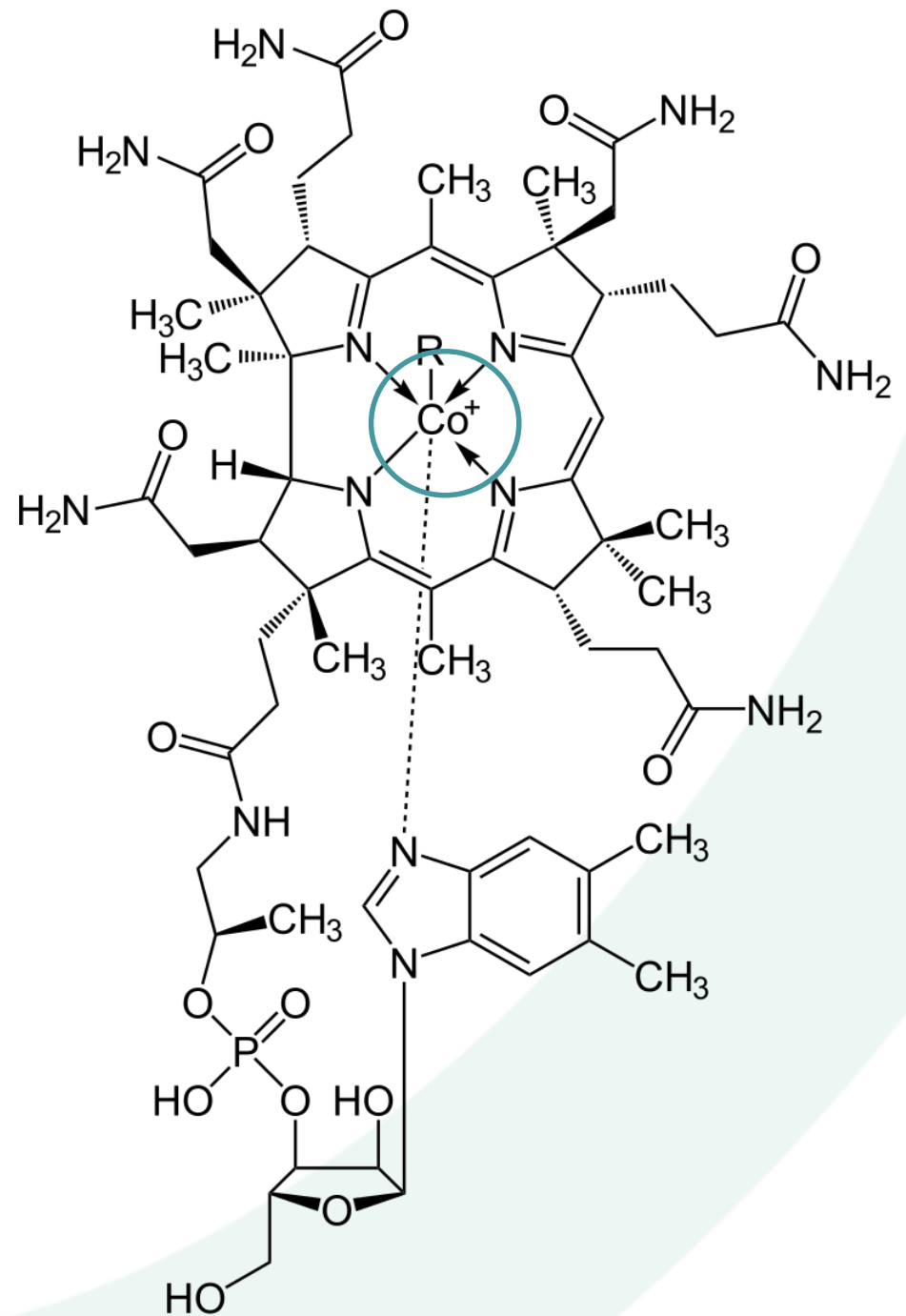


Pièges analytiques des dosages de la vitamine B12

Pharmacien Biologiste
Laura VRANKEN

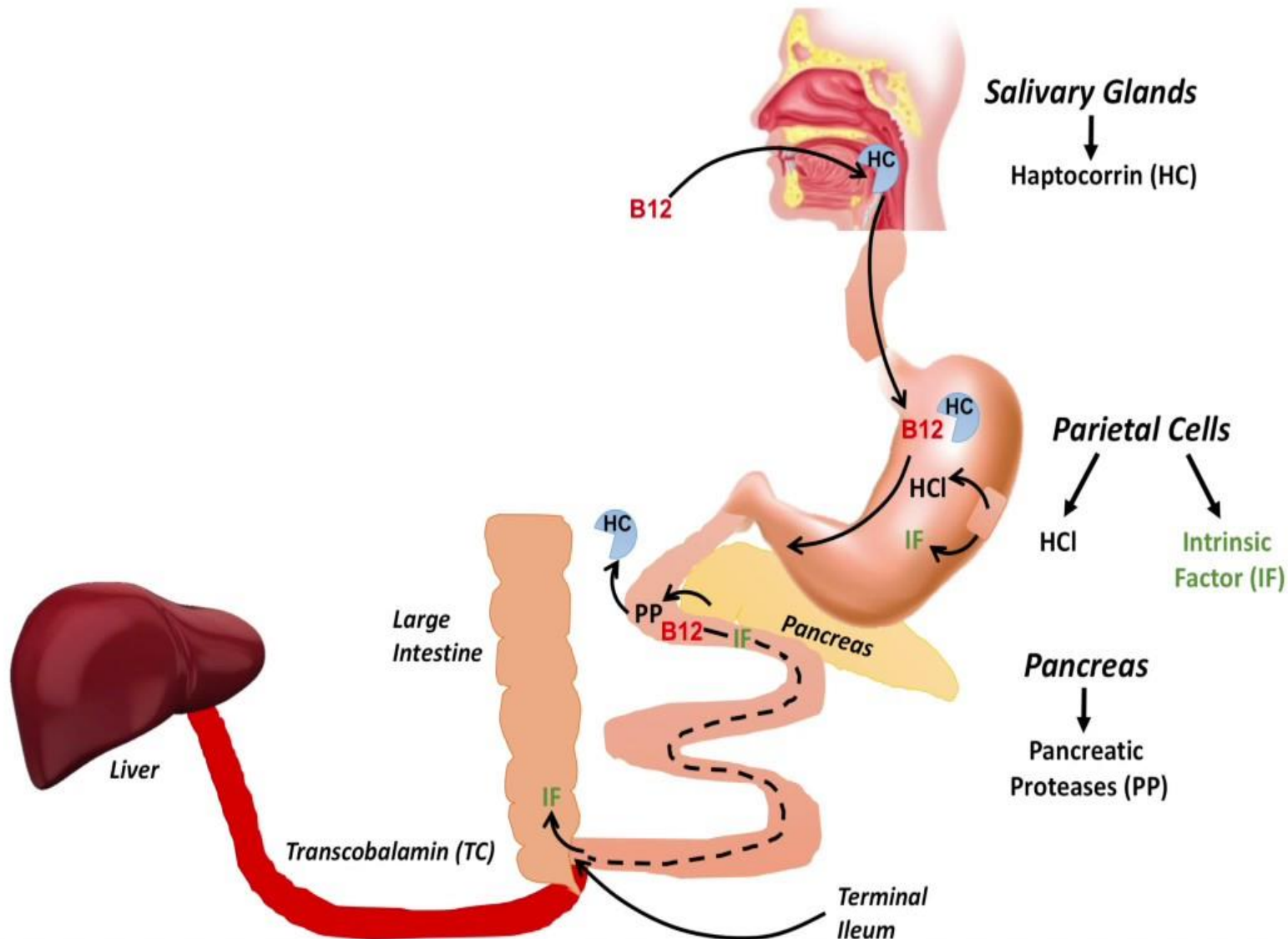
Cobalamines



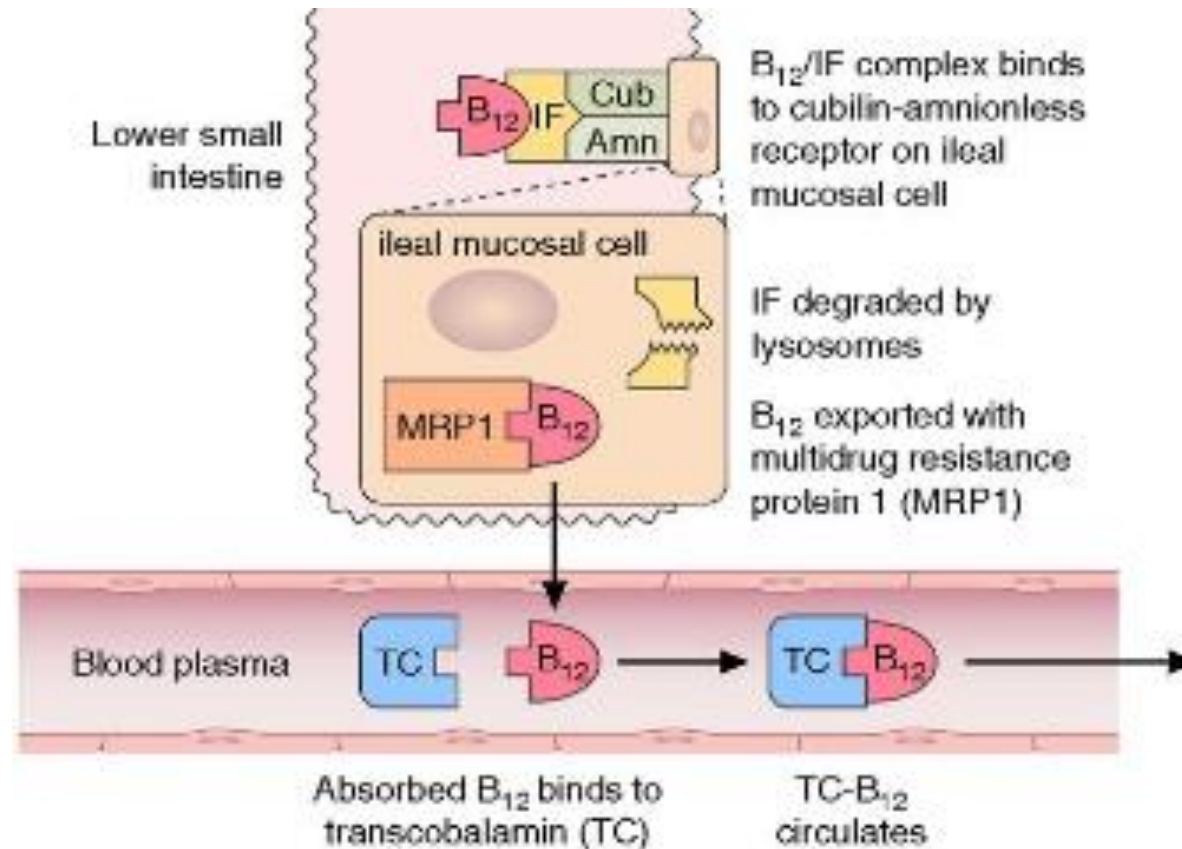
Obtention

- Fermentation pré-gastrique
- Coprophagie
- Consommation d'insectes
- Consommation d'algues
