

Apport du dosage de la vitamine B12 sérique dans le diagnostic d'une carence vitaminique.

N. BRAHAM-JMILI¹

A. LTAIEF²

H. OMRI³

H. GHORBEL⁴

T. MAHJOUB¹

Y. BRAHAM⁴

F. BAHRI²

A. HEDHILI⁴

M. KORTAS¹

Résumé : La vitamine B12 appartient à la famille des cobalamines et constitue un cofacteur pour la conversion enzymatique de nombreuses voies métaboliques notamment celles intervenant dans la synthèse de l'ADN. Les conséquences d'une carence vitaminique sont diverses essentiellement hématologiques et neurologiques. L'anémie macrocytaire constitue le principal désordre lié à une carence en vitamine B12. Néanmoins, la carence en vitamine B12 est fréquente chez le sujet âgé présentant des complications neuropsychiques avec ou sans anémie macrocytaire souvent tardive. Notre étude a porté sur 35 patients âgés de 21 à 81 ans, repartis en 29 hommes et 6 femmes et présentant des signes cliniques et/ou biologiques de carence en vitamine B12. Dans un premier temps, nous avons réalisé le dosage de la vitamine B12 par la méthode immuno-enzymatique (MEIA Abbott). Les valeurs trouvées ont été classées selon les normes du fabricant en 4 catégories ; basse, plage indéterminée, normale et élevée. Dans un second temps l'évaluation de la concordance avec les données cliniques et les signes d'évolution ont permis d'améliorer la classification des patients et de calculer l'indice Kappa qui a montré un accord de classement satisfaisant.

Mots clés : vitamine B12, sérum, anémie, macrocytose.

Summary : Vitamin B12 belong a group of cobalamins. It's known to be an enzymatic cofactor of many metabolic reactions essentially in the synthesis of DNA. Damage of deficiency are various essentially hematologic and neurologic. Macrocytic anaemia constitute the main disorder of vitamin B12 deficiency. However, Vitamin B12 deficiency is common in the elderly with neuropsychiatric disorders whether macrocytic anaemia is present or not as its development may come later. In a study we investigates 35 patients aged of 21 to 81 years (29men, 06 women) with symptoms of vitamin B12 deficiency. First, vitamin B12 serum were measured by immuno enzymatic method (MEIA Abbott). Values were classified among 4 categories characterised on manufacture norms: low, unspecified, normal and high. Secondly, the concordance between Vitamin B12 serum, clinical history and evolution were evaluated. The Kappa index established showed a satisfactory result.

Key words : Vitamin B12, Serum, anaemia, macrocytosis.

¹ Laboratoire d'Hématologie

² Service de Médecine Interne et Maladies Infectieuses

³ Service d'Hématologie Clinique
CHU Farhat Hached Sousse

⁴ Laboratoire de Toxicologie
CAMU - Tunis

Introduction

La vitamine B12 existe sous différentes formes : les cobalamines. Le terme cobalamine regroupe plusieurs substances qui ont en commun une structure tetrapyrrolique(Figure1), chaque pyrrole étant coordonné par son

azote à un atome de cobalt (Co) d'où le nom de corrinoïdes (1). Les corrinoïdes sont un terme générique qui regroupe les cobalamines (2) et les analogues des cobalamines qui sont des composés inactifs mais présents en grande quantité dans les aliments et dans l'organisme (1).

