-5 dagar före provtagningen. Blåmarkerade serumprover hade svag hemolys.

* Outliers

	Hund 1	Hund 2	Hund 3	Hund 4	Hund 5	Hund 6	Hund 7	Hund 8
Prov 1, repl 1	12,50	39,70*	15,60	22,00	21,20	9,54	20,60	16,90
Prov 1, repl 2	12,60	46,00*	18,20	22,50	22,90	9,43	20,40	17,00
Prov 2, repl 1	8,43	24,00	20,80	19,40	19,00	10,40	12,00	15,20
Prov 2, repl 2	8,43	21,90	21,40	20,30	20,00	10,10	11,60	14,50
Prov 3, repl 1	9,25	18,50	18,30	21,10	24,70	9,34	13,30	21,80
Prov 3, repl 2	9,65	17,90	19,10	20,50	23,60	9,52	12,20	20,30
Prov 4, repl 1	8,86	15,30	18,70	22,00	23,10	10,40	11,50	21,30
Prov 4, repl 2	8,47	14,80	19,20	24,70	23,30	9,72	11,60	21,00
Prov 5, repl 1	9,59	14,50	17,10	22,20	25,60	11,00	11,70	23,80
Prov 5, repl 2	9,00	15,90	19,40	23,30	25,40	11,60	12,80	25,50
Prov 6, repl 1	10,70	14,50	16,80	19,80	22,90	11,70	13,40	21,40
Prov 6, repl 2	10,20	13,60	13,90	19,70	22,90	12,00	11,40	22,50
Prov 7, repl 1	9,22	12,60	20,80	19,80	26,30	10,50	11,10	19,10
Prov 7, repl 2	9,29	12,40	19,40	19,50	25,80	11,30	12,80	18,50



Figur 2. Spridningen i folsyrakoncentration för respektive av de 8 hundarna i studien. Medelvärdet markeras med x, medianen med horisontell linje. Övre och undre kvartil markeras med lådans övre och undre kant. Översta och understa kvartil med vertikal linje med det högsta och lägsta värdet i ytterkanterna. Värden som ligger mer än 3 x över eller under kvartilavståndet (dvs längden på lådan) markeras med en färgad punkt. Det existerande referensintervallet som används av Klinisk kemiska laboratoriet markeras med streckade linjer.

* De avvikande värdena på hund 2 räknades som och har därför exkluderats ur beräkningarna.

Beräkningar

I tabell 4 nedan redovisas de beräkningar som utförts i denna studie, samt gällande referensintervall för B12 och folsyra hos Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS.

Tabell 4. Beräkningar utifrån de värden som erhållits från blodprovsanalyser på de 8 friska hundarna i studien. Referensintervall och $CV_{A \text{ hög/låg}}$ som anges är fastställt av Klinisk kemiska laboratoriet och baserat på ett större antal mätningar än de som ingår i studien. $CV_{A \text{ REML}}$ är endast baserat på de 8 hundarna i studien och används inte i några ytterligare beräkningar

	B12	Folsyra
Medelvärde (nmol/L)	433,5	17,1
Referensintervall (Klin.kem, nmol/L)	135-670	15-45
CV_G (%)	26,3	29,8
CV_I (%)	13,2	14,3
$CV_{A, \text{REML}}$ (%)	10,8	4,6
$CV_{A \text{ (hög), Klin.kem.}}$ (%)	7,4	9,5
$CV_{A \text{ (låg), Klin.kem.}}$ (%)	7,6	7,8
CV_{OPT} (%)	<3,3	<3,6
CV_{DES} (%)	<6,6	<7,2
CV_{MIN} (%)	<9,9	<10,7
$RCV_{\text{(hög)}}$ (%)	41,9	47,6
$RCV_{\text{(låg)}}$ (%)	42,2	45,2
$II_{\text{ (hög)}}$	1,7	1,7
$II_{\text{ (låg)}}$	1,7	1,8

CV_G = biologisk variation mellan individer

CV_I = genomsnittlig biologisk variation inom individen

$CV_{A \text{ REML}}$ = analytisk variation, baserat på de 8 hundarna i studien

$CV_{A \text{ hög}}$ = analytisk variation, baserat på laboratoriets redan fastställda värde vid hög koncentration

$CV_{A \text{ låg}}$ = analytisk variation, baserat på laboratoriets redan fastställda värde vid låg koncentration