- Carnivores et consommation de produits d'origine animale
- Produits enrichis

Absorption de la vitamine B12



Absorption de la vitamine B12



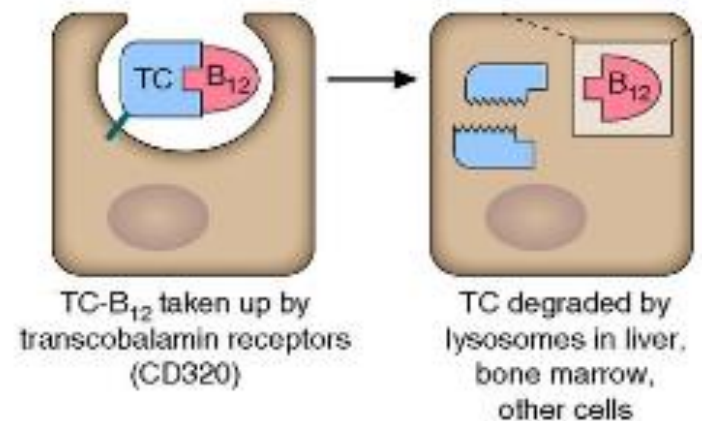
La Holotranscobalamine

Trois transporteurs sériques sont impliqués dans le transport de la vitamine B12 : les transcobalamines (TC I-II et III).