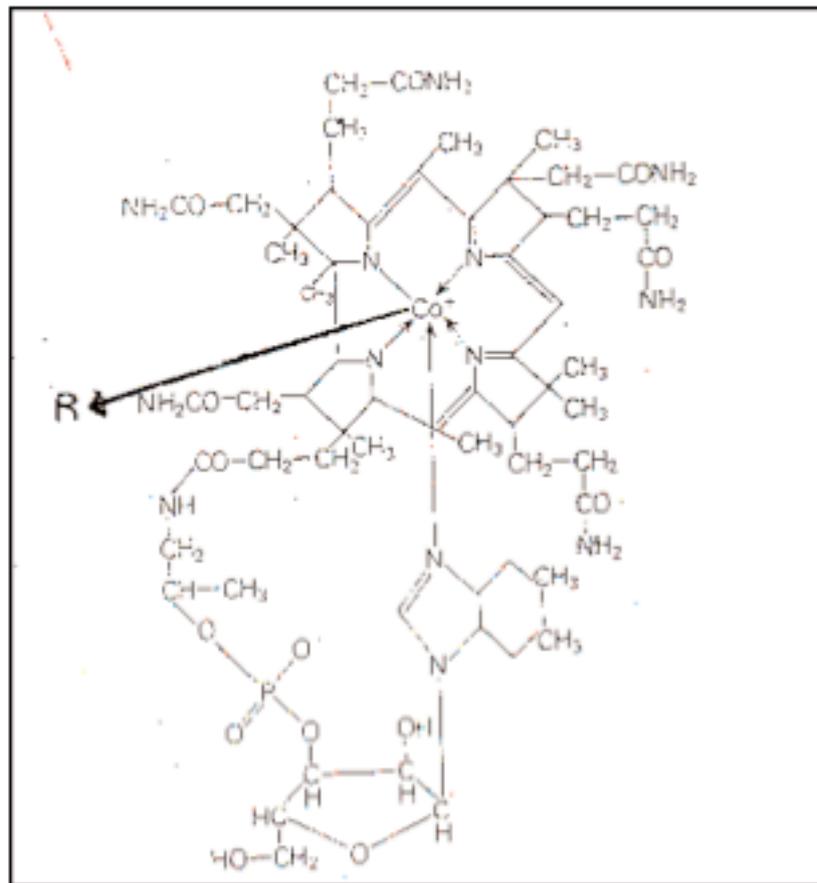


Fig. 1 : Structure des cobalamines (Cbl), R =
 CN : Cyanocobalamine;
 OH : Hydroxocobalamine;
 CH₃ : Méthyl cobalamine
 5 déoxyadénosyl : 5 déoxyadénosyl cobalamine ;
 Absence de la partie nucléotidique : cobinamide;
 5,6 diméthyl-benzimidazol remplacé par adénine : Combamide

La vitamine B12 est active à de très faibles doses (3), elle intervient comme coenzyme indispensable au déroulement de nombreuses réactions enzymatiques (Figure 2) :

- Synthèse de la méthionine à partir d'homocystéine
- Conversion du propionyl Co A à partir de méthyl malonate
- Synthèse cellulaire d'ADN, notamment au niveau médullaire

- Catabolisme de l'histidine en acide forminoglutamique puis en acide glutamique.

Les multiples actions métaboliques de la vitamine B12 expliquent que les conséquences de la carence soient diverses essentiellement hématologiques et neurologiques(3,4,5).

La carence en vitamine B12 se manifeste dans son expression typique par une anémie macrocytaire normochrome