CV_{OPT} = laboratoriets analytiska mål för optimalt CV_A , baserat på $CV_A < 0,25 * CV_I$

CV_{DES} = laboratoriets analytiska mål för önskvärt CV_A , baserat på $CV_A < 0,5 * CV_I$

CV_{MIN} = laboratoriets analytiska mål för minsta godtagbara CV_A , baserat på $CV_A < 0,75 * CV_I$

RCV = Reference change value, baserat på $2^{0,5} * 1,96 * (CV_A^2 + CV_I^2)^{0,5}$ för bilaterala förändringar

II = Index of Individuality, baserat på $II = CV_G / (CV_A^2 + CV_I^2)^{0,5}$

Utifrån uträknade resultat har både B12 och folsyra en hög individualitet (d.v.s. värdena ligger >1,67) vilket gör att det populationsbaserade referensintervall inte är optimalt för dessa analyser.

DISKUSSION

Då både B12 och folsyra uppvisar en hög individualitet är det populationsbaserade referensintervallet inte optimalt för dessa analyter och RCV bör därför användas. Att tolka RCV har inte varit möjligt tidigare eftersom data från hund saknats, men denna studie möjliggör detta vilket ger bättre möjlighet till diagnostik och monitorering av patienter med rubbningar som rör vitamin B12 och folsyra.

De flesta undersökta biokemiska och hematologiska analyter hos hund har en intermediär individualitet och det blir i de fallen inte lika tydligt att RCV är ett bättre verktyg än referensintervallet. Enstaka analyter, såsom ALAT, ALP och kolesterol för att nämna några, har dock en hög individualitet. B12 och folsyra har inte en lika tydligt hög individualitet som ALAT, ALP och kolesterol. Dessa analyters CV_I är också lägre än CV_I för B12 och folsyra, vilket även ger ett lägre RCV (Harr *et al.*, 2013). Ett lägre RCV är en följd av lägre variation inom individen och lägre analytisk variation.

Vid uträkning av RCV valdes i denna studie att använda laboratoriets CV_A istället för det CV_A som räknades ut utifrån hundarna i studien ($CV_{A(REML)}$), då ett CV_A baserat på fler mätningar över en längre tid ger ett mer representativt värde för klinisk användning än vid en körning vid ett enda tillfälle. För att räkna ut II valdes Freemans formel som kändes mer logisk och gav en bättre förståelse än Frasers formel. Freemans formel är inverterad, vilket innebär att ett högt värde ($>1,67$) ger en hög individualitet och vice versa (Fraser, 2001; Freeman *et al.*, 2017).

Att använda sig av biologisk variation vid fastställande av analytiska mål anses vara av högt kliniskt värde (Kenny *et al.*, 1999). Enligt denna studie uppfyller Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS endast minimikravet för godtagbar analytisk variation för både B12 och folsyra, när kvalitetsmålen baseras på den biologiska variationen. Detta ger en variabilitet på 25 % utöver CV_I , vilket kan behöva tas i beaktande vid analys av patientprover. Enligt en studie av Harr *et al.* (2013) anses kraven baserade på biologisk variation dock för hårt ställda för de flesta av dagens analysmetoder (speciellt för immunologiska analysmetoder) vilket försvårar för laboratorierna att kunna nå upp till dom. Dessa kvalitetsmål bör därför inte användas som riktlinjer för att fastställa adekvat prestanda hos laboratorieutrustningen i dagsläget, men kan bli användbart i framtiden i takt med förbättrade analysmetoder.

Analysen av B12 och folsyra i denna studie baseras på totala nivåer i serum. I arbetet omnämns andra metoder, såsom mätning av homocystein, metylmalonylsyra och nivåer i röda blodkroppar. Vissa av dessa analyser anses enligt studier ha ett mer trovärdigt resultat, men kräver fler studier för säkrare bedömning. Valet att analysera B12 och folsyra i serum i denna studie baseras på att det är en väl beprövad metod för analys av dom båda vitaminerna och som används av flera veterinärmedicinska laboratorier. Analys med Immulite 2000 har enligt en ny studie av McLeish *et al.* (2019) god tillförlitlighet vid analys av B12 och folsyra i serum hos hund och katt. Vidare skiljer sig resultaten åt mellan olika immunoanalyser (ex Immulite 2000, AIA-900 Tosoh Bioscience), vilket kräver specifika referensintervall för varje enskild maskin.