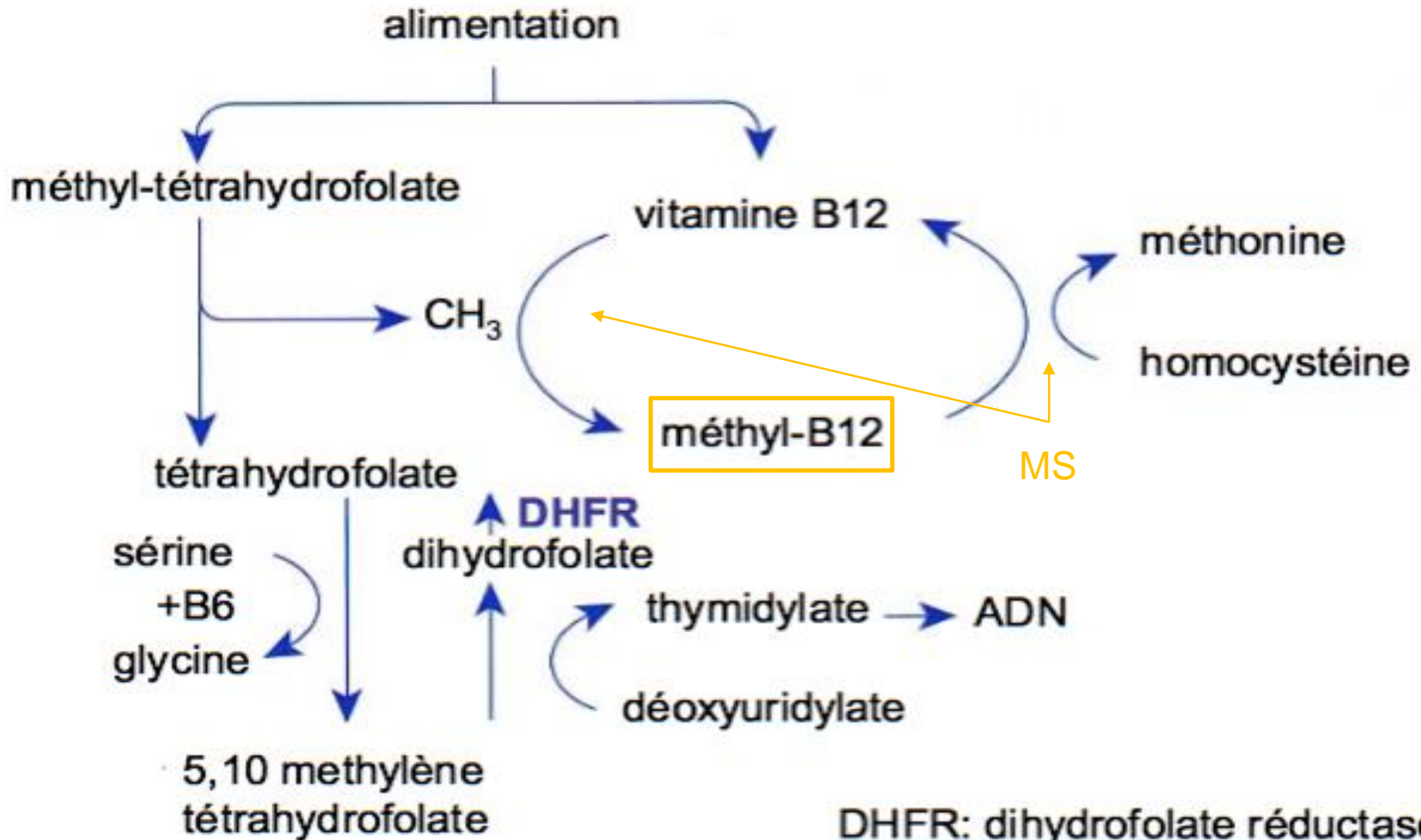
Cependant, seule la vitamine B12 liée à TC II (ou holotranscobalamine) est biodisponible et donc biologiquement active (20%)

Demi-vie courte (entre 6 min et 2h) => rapidement absorbée par les tissus

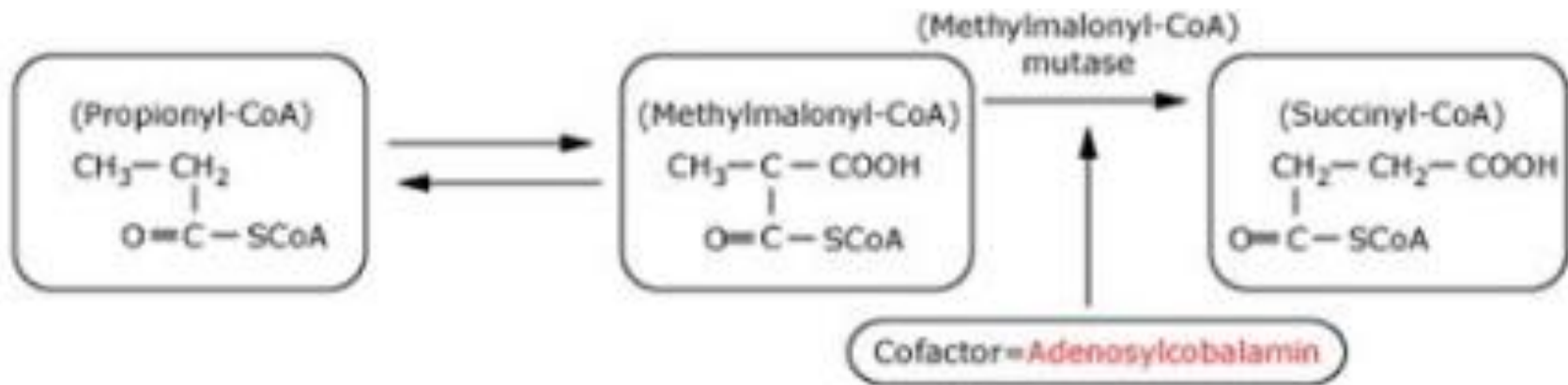
TC II circulante majoritairement insaturée (apotranscobalamine)