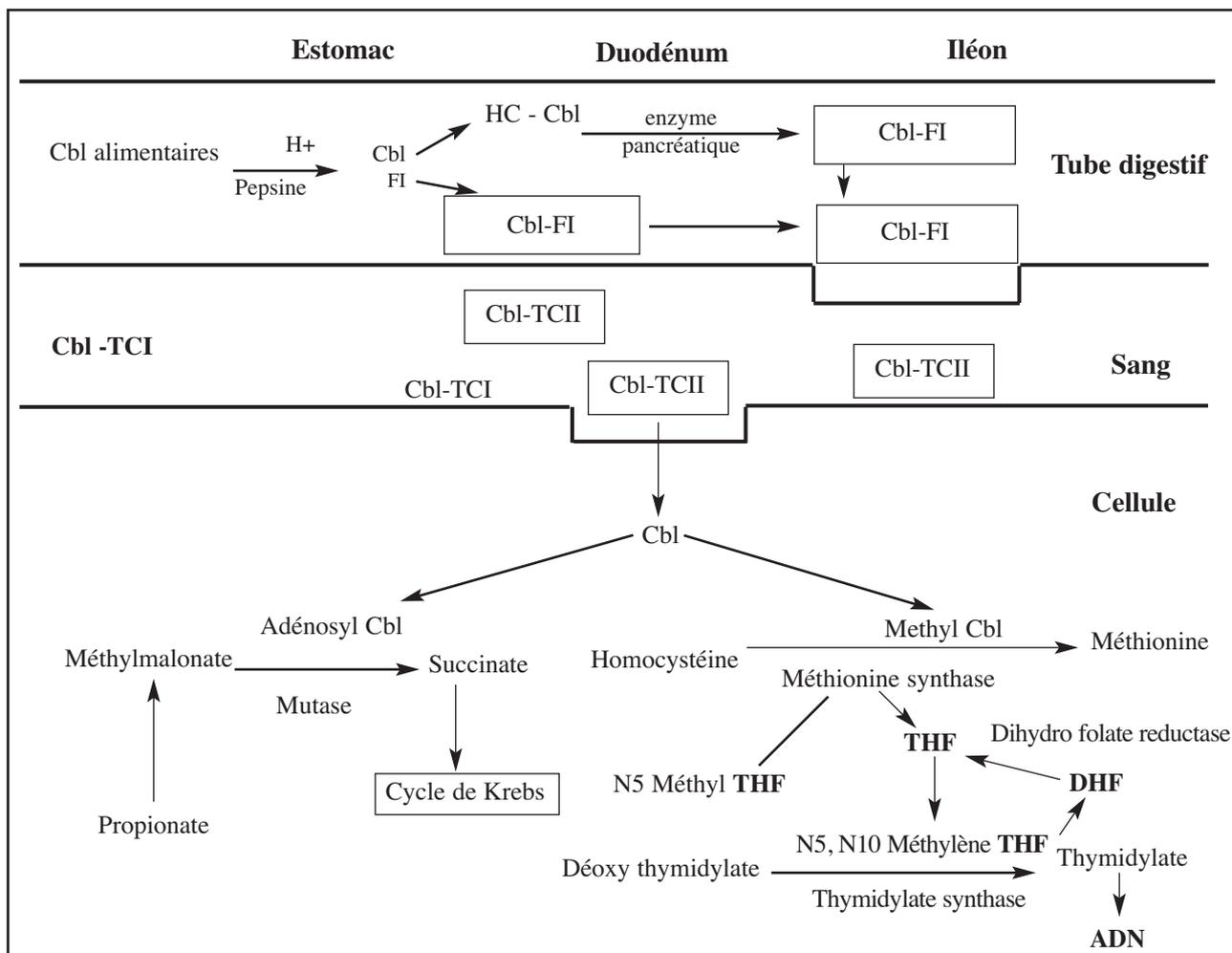


Figure 2 : Métabolisme des cobalamines

HC : Haptocorrines ; FI : Facteur intrinsèque ; TC : Transcobalamine ; Cbl : Cobalamines

arégénérative. Le volume globulaire moyen est supérieur à 100 fl pouvant atteindre jusqu'à 140 fl. Le taux de réticulocytes est relativement bas, n'excédant pas 50 10⁹ /litre. Sur le frottis sanguin, les anomalies morphologiques des hématies sont multiples (6,7). D'autres anomalies hématologiques peuvent être observées : une leucopénie, une thrombopénie et même une pancytopénie. D'où l'intérêt du dosage de la vitamine B12 sérique devant toute anémie macrocytaire arégénérative car les étiologies sont nombreuses (7,8).

Néanmoins, la carence en vitamine B12 est fréquente chez les sujets âgés (4,9). La recherche de cette carence doit faire partie du bilan étiologique de toute affection susceptible de traduire une carence vitaminique essentiellement les complications neuro-psychiques avec ou

sans anémie macrocytaire souvent tardive (4,10).

Bien que initiées depuis 1955, les méthodes dosant directement la vitamine B 12 sont encore peu nombreuses (méthodes chromatographiques (11,12), méthodes immunologiques (13,14,15) et présentent certaines limites. En effet, vu la complexité de la molécule de vitamine B12, la majorité des méthodes de dosage sont spectrales et se basent sur l'analyse de l'élément minéral : le cobalt (16,17,18). Notons que peu de techniques sont disponibles en biologie pour le dosage de la vitamine B12 (19) et que seules les méthodes immunologiques sont satisfaisantes (20). Ces dernières techniques sont très coûteuses et peu disponibles, en plus les normes varient d'une technique à une autre (21).

Le but de notre travail est de valider la concordance des

résultats du dosage de la vitamine B12 sérique obtenus par la méthode immuno enzymatique micro particulaire avec les signes clinicobiologiques d'une carence vitaminique et donc optimiser la qualité des résultats obtenus.

Matériels et méthodes

Dosage immunologique de la vitamine B12

Le dosage immunologique de la vitamine B12 sérique est réalisé à l'aide d'un coffret Réactif Abbott (IMx B12) sur automate Immuno Analyseur IMX type Abbott utilisant la méthode immuno enzymatique microparticulaire (MEIA). Cette technique utilise comme phase solide des microparticules recouvertes de facteur intrinsèque (de 0,5 micron de diamètre), ce qui offre une surface de contact 6000 à 10000 fois supérieure à celle des supports classiques.

Cette méthode est dotée de caractéristiques suivantes :

- Les réactions sont accélérées et les temps d'incubation sont considérablement raccourcis,
- Après formation des complexes antigène - anticorps à la surface des microparticules on pratique un lavage automatique qui conduit les résidus d'échantillon et le conjugué non lié au delà de la zone de détection.