CV_A skiljer sig mellan olika maskiner och ett högre CV_A leder till ett högre RCV. I McLeish *et al.* (2019) studie där Immulite 2000 och AIA-900 jämfördes, hade Immulite 2000 en inom-körningsvariation på 1,8-9,3 % för vitamin B12 och 1,5-9,1 % för folsyra. AIA-900 låg på 1,8-5,2 % för vitamin B12 och 1,5-2,9 % för folsyra (McLeish *et al.*, 2019). I en studie på humansidan där man jämfört flera olika immunoanalytmetoder för mätning av folsyra, låg samtliga inom godtagbar imprecision (<10 %) med undantag för en analysmetod (Elecsys 2010). Immulite 2000 hade här en relativt låg inom-körningsvariation (2,0-4,5 %) i jämförelse med övriga metoder (Owen & Roberts, 2003). Enligt användarmanualen för kvantitativ kompetitiv ELISA (Aviva system biology, San Diego, USA) ligger inom-körningsvariationen för vitamin B12 på <4,3 % för människa (saknas för hund) och för folsyra hos hund på <8 %.

Nyare studier på veterinärsidan rekommenderar att antalet djur vid provtagning för fastställande av biologisk variation ska vara 10-15 individer som provtas under minst 4-6 veckor (Freeman *et al.*, 2017). I denna studie har vi valt att frånga detta, då antalet djur som rekommenderas baseras på hur mycket den undersökta analyten varierar inom ett djur, d.v.s. djuret CV_I för den specifika analyten. Som tidigare nämnt i arbetet så kan man inte veta CV_I om det, som i detta fall, är första gången analyten undersöks. Av praktiska skäl har vi därför valt att minska antalet individer, men istället öka antalet provtagningstillfällen för att följa djuren under en längre tid.

Trots att hundarna i studien ansågs friska, låg de flesta under referensintervallet för folsyra vid något tillfälle och vissa hundar låg under referensintervallet vid samtliga provtagningar. Det aktuella referensintervallet för folsyra vid Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS verkar därmed ligga för högt. Provinsamling för att uppdatera gällande referensintervall har påbörjats.

Då inga hundar hade GI-störningar i direkt anslutning till provtagningen är det svårt att utifrån denna studie uttala sig huruvida störningar i GI-kanalen faktiskt påverkade provtagningen eller ej. Ingen tydlig minskning i nivåer kunde ses, varken av B12 eller folsyra. Då detta är åtta friska hundar med tillfälliga störningar och förmodat normala grundläggande nivåer av de båda vitaminerna, är det inte helt oväntat att nivåerna inte borde påverkas avsevärt.

Hos människa rekommenderas att patienter bör vara fastande vid provtagning av B12 (Siemens, 2018) och folsyra (Siemens, 2017). Enligt en studie om fastetider och provtagning av B12 på humansidan kunde man inte se någon ökning i nivåer om patienten inte hade fastat före provtagning. Istället kunde man se att män riskerade att få lägre nivåer av B12 om de fastat (Orton *et al.*, 2016). Enligt Suchodolski & Steiners (2003) studie på veterinärsidan finns heller inga rekommendationer om att djuret ska ha fastat före provtagning av B12 och folsyra. I denna studie valdes dock att följa användarmanualernas rekommendation om fasta, då det fortfarande saknas relevanta studier som motbevisar behovet av fasta på djursidan samt för att minimera risken för lipemi.

I flera veterinärmedicinska studier har det varit svårt att utläsa huruvida texten baseras på humana studier eller veterinärmedicinska studier, då många författare valt att blanda. Troligen till följd av att det finns en hel del kunskapsluckor på veterinärsidan. Referenserna i denna studie kommer från veterinärmedicinska studier i så stor utsträckning som möjligt och det omnämns i texten om det varit oklarheter vad informationen baserats på. Att några författare

har extrapolerat fakta från humansidan till djursidan måste anses felaktigt då det finns beskrivet att exempelvis den B12-beroende metabolismen skiljer sig mellan arter och därför inte ger samma konsekvenser vid avvikande nivåer. Hos människa ses exempelvis neurologiska symptom vid B12-brist, medan det i dagsläget inte finns beskrivet hos hund (Ruau, 2013). Några författare har trots detta skrivit att B12 och folsyra är bra markörer vid utredning av neurologiska tillstånd, med hänvisning till studier på humansidan (Fyfe *et al.*, 1991; Davenport *et al.*, 1994).