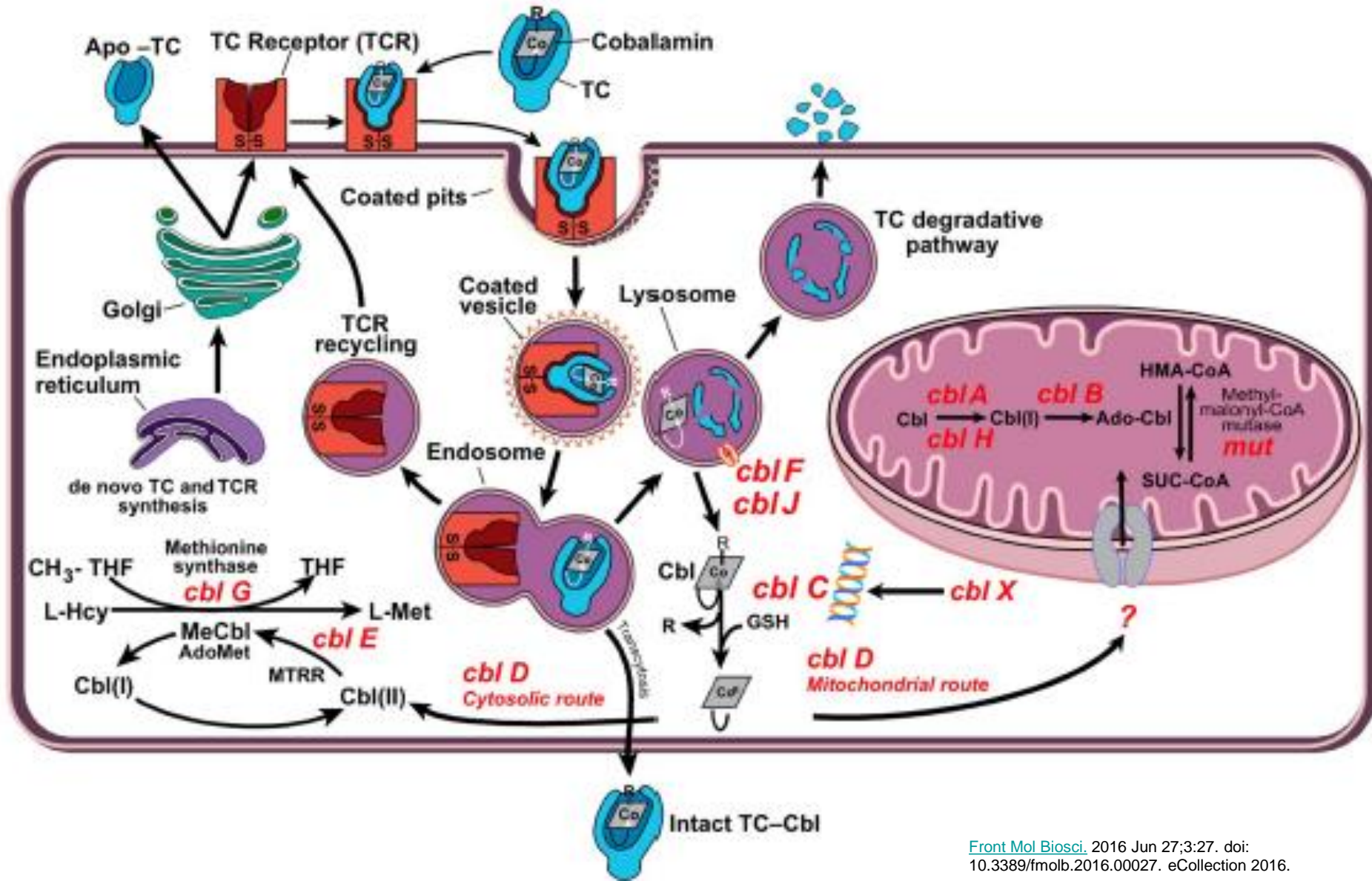
Métabolisme de la vitamine B12



Métabolisme de la vitamine B12



Métabolisme de la vitamine B12



Aspects nutritionnels

	Vitamin B ₁₂	Folate
Normal daily dietary intake	7–30 µg	200–250 µg
Main foods	Animal produce only	Most, especially liver, greens and yeast
Cooking	Little effect	Easily destroyed
Minimal adult daily requirement	1–2 µg	100–150 µg
Body stores	2–3 mg (sufficient for 2–4 years)	10–12 mg (sufficient for 4 months)
Absorption		
Site	Ileum	Duodenum and jejunum
Mechanism	Intrinsic factor	Conversion to methyltetrahydrofolate
Limit	2–3 µg daily	50–80% of dietary content

Déficiência en vitamine B12: étiologies

Cause nutritionnelle: végétariens, végétans, dénutrition

Malabsorption

Age

Gastrique

Anémie de Biermer (anémie pernicieuse)

Atrophie gastrique

Gastrectomie

Intestinale

Anse aveugle, diverticulite (prolifération bactérienne)

Maladie de Crohn

Réséction iléale

Médicament

Vitamine B12 et Metformine

- Modification de l'absorption?
- Perturbation du microbiote?
- Modification de la distribution tissulaire?

- Posologie?

- Signes cliniques?

Anémie de Biermer

Gastrite chronique atrophique auto-immune

Anticorps dirigés contre le facteur intrinsèque et/ou la paroi gastrique => atrophie de la muqueuse gastrique => défaut de synthèse du facteur intrinsèque => déficit absorption vitamine B12

Diagnostic

Carence B12

Anémie mégaloblastique

Auto-anticorps

- Ac anti cellules pariétales gastriques: + 80-90% mais non-spécifique
- Ac anti Facteur Intrinsèque : + 55% mais spécifiques

Fibroscopie gastrique

Déficience en vitamine B12: étiologies

Causes génétiques

- Déficit congénital en transcobalamine 2
- Déficit en récepteur à la transcobalamine 2
- Maladie congénitale d'Imerslund (maladie orpheline) mutation CUBAM
- Déficit héréditaire en FI
- Maladies génétiques du métabolisme intracellulaire de la vitamine B12 : relargage lysosomal, étapes cytoplasmiques communes à la synthèse des cofacteurs, la méthionine synthase et la L-méthylmalonyl-CoA mutase.