Patients

- Echantillons :

Les prélèvements étudiés proviennent de 35 patients âgés de 21 à 81 ans et répartis en 29 hommes et 6 femmes. Tous ces patients présentent des signes de carence en vitamine B12 avec ou sans anémie macrocytaire .

- Fiches cliniques :

Chacun des prélèvements était accompagné d'une fiche clinique comportant les renseignements suivants :

- l'identification du patient
- les signes cliniques
- l'examen biologique «standard» (numération sanguine)
- le diagnostic suspecté ou retenu
- les traitements en cours
- Dossiers cliniques

L'analyse plus approfondie du dossier clinique de chaque patient a été faite dans une troisième étape à la recherche des autres syndromes liés à la carence dans le

but d'améliorer le classement des malades.

Analyse statistique

La concordance des classements des patients a été analysée à l'aide du coefficient Kappa (21). Les résultats obtenus à partir des 35 cas de carences suspectés ont été en premier temps classés selon les normes proposées par le fabricant : basse, plage indéterminée, normale et élevée. Ensuite un jugement a été établi en tenant compte des fiches cliniques de l'analyse des dossiers cliniques et essentiellement de la réponse au traitement à la vitamine B12.

Le test Kappa permet de quantifier l'accord entre les différents jugements tout en tenant compte du fait qu'un classement aléatoire peut aboutir à un certain nombre de concordances. la concordance observée P_o , mesurée par la proportion des appréciations équivalentes est confrontée selon l'hypothèse d'indépendance entre les juges, à la concordance «attendue» P_c , qui correspondait à un jugement au hasard.

L'indice K est par définition égal à : $P_o - P_c / 1 - P_c$

Lorsque la concordance est maximale, la proportion des appréciations équivalentes P_o est de 100% et K est égale à 1.

L'indice K est bas (<0,40) lorsque la concordance est faible (le hasard et les cotations sont proches). Il est élevée (> 0,75) lorsque les classements des «juges» sont proches les uns des autres.

Résultats

Classement des patients en fonction des normes du fabricant

Les résultats obtenus à partir des 35 cas de carences suspectées ont été en premier temps classés selon les normes proposées par le fabricant :

- Basse (B) : Vit B12 < 179 pg /ml → 03 cas
- Plage indéterminée : 179 < Vit B12 < 223pg /ml → 04 cas
- Normale (N) : 223 < Vit B12 < 1132 pg /ml → 11 cas.
- Elevée (E) : Vit B12 > 1132 pg / ml → 17 cas.

Examen des fiches cliniques

La lecture des fiches cliniques à l'issue des dosages a permis la classification des patients en 2 catégories (Tableau I) :

- Patients ayant une anémie macrocytaire arégénérative

Tableau I : Analyse des fiches cliniques des 35 patients

Patients	Classement en fonction des normes du fabricant	Examen des fiches cliniques
Médecine interne (6)	B : 2 cas N : 3 cas E : 1 cas	- Anémie macrocytaire : 5 cas - Polyneuropathie sans anémie : 1 cas (Hb = 13,9 g/dl, VGM = 90 fl)
Hématologie (13)	B : 1 cas N : 4 cas E : 8 cas	Anémie macrocytaire : 13 cas
Neurologie (16)	PI : 4 cas N : 4 cas E : 8 cas	Personnes âgées ayant des complications neuropsychiques sans anémie 16cas

B : basse, PI : plage indéterminée, N : normale, E : élevée

(18/35 des sérums testés), d'âge moyen 38 ans. Le tableau hématologique est caractérisé par une anémie (Hémoglobine : 4 à 8,3 g/dl), macrocytaire (VGM : 105 à 130 fl), arégénérative (Réticulocytes : 14 200 à 60 400 /mm³). La thrombopénie est constante (Plaquettes : 41 000 à 114 000 /mm³). Le taux de leucocytes varie de 1 300 à 13 400 /mm³. Une leucopénie est observée dans 13 cas.

- Patients âgés présentant des complications neuropsychiques sans anémie, d'âge moyen 64 ans (17/35 des sérums testés).

Discussions

Dans le but d'optimiser la qualité de nos résultats nous étions ramenés à revoir les dossiers cliniques des patients étudiés à la recherche d'autres éléments diagnostiques ainsi que les signes d'évolution. En effet, les anémies mégaloblastiques sont fréquemment diagnostiquées en Tunisie et constituent une cause habituelle des anémies macrocytaires arégénératives. En l'absence des dosages vitaminiques en routine, le diagnostic des carences est essentiellement hématologique et une ponction de moelle est inévitable pour poser le diagnostic qui sera confirmé ou exclu par le test thérapeutique et l'évolution de l'état du malade sous traitement vitaminique.