Konklusion

CV_I fastställdes i denna studie till 13,2 % för vitamin B12 respektive 14,3 % för folsyra. CV_G fastställdes till 26,3 % för vitamin B12 respektive 29,8 % för folsyra. Dessa siffror baserades på de 8 friska hundarna i studien. Då både B12 och folsyra har en hög individualitet, rekommenderas att använda RCV istället för populationsbaserat referensintervall där det är möjligt. För detta krävs minst två på varandra följande prover från samma individ, för jämförelse. Dagens djursjukvård går mot en mer preventiv vård med profylaktiska behandlingar och friskvård, där provtagning skulle kunna vara en del i ledet. Att ha kunskap om en individs normala parametrar kan vara av stort värde i händelse av senare sjukdom, exempelvis som en del i argumentet för seniorkontroller.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Vitamin B12 och folsyra (vitamin B9) är två vattenlösliga B-vitaminer med stor betydelse för att upprätthålla flera funktioner i kroppen. Bland annat spelar de en viktig roll för bildandet av vår arvs massa och förnyandet av alla celler i kroppen. Vid olika sjukdomstillstånd i framför allt mag- och tarmkanalen, kan mängden av dessa vitaminer öka eller minska. Hos hund uppstår ofta ökningen eller minskningen av B-vitaminerna till följd av mag- och tarmsjukdomar, varför diarré, kräkningar och buksmärta är vanliga symptom även om de också är orsaken till bristen.

För att ta reda på om det råder brist i kroppen på en hund, kan man ta ut ett blodprov och mäta halten av de båda vitaminerna. Laboratoriemaskinen för det specifika ändamålet analyserar provet och ger ett mått på hur stor mängd av B12 eller folsyra som finns i serum.

Utifrån det mätvärde man fått fram via laboratorieanalysen kan man använda sig av något som kallas populationsbaserat referensintervall. Detta innebär att man tagit blodprov från ett större antal friska hundar och tittat på vilken nivå de allra flesta ligger med just den laboratorieutrustningen som finns på det specifika laboratoriet. Utifrån detta har man skapat ett intervall, inom vilket 95 % av alla friska hundar borde hamna för att klassas som normala i sina halter av respektive B-vitamin.

Det populationsbaserade referensintervallet har kommit att ifrågasättas i samband med att man fastställt hur mycket de olika ämnena man mäter varierar i kroppen. Detta kallas för biologisk variation och kan leda till svårigheter vid tolkning av de provsvar man erhåller, beroende på hur stor den individuella variationen är för just det ämnet. Genom att provta ett antal hundar under flera tillfällen kan man med statistiska analyser räkna ut hur stor variationen är för varje enskilt ämne och därigenom komma fram till om man kan använda sig av det populationsbaserade referensintervallet eller inte.

Om det undersökta ämnets variation är liten hos en individ men stor mellan olika individer, så får det populationsbaserade referensintervallet för vida gränser. Då rekommenderas istället att man använder sig av ”reference change value” (eller RCV), som räknas ut för varje enskilt ämne och används för att få en uppskattning på hur mycket ämnet får variera hos en individ innan en ändring räknas som betydande. Genom att jämföra två prover som man tagit från samma hund, kan man räkna ut den procentuella skillnaden och jämföra den med det RCV som man räknat ut för det specifika ämnet (vilken också anges i procent). Om det procentuella värdet mellan två prov är större än RCV så har man fått en ökning eller minskning som är betydande för bedömningen av hunden.

Den biologiska variationen var tidigare inte undersökt hos B12 och folsyra och det gick därför inte att uttala sig om det populationsbaserade referensintervallet som används i dagsläget var ett bra sätt att bedöma provsvaren eller inte. Därför var syftet med denna studie att undersöka den biologiska variationen hos B12 och folsyra för att kunna ge råd till veterinärer om hur provsvaren bäst tolkas.

Prover för att analysera den biologiska variationen samlades in genom blodprovstagning av åtta friska hundar (av olika ålder, ras och kön) vid sju olika tillfällen per hund. Proverna analyserades vid Klinisk kemiska laboratoriet vid UDS.