Critères diagnostics

- **Vitamine B12 > 300 ng/L**
Déficit peu probable
- **Vitamine B12 200-300 ng/L**
Zone grise
A investiguer / à supplémenter
- **Vitamine B12 < 200 ng/L**
Déficit fort probable (Spécificité > 95%)

Critères diagnostiques

- Taux sérique de vitamine B12 totale (cyanocobalamine) à deux reprises inférieur à 200 pg/mL (ou 150 pmol/L) (spécificité 95%)
- Taux sérique de vitamine B12 totale inférieur à 160 pg/mL dès le premier prélèvement
- Taux sérique de vitamine B12 inférieur à 200 pg/mL + homocystéine totale sérique supérieur à 13 $\mu\text{mol/L}$ ou acide méthyl malonique supérieur à 0,4 $\mu\text{mol/L}$

Manifestations

Au niveau biologique

Anémie mégaloblastique

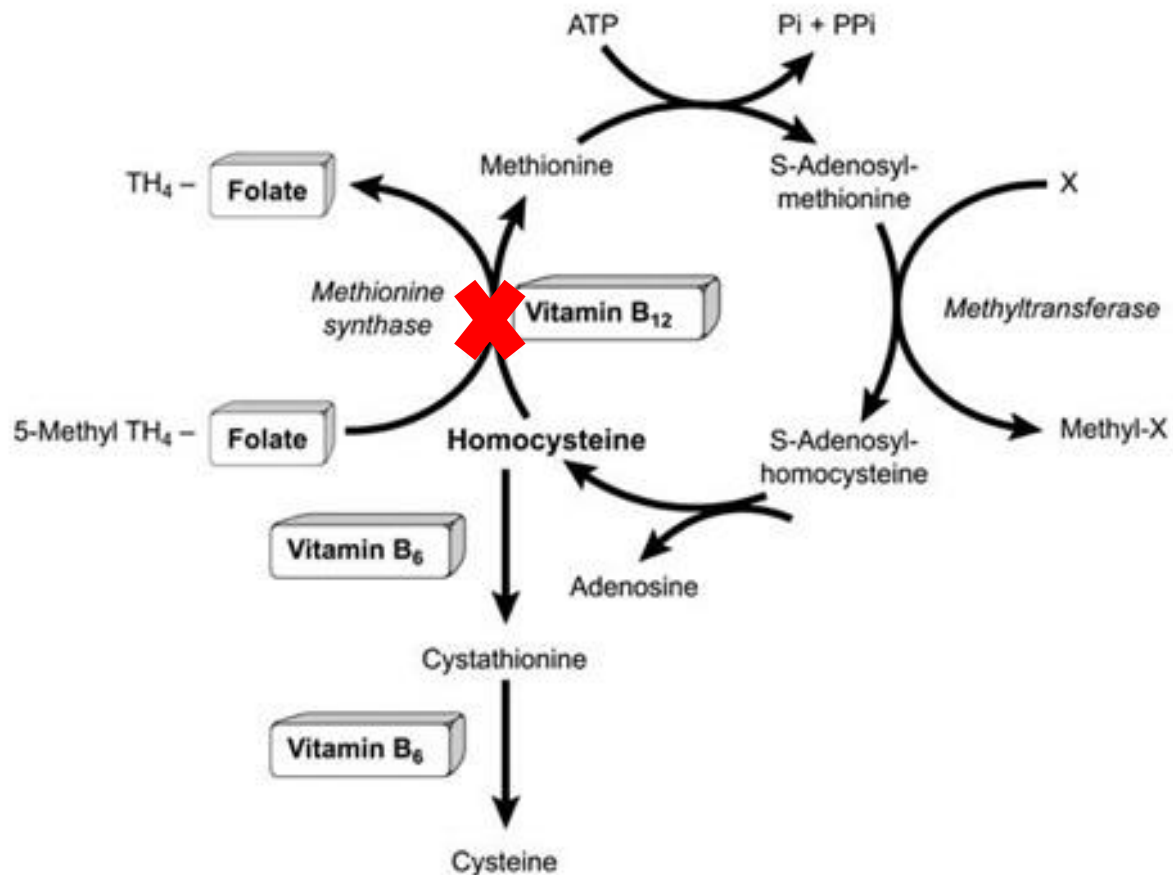
- ↓ synthèse de l'ADN
- ↓ maturation nucléaire des GR/ synthèse normale Hb → mégaloblastes, macrocytes
- destruction intramédullaire des mégaloblastes → hémolyse (augmentation des LDH, chute de l'haptoglobine)