Analyse plus approfondie du dossier clinique

L'analyse plus approfondie de leurs dossiers cliniques a révélé la présence des autres syndromes liés à la carence (3)

Syndrome anémique

Il s'agit dans la majorité des cas d'une pancytopenie évoluant dans 8 cas sur 18 dans un contexte infectieux (bronchopneumopathie chronique, erysipèle, abcès, tuberculose,...).

A l'examen clinique le patient est dyspnéique, pâle, ne présentant ni splénomégalie, ni adénopathies dans 17 cas sur 18 avec fréquemment une dyspnée d'effort et tachycardie. On note la présence d'un syndrome hémorragique dans 12 cas sur 18 (purpura pétéchial diffus, épistaxis, gingivorragie et échy-mose).

Un premier myélogramme réalisé lors de l'admission des patients anémiques a évoqué le diagnostic d'une anémie mégaloblastique dans 7 des 18 cas en montrant une moelle riche avec différentes anomalies cytologiques sur toutes les lignées notamment sur la lignée érythroblastique. On note une érythroblastose, des signes de mégaloblastose avec asynchronisme de maturation nucléocytoplasmique. Les précurseurs érythroblastiques montrent fréquemment des images mitotiques. Les autres lignées sont aussi affectées : augmentation franche de la

taille des myélocytes et surtout des métamyélocytes qui présentent des noyaux en "fer à cheval", des mégacaryocytes qui sont nombreux et hypersegmentés. L'examen des frottis de sang dans tous ces cas a montré à part la macrocytose franche, des polynucléaires neutrophiles hypersegmentés.

Dans 11 cas le myélogramme est non concluant montrant une lignée érythroblastique légèrement mégalo-blastique. En effet il s'agit dans 4 cas de sujets supplémentés et/ou transfusés avant d'être adressés à l'hématologue rendant ainsi le dosage inutile. Dans ces cas le myélogramme montre des formes à expression hématologique atténuée dues aux traitements vitaminiques déjà instaurés ; il s'agit d'un aspect mégalo-blastoïde tout en notant toujours la présence de myélocytes de grande taille et des métamyélocytes qui présentent des noyaux en "fer à cheval" avec des mégacaryocytes qui sont nombreux et hypersegmentés.

A part la cytologie médullaire, l'étude du caryotype sur moëlle osseuse a été effectuée chez 4 patients anémiques et a montré la présence d'un clone pathologique avec délétion interstitielle du bras long du chromosome 5 : del (q 22,q13) chez un patient. Cette anomalie cytogénétique est présente dans environ 70% des anémies réfractaires et 30% des anémies sidéroblastiques acquises idiopathiques (ASIA).

Syndrome digestif

Une fibroscopie digestive demandée systématiquement avec parfois biopsie et examen anatomopathologique, a objectivé une gastrite atrophique dans 6 cas.

Syndrome neurologique

La carence en vitamine B12 est fréquente chez le sujet âgé, souvent sous-estimée ou méconnue et découverte au stade tardif de l'anémie macrocytaire (4). Il est important de connaître les particularités gériatriques des causes des carences en vitamine B12 chez le sujet âgé, au premier rang desquelles on trouve les malabsorptions vitaminiques (22,23,24). La détermination des taux sériques de vitamine B12 dans une population de sujets âgés de plus de 50 ans, a révélé environ 5% de valeurs basses (9).

Les relations potentielles entre les complications neuro-

psychiques d'origine dégénérative et les maladies cérébro ou cardio-vasculaires renforcent actuellement l'intérêt de l'étude de la vitamine B12 chez le sujet âgé (4). C'est la raison pour laquelle nous proposons dans notre étude de déterminer le statut en vitamine B12 chez 18 patients âgés présentant une symptomatologie neurologique.

Les résultats obtenus ont montré 9 sérums à concentrations très élevées en vitamine B12, ce qui a nécessité des dilutions avec une solution de tampon borate et un stabilisant des protéines (albumine humaine). La revue des dossiers cliniques de ce groupe hyper vitaminique a révélé que ces sujets ont été supplémentés avant d'être adressés au neurologue.