Studien visade att både B12 och folsyra hade en så pass liten variation inom en individ att de populationsbaserade referensintervallen riskerar att missa sjuka hundar. Därför rekommenderas att om möjligt använda sig av RCV för att kunna bedöma provsvar med så god säkerhet som möjligt.

REFERENSER

- Afonsky, D. (1954). Folic acid deficiency in the dog. *Science*, 120:803–805.
- Arendt J.F.B. & Nexø, E. (2012). Cobalamin related parameters and disease patterns in patients with increased serum cobalamin levels. *PLOS ONE*, 7:e45979.
- Aviva Systems Biology (2016). *B12 ELISA kit: Datablad OKEH02574*. San Diego, USA.
- Aviva Systems Biology (2016). *Folic acid ELISA kit (canine): Datablad OKCA00251*. San Diego, USA.
- Banerjee, R. & Ragsdale S.W. (2003). The many faces of vitamin B12: Catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 72:209-247.
- Batt, R.M. & Morgan, J.O. (1982). Role of serum folate and vitamin B12 concentrations in the differentiation of small intestinal abnormalities in the dog. *Research in Veterinary Science*, 32:17-22.
- Berghoff, N., Suchodolski, J.S. & Steiner, J.M. (2011). Association between serum cobalamin and methylmalonic acid concentrations in dogs. *The Veterinary Journal*, 191:306-311.
- Combs, G.F. & McClung, J.P. (2017). *The vitamins, fundamental aspects in nutrition and health*. 5 ed. London: Academic Press.
- Davenport, D.J. Ching, R.J., Hunt, J.H., Bruyette, D.S. & Gross, K.L. (1994). The effect of dietary levels of folate and cobalamin on the serum concentration of folate and cobalamin in the dog. *The Journal of Nutrition*, 124:2559.
- Dossin, O. (2011). Laboratory tests for diagnosis of gastrointestinal and pancreatic diseases. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26:86-97.
- Fraser, C.G. & Harris, E.K. (1989). Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 27:409-437.
- Fraser, C.G., Petersen, P.H., Libeer, J. C. & Ricos, C. (1997). Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Annals of Clinical Biochemistry*, 34:8-12.
- Fraser, C.G. (2001). *Biological variation: from principles to practice*. Washington, DC: AACC Press.
- Freeman, K.P., Baral, R.M., Dhand, N.K., Nielsen, S.S. & Jensen, A.L. (2017). Recommendations for designing and conducting veterinary clinical pathology biologic variation studies. *Veterinary Clinical Pathology*, 46:211-220.
- Fyfe, J.C. Giger, U., Hall, C., Jezyk, P. F., Klumpp, S. A., Levine, J. S. & Patterson, D. F. (1991). Inherited selective intestinal cobalamin malabsorption and cobalamin deficiency in dogs. *Pediatric Research*, 39:24-31.
- Gołyński, M., Lutnicki, K., Krumrych, W., Szczepanik, M., Gołyńska, M., Wilkołek, P., Adamek, Ł., Sitkowski, Ł. & Kurek, Ł. (2017). Relationship between total homocysteine, folic acid, and thyroid hormones in hypothyroid dogs. *Journal of Veterinary Medicine*, 31:5.
- Hanisch, F., Toresson, L. & Spillmann, T. (2018). Cobalamin deficiency in dogs and cats. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 46:309.
- Harr, K.E., Flatland, B., Nabity, M. & Freeman, K.P. (2013). ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. *Veterinary Clinical Pathology*, 42:424-436.