=> anémie

Manifestations

Au niveau biologique

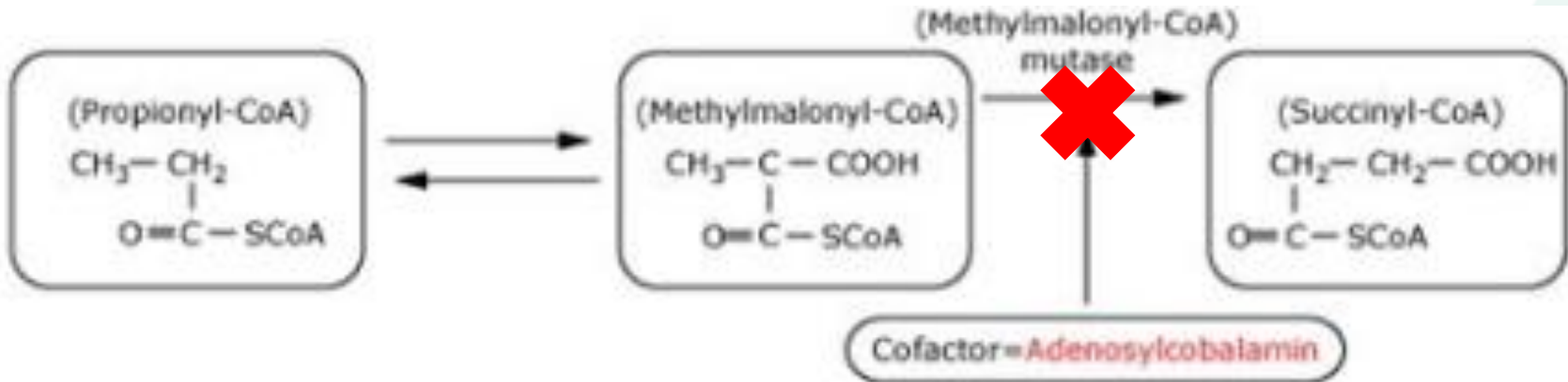
- hyperhomocystéinémie



Manifestations

Au niveau biologique

- Acide méthyl malonique



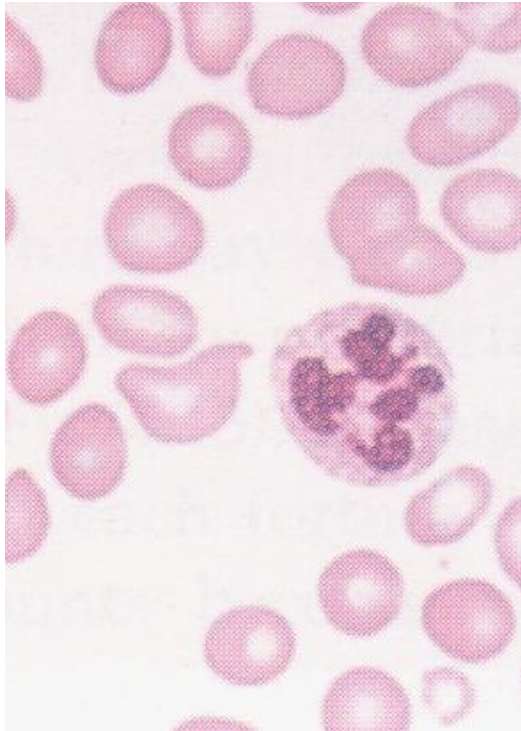
Macrocytose, ovalocytose

Réticulopénie

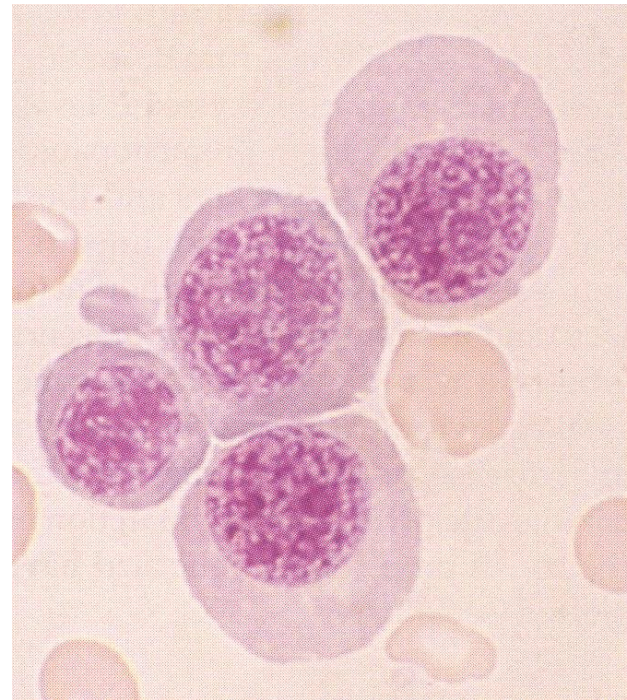
Hypersegmentation des neutrophiles (> 5 lobes nucléaires) +
gigantisme

Moëlle hypercellulaire + mégalosblastes

Cas sévères: leucopénie et thrombopénie



macro-ovalocytose
neutrophile hypersegmenté



mégalosblastes médullaires

Manifestations

Au niveau clinique

Atteinte neurologique

- Sclérose médullaire
- Déficit cognitif
- Atteinte SNP

Atteinte digestive

- Anorexie et diarrhées

Manifestations



Glossite de Hunter

Carence en vitamine B12 : évolution

•Stade 1 : absorption diminuée

→ Vitamine B12 sérique : normale à < 200 pg/ml

•Stade 2 (1-2 ans)

→ Vitamine B12 sérique < 150 pg/ml

→ Macrocytose, neutrophiles hypersegmentés

•Stade 3 (> 3 ans)

→ Vitamine B12 sérique < 100 pg/ml

→ Anémie mégaloblastique, anisopoikilocytose, rétics N = érythropoïèse inefficace : ↑ LDH & bilirubine, ↑ Fe sérique

→ Thrombocytopénie, leucopénie

→ Glossite de Hunter

→ Neuropathie (dégénérescence de la moelle épinière) : paresthésies, hyperréflexie, perturbation du sens de la position & du sens vibratoire, ataxie

Supplémentation en vitamine B12

Etiologie

- **Régime inapproprié** : malnutrition, végétarien

→ **PO**

- **Manque de FI**

* Biermer = anémie pernicieuse (atrophie gastrique autoimmune)