Le taux de vitamine B12 a été légèrement abaissé dans 4 cas. S'agit-il d'un début de malabsorption qui prépare une traduction hématologique ? En sachant que dans la majorité des cas une atteinte hématologique : anémie ou macrocytose est absente chez les sujets âgés carencés en vitamine B12 (4,25,26,27). Pour confirmer ceci il est indispensable d'effectuer une enquête nutritionnelle et un bilan biologique minimal à la recherche d'une malabsorption associée (albuminémie, folates sériques, calcémie, fer sérique, cholestérolémie, temps de prothrombine) (4,23).

La combinaison des signes hématologiques et neuropsychiques est observée dans 2 cas. En effet parmi les sujets anémiques, un patient âgé de 71 ans a présenté des antécédents de troubles neuropsychiques nécessitant un traitement par Libruim(R) et un 2^{ème} patient, âgé de 81 ans a présenté une polyneuropathie périphérique avec hyposthésie plantaire.

Dans le but d'améliorer la classification des patients nous proposons de définir de nouveaux seuils discriminatifs pour cette population particulière de personnes âgées (22).

Signes clinico biologiques d'évolution

Tous les sujets présentant une anémie macrocytaire, ont suivi une épreuve thérapeutique à la vitamine B12 qui consiste à administrer l'hydroxocobalamine par voie intramusculaire à la dose de 100 µg/j durant 3 jours. Si une amélioration hématologique est notée à j3, on augmente la dose à 1000 µg/j pendant 7 à 8 j puis une injection x

2 par semaine pendant 3 mois et un traitement à vie à la posologie d'une injection mensuelle. En cas de non réponse à j3, on continue à administrer la vitamine B12 pendant une semaine à la dose de 100 µg/j. Si l'anémie reste réfractaire à la vitamine B12, on passe à l'épreuve à l'acide folique.

Des fiches d'évolution ont été établies au Laboratoire pour la surveillance de l'observance du traitement à la vitamine B12 et aux folates par l'évaluation des paramètres hématologiques (GR, Hb, réticulocytes, VGM, HCT, GB et plaquettes); au début, chaque 24H puis chaque 48H.

On a noté une réponse hématologique dans 6 cas des sujets anémiques ; On observe une crise réticulocytaire de 11% à 27,6% à J6 du traitement et une nette amélioration des signes cliniques liés au syndrome anémique. L'amélioration sous traitement permet de confirmer sans équivoque le diagnostic d'une carence vitaminique en cas de macrocytose (27)

Une 2^{ème} ponction médullaire a été effectuée pour les malades ne répondant ni au traitement à la vitamine B12 ni au folate, avec une coloration de PERLS sur frottis médullaire pour la détermination du score sidéroblastique qui a révélé une sidérose importante avec présence de nombreux sidéroblastes en couronne chez un patient pour lequel nous retenons le diagnostic d'une ASIA.

Une biopsie ostéomédullaire a été effectuée chez un patient dont l'état s'est aggravé dans les mois suivants avec accentuation des signes de l'insuffisance médullaire et qui a permis de poser le diagnostic d'une myélofibrose (Tableau II).

Etude de la concordance de classement

Il y a cohérence des résultats de la vitamine B 12 sérique avec les signes clinico-biologiques d'une carence pour 32 patients sur les 35. En effet, la technique MEIA déclare carencés 3 patients parmi les 6 présentant une anémie mégalo-blastique révélée à l'examen de moelle osseuse et confirmée par l'épreuve thérapeutique et l'évolution sous vitamine B12. Le Tableau II présente les signes d'évolution des différents patients et leur classement.

Les données issues des fiches cliniques et biologiques sont reprises à l'aide d'une fiche d'encodage comportant pour chaque patient :

- La classification selon les normes du fabricant
- Les signes clinico-biologiques et la réponse au traitement à la vitamine B12.

Les résultats statistiques montrent un accord de classement satisfaisant : Coefficient KAPPA = 0,875

Plusieurs séries ont illustré les difficultés à diagnostiquer ou à exclure une carence en vitamine B12 à partir du seul dosage de la vitamine B 12 sérique (26,28,29,30) et préconisent de faire appel à d'autres marqueurs, l'holotranscobalamine (18) ou les métabolites intermédiaires de la vitamine B12 ; l'acide méthylmalonique et l'homocystine (29,30).