- Heilmann, R.M., Grützner, N., Iazbik, M.C., Lopes, R., Bridges, C.S., Suchodolski, J.S., Couto, C.G. & Steiner, J.M. (2017). Hyperhomocysteinemia in Greyhounds and its association with hypofolatemia and other clinicopathologic variables. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31:109–116.
- Institute of Medicine (US) Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes and its Panel on Folate, Other B Vitamins, and Choline (1998). *Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B₆, folate, vitamin B₁₂, pantothenic acid, biotin, and choline*. Washington, DC: National Academy Press.
- Kalender, H., Beceriklisoy, H.B., Kanca, H., Findik, M., Erünal-Maral, N., Handler, J. & Aslan, S. (2006). Plasma concentrations of folic acid, vitamin B12 and progesterone of cyclic bitches, bitches during pregnancy and induced abortion and bitches with pyometra. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 113:341-344.
- Lindenbaum, J., Healton, E.B., Savage, D.G., Brust, J.C., Garrett, T.J., Podell, E.R., Marcell, P.D., Stabler, S.P. & Allen, R.H. (1988). Neuropsychiatric disorders caused by cobalamin deficiency in the absence of anemia or macrocytosis. *The New England Journal of Medicine*, 318:1720–1728.
- Lutz, S., Sewell, A.C., Bigler, B., Riond, B., Reusch, C.E. & Kook, P.H. (2012). Serum cobalamin, urine methylmalonic acid, and plasma total homocysteine concentrations in Border collies and dogs of other breeds. *American Journal of Veterinary Research*, 73:1194-1199.
- Marcoullis, G., Rothenberg, P. & Labombardi, J. (1980). Preparation and characterization of proteins in the alimentary tract of the dog which bind cobalamin and intrinsic factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 1:9.
- McLeish, S.A., Burt, K. & Pappasoulotis, K. (2019). Analytical quality assessment and method comparison of immunoassays for the measurement of serum cobalamin and folate in dogs and cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31:164–174.
- Orton, D.J., Naugler, C. & Sadrzadeh, S.M. (2016). Fasting time and vitamin B12 levels in a community-based population. *Clinica Chimica Acta*, 458:129-132.
- Owen, W.E. & Roberts, W.L. (2003). Comparison of five automated serum and whole blood folate assays. *American Journal of Clinical Pathology*, 120:121–126.
- Ricós, C., Cava, F., García-Lario, J.V., Hernández, A., Iglesias, N., Jiménez, C.V., Minchinela, J., Perich, C., Simón, M., Domenech, M.V. & Álvarez, V. (2004). The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 64:175-184
- Ruau, C.G. (2013). Cobalamin in companion animals: diagnostic marker, deficiency states and therapeutic implications. *The Veterinary Journal*, 196:145-152.
- Seetharam, B. (1999). Receptor-mediated endocytosis of cobalamin (vitamin B₁₂). *Annual Review of Nutrition*, 19:173–195.
- Siemens. (2017). *Immulate 2000: Användarmanual, folic acid PIL2KFO-27*. München, Tyskland.
- Siemens. (2018). *Immulate 2000: Användarmanual, vit B12 PIL2KVB-31*. München, Tyskland.
- Soetart, N., Rochel, D., Drut, A. & Jaillardon, L. (2019). Serum cobalamin and folate as prognostic factors in canine exocrine pancreatic insufficiency: An observational cohort study of 299 dogs. *The Veterinary Journal*, 243:15-20.

- Solomon, L.R. (2007). Disorders of cobalamin (Vitamin B12) metabolism: Emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Reviews*, 21:113–130.
- Stabler S.P., Lindenbaum, J. & Allen, R.H. (1996). The use of homocysteine and other metabolites in the specific diagnosis of vitamin B12 deficiency. *The Journal of Nutrition*. 126:1266–1272.
- Stanley, E., Appleman, E., Schlag, A. & Siegel, A. (2019). Relationship between cobalamin and folate deficiencies and anemia in dogs. *The Journal of Veterinary Internal Medicine*. 33:106–113.
- Suchodolski, J.S. & Steiner J.M. (2003). Laboratory assessment of gastrointestinal function. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 18:203-210.
- Thomson, M.S. (2018). *Small animal medical differential diagnosis*. 3. ed. Saint Louis: Elsevier.
- Toresson. L., Steiner, J.M., Spodsberg, E., Olmedal, G., Suchodolski, J.S., Lidbury, J.A. & Spillmann. T. (2019). Effects of oral versus parenteral cobalamin supplementation on methylmalonic acid and homocysteine concentrations in dogs with chronic enteropathies and low cobalamin concentrations. *The Veterinary Journal*, 243:8-14.
- Trehy, M. R., German, A.J., Silvestrini, P., Serrano, G. & Batchelor, D.J. (2014). Hypercobalaminaemia is associated with hepatic and neoplastic disease in cats: a cross sectional study. *BMC Veterinary Research*, 10:175.
- Wagner, C. (1996). Symposium on the subcellular compartmentation of folate metabolism. *The Journal of Nutrition*, 126:1228–1234.
- Walton, R.M. (2012). Subject-based reference values: biological variation, individuality, and reference change values. *Veterinary Clinical Pathology*, 41:175-181.