* Gastrectomie

→ **IM**

- **Malabsorption**

Maladie céliaque, sprue tropicale, résection iléale, Crohn

→ **IM (puis PO ?)**

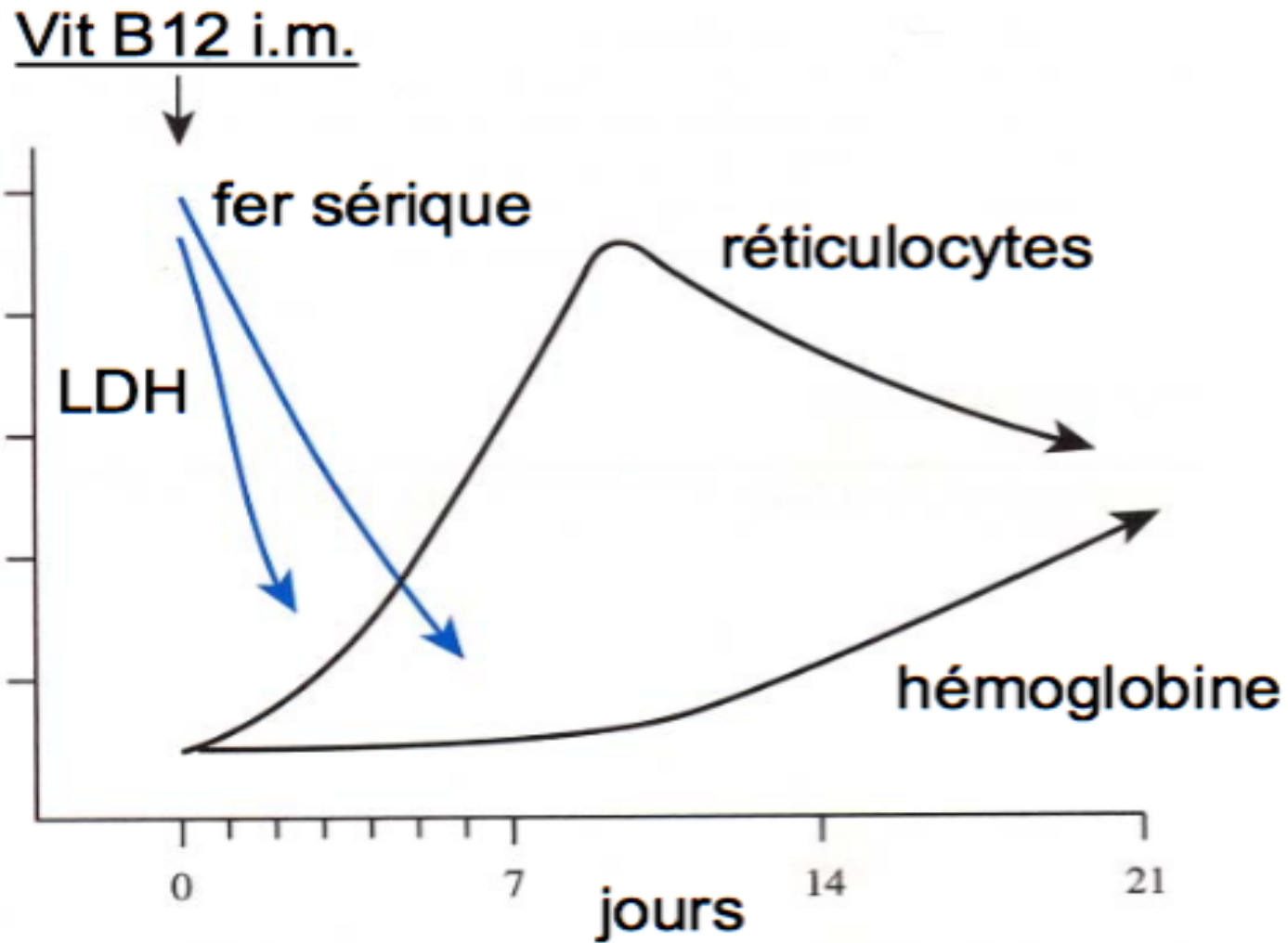
- **Compétition**

* Bact : syndrome de l'anse aveugle (diverticule ou infl. localisée)

* Ténia du poisson (*Diphyllobothrium latum*)

→ **IM puis PO**

Réponse au traitement



Anémie

Diagnostic différentiel

Macrocytaire : Réticulocytes

Normal/Bas : défaut de maturation

Haut : hémolyse

⇒ **Dosage de l'Acide folique et de la B12**

Bas = Anémie mégaloblastique?

Normal/élevé

- **GGT** : Alcool? Cirrhose?
- **Hormones thyroïdiennes** : hypothyroïdisme?
- **Post-chimio-thérapie?**
- **Ponction de moelle** : SMD?

Carence chez le nourrisson

- Statut en vitamine B12 à la naissance dépend des réserves en B12 de la mère durant la grossesse, de la fonction placentaire, de l'âge gestationnel et du poids à la naissance.
- Métabolisme complexe régulant le transfert actif du placenta vers le fœtus
- Réserve hépatique à la naissance d'environ 25µg
- Facteurs de risque de carence identifiés

Valeurs élevées de B12

- Hémopathies malignes

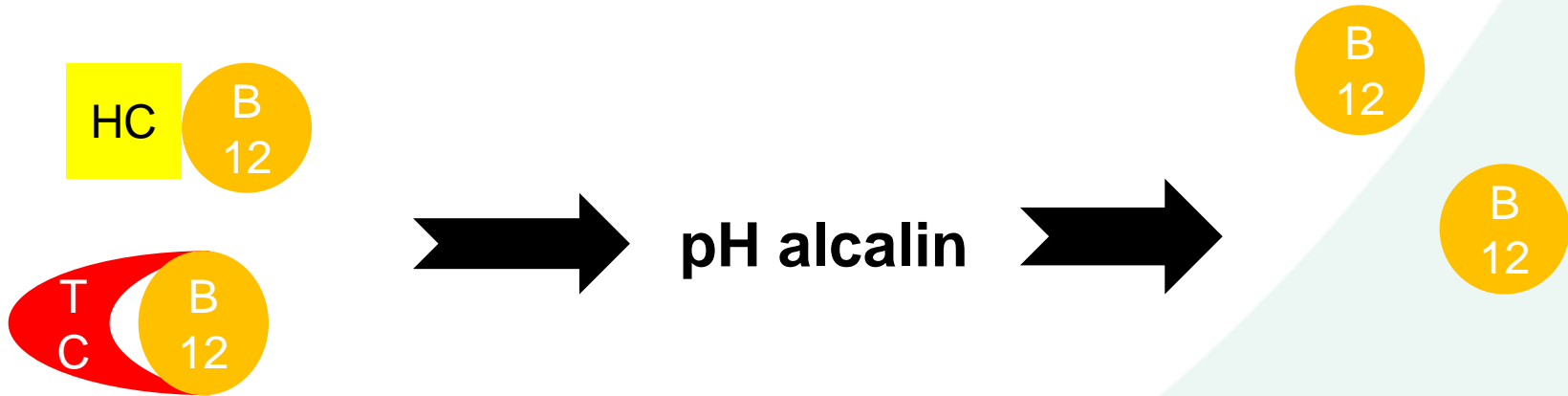
Importance de l'hypervitaminémie B12	
Leucémie myéloïde chronique	Très fréquente, jusqu'à 10 x la normale
Maladie de Vaquez	30 à 50 % des cas, jusqu'à 3 x la normale
Myélofibrose primitive	1/3 des cas
Syndrome hyperéosinophilique primitif	Jusqu'à 30 x la normale
Leucémies aiguës	30 % des cas, plus fréquente dans la promyélocytaire