Conclusion

Le dosage de la vitamine B12 sérique est demandé à des fins diagnostiques ou épidémiologiques dans de très nombreuses circonstances cliniques notamment pour :

- le diagnostic étiologique des anémies
- les sujets âgés présentant des signes de carence avec ou sans anémie souvent tardive

En conclusion, cette étude a montré 2 faits :

- qu'il est important lors de l'introduction d'un dosage de la vitamine B12 dans un laboratoire, d'utiliser dans un premier temps les normes du fabricant puis de constituer ses propres normes en déterminant de nouveaux seuils de discrimination suivant le type de population étudiée.
- qu'il est indispensable que le biologiste connaisse l'indication clinique de chaque demande d'analyse car s'il peut détecter aisément les erreurs évidentes de dosage, il ne peut pas valider la cohérence de ses résultats avec la pathologie recherchée si les prélèvements arrivent sans informations ou avec une information incomplète.

Remerciements

Les auteurs expriment leur gratitude au professeur GHANNEM H. (Service d'Epidémiologie, CHU Farhat Hached-Sousse) qui a bien voulu assurer le traitement

Tableau II : Etude de la concordance de classement des 35 patients avec les données clinicobiologiques et les signes d'évolution / vitamine B12 sérique

Vitamine B12 sérique	Basse	Plage indéterminée	Normale	Elevée
Nombre de patients	3	4	11	17
Analyse du dossier clinique	<ul style="list-style-type: none"> • Anémie mégaloblastique (3cas) - MY : Mégaloblastose - SG : PNN hypersegmenté - PERLS : répartition normale du fer - Fibroscopie : gastrite atrophique (3 cas) 	<ul style="list-style-type: none"> • Signes de malabsorption 6/19 parmi les sujets non anémiques. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mégaloblastose de degré variable - Anémie mégaloblastique (4 cas) - Anémie sidéroblastique (1 cas) - Myélofibrose:1 cas - Cirrhose : 1 cas • Autres étiologies neurologiques : 4 /17cas 	<ul style="list-style-type: none"> • MY : discrète mégaloblastose (4 cas) • Informations incomplètes (4 cas) • Prélèvement fait après traitement : 13 cas
Test thérapeutique et évolution sous Vitamine B12	- TT positif avec évolution favorable sous vitamine B12 (3 cas)		TT positif (5 cas) - avec évolution favorable : 3 cas/Anémie mégaloblastique - avec amélioration de l'anémie mais macrocytose persistante : 1cas /SMD - puis l'anémie devient retractive au traitement : (2 cas) TT positif / folate (1cas)	Correction de l'anémie : 4 cas
Confirmation du diagnostic d'une carence en Vitamine B12	3 cas	-	3 cas	4 cas
Indice de Kappa	0,875			

MY : Myélogramme , TT : Test thérapeutique , SG : Examen de frottis de sang .

statistique des résultats.

Références

1- HERBERT V. vitamin B12 : plant sources,requirement, and assay. Am J Clin Nutr 1988 ; 48 : 852-858.

2- LOBINSKY R., POTIN-GAUTIER M. Metals and bio-molecules-bioinorganic analytical chemistry. Analisis magazine 1998 ; 26(6) : 22-24.

3- GUEANT JL., LAMBERT D., SCHOHN H.Cobalamins. Editions techniques-Encyc.Méd.Chir. (Paris-France), Hématologie 3-001-D-10, 1993, 4p.

4- PAUTAS E., CHERIN P., DE JAEGER C., GODEAU P. Carence en vitamine B12 chez le sujet âgé.La Presse Med 1999 ;(32): 1767-70.

5- ZITTOUN J.Les anémies par carences en folates ou en vitamine B12. Le médecin biopathologiste 1995 ; (34) : 15-21.

6- ALJABI D., HAMBERGER C.,SUSSINI ET LUCIA H. Folates et vitamine B12. Rubrique de l'interne : option/Bio 1997 ; 79 : 49-55.

7- CASASSUS P. Macrocytic anæmia in adult, Physiopathology, etiologie, diagnosis and treatment .Rev Prat. 1995 ; 1- 45(1):101-6.

8- LARIZZA P., MARTELLI M.F., GRIGNANI F. Diagnostic des maladies du sang , (Piccin). 1990 : 5-26.

9- HERBERT V. Dont ignore low serum cobalamin (vitamin B12) levels. Arch intern Med 1988 ; 148 : 1705-1707.

10- AGUIRRE ERRASTI C.,BARREIRO GARCIA G., CANOVAS FERNANDEZ A., ALONSO J. Study of cobalamin deficiency in gastrectomized and aged subjects Rev.Clin. Espe. 2001 ; 201(2) : 75-80.