- Alcoolisme, cirrhose , mucoviscidose
- Atteintes hépatiques aiguës ou chroniques, carcinome hépatocellulaire
- IR
- Néoplasies solides, métastases hépatiques
- Prise de vitamine B12 exogène

Vitamine B12 totale

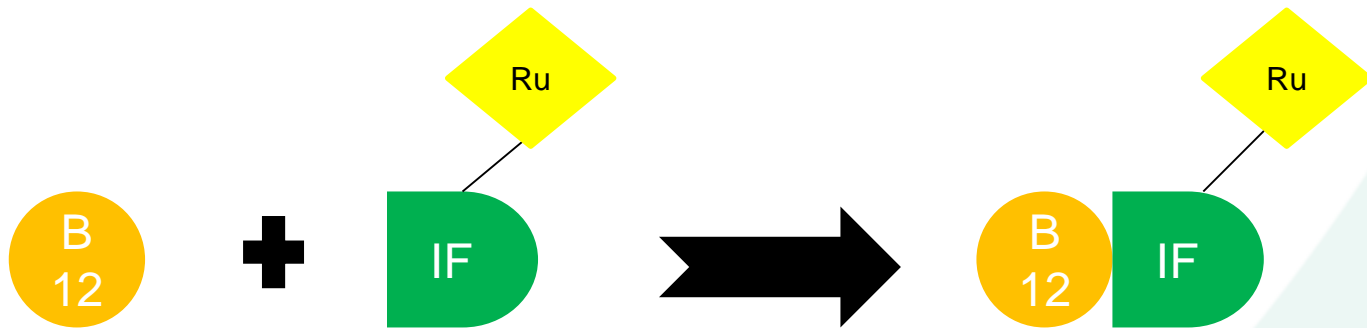
Electrochemiluminescence immunoassay "ECLIA" en 3 étapes

- 1ère incubation





Vitamine B12 totale

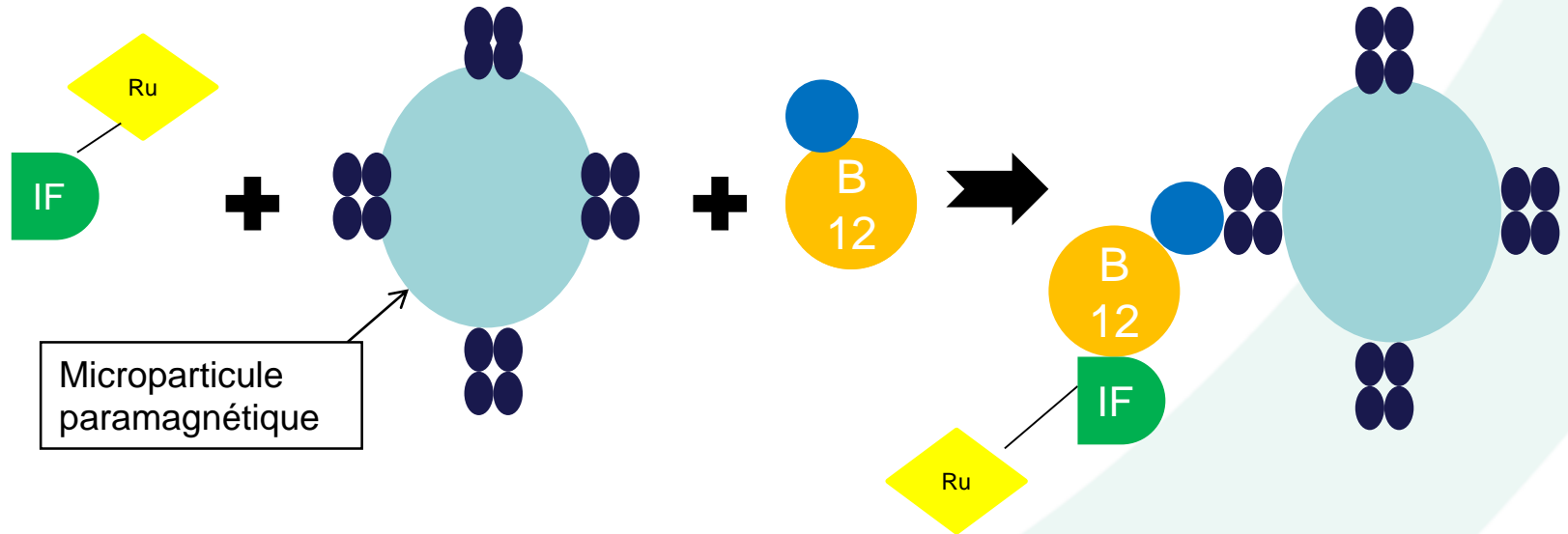
- 2e incubation



Techniques de dosages

Vitamine B12 totale

- 3e incubation:  Biotin
 Streptavidin



Critères diagnostics

- **Vitamine B12 > 300 ng/L**
Déficit peu probable
- **Vitamine B12 200-300 ng/L**
Zone grise
A investiguer / à supplémenter
- **Vitamine B12 < 200 ng/L**
Déficit fort probable (Spécificité > 95%)

Cas clinique 1

Femme de 49 ans se présentant aux urgences pour

- Asthénie
- Odynophagie
- Paresthésie symétrique des deux jambes
- Dépression

Résultats du laboratoire:

- Anémie macrocytaire (7,3 g/dL, 111 fL) , réticulocytes bas
- Leucopénie ($< 2.000/mm^3$) avec neutropénie, thrombopénie ($135.000/mm^3$)
- LDH élevés (2668 UI/L)
- CD négatif
- Vitamine B12 (387 pmol/L)
- Ac anti-Facteur intrinsèque +++
- Ac Anti cellules pariétales négatif

- Ponction médullaire : signe de dysplasie dans les 3 lignées

- Gastroskopie : atrophie gastrique et gastrite

Cas clinique

Anémie de Biermer versus **SMD** ?

Cas clinique 1

Femme de 49 ans se présentant aux urgences pour