Apport du dosage de la vitamine B12 sérique dans le diagnostic d'une carence vitaminique

- 11-** ASTIER A., BAUD F. Simultaneous determination of hydroxocobalamin and its cyanide complex cyanocobalamin and its cyanide complex cyanocobalamin in human plasma by high-chromatography application to pharmacokinetic studies after high-dose hydroxocobalamin as an antidote for severe cyanide poisoning. *J. Chromatogr.B* 1995 ; 667 : 129-135.
- 12-** VINAS P., CAMPILLO N., LOPEZ GARCIA I., CORDOBA HERNANDEZ CM. Speciation of vitamin B12 analogues by liquid chromatography with flame atomic absorption spectrometric detection. *Anal Chim Acta* 1996 ; 318(3) : 319-325.
- 1** - **3**
ARNAUD J., COTISSON A., MEFFRE G., BOURGEAY-USSE M. Comparison of three commercial kits and a microbiological assay for the determination of vitamin B 12 in serum. *Scand J Clin Lab Invest* 1994 ; 54 (3) : 235-40.
- 14-** ISHIWATA Y., TUCHII K., ENDO N., IKEDA R., YASUDA K. Determination of serum vitamin B12 and folic acid by non boil radioassay. *kaku igaku* 1994 ; 31(6) : 619-27.
- 15-** WENTWORTH S., BRIDE J.A., WALKER W. Chemiluminescence receptor assay for measuring vitamin B12 in serum evaluated. *Clinical Chemistry* 1994 ; 40 (4) : 537-540
- 16-** COLLADO G., BOSCHOJEDA C., GARCIA DE TORRES A., CANO PAVON JM. Determination of cobalt in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction with 1,5-bis (di -2-pyridylmethylene) thiocarbonylhydrazide. *Analisis* 1995 ; 23 (5) : 224-27.
- 17-** KABIL MA., GHAYS E., EL ASMY A., SHERIF YE. Flame atomic-absorption spectrometric investigation and determination of cobalt and copper using ethanolamine and tri ethanol amine as chemical modifiers. *J. Anal. At.Spectrom* 1996 ; 11(5) : 387-479.
- 18-** KARSILAYAN H. Quantification of vitamin B12 by first derivative absorption spectroscopy. *Spectrochim. Acta, part A* 1996 ; 52A (9) : 1163-68.
- 19-** IVERSEN B.S, PANAYI A., CAMBLOR J P., SABIONI E. Simultaneous determination of cobalt and manganese in urine by ET-AAS. Methode development using a simplex optimization approach. *J.Anal.At.Spectrom.* 1996 ; 11(8) : 591-94
- 20-** BALFOUR IC., LANE DW. B12/Folate assays and macrocytic anaemia. *The Lancet* 1995 ; 346 (12) : 446-47
- 21-** FOURRÉ C., GUIRAUD-VITAU C., DELABRIOLLE-VAYLET, COLAS-LINART N. Dosages radioisotopiques de la vitamine B12 : intérêt du test Kappa dans une évaluation multicentrique. *Path. Biol.* 1993 ; 10 : 962-67.
- 22-** DAHLE A., GHOSH S. Vitamin B12 deficiency in untreated celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(3) : 745-50
- 23-** NICOLAS JP., GUEANT JL. Absorption, distribution and excretion of vitamin B12. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* 1994 ; 30 (6) : 270-276.
- 24-** ZITTOUN J. Cobalamines : Actualisation des données métaboliques, cliniques, diagnostiques et thérapeutiques. *Hématologie* 1996 ; 2 (2) : 119-29.
- 25-** NAJEAN Y, LEGRAND M, SENECHAL A, LEROY M, RAIN J.D. Analyse critique de 1000 dosages systématiques du taux sérique de vitamine B12 et folates. *La Presse Médicale* 1989 ; (18) : 867-71.
- 26-** NEXO E., HANSEN M., RASMUSSEN K., LINDGREN A., GRASBECK R. How to diagnose cobalamin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1994 ; 219 : 61-76.
- 27-** ALI G., PÉCOUD A., DECROY H., VERDON N. Diagnostic précoce en médecine ambulatoire. *Schweiz Med Wochenschr* 1998 ; 128 : 1763-7.
- 28-** FREMONT S., BIEBER S., DAUENDORFFER JN., SAREM F., BOISSON F., CHANGO A., CONTON P., NICOLAS P. évaluation du dosage de la Vitamine B12 par la technique Cédia Boehringer sur un Hitachi 91. *Immuno Anal. Biol Spéc* 1998 ; 13 : 43-8.
- 29-** DUCHE JC. Dosage plasmatique de la Vitamine B12 sur L'ACS 180 Beyer Diagnostics. Comparaison avec un dosage radioisotopique. *Ann Biol Clin* 2001 ; 59 (5) : 617-21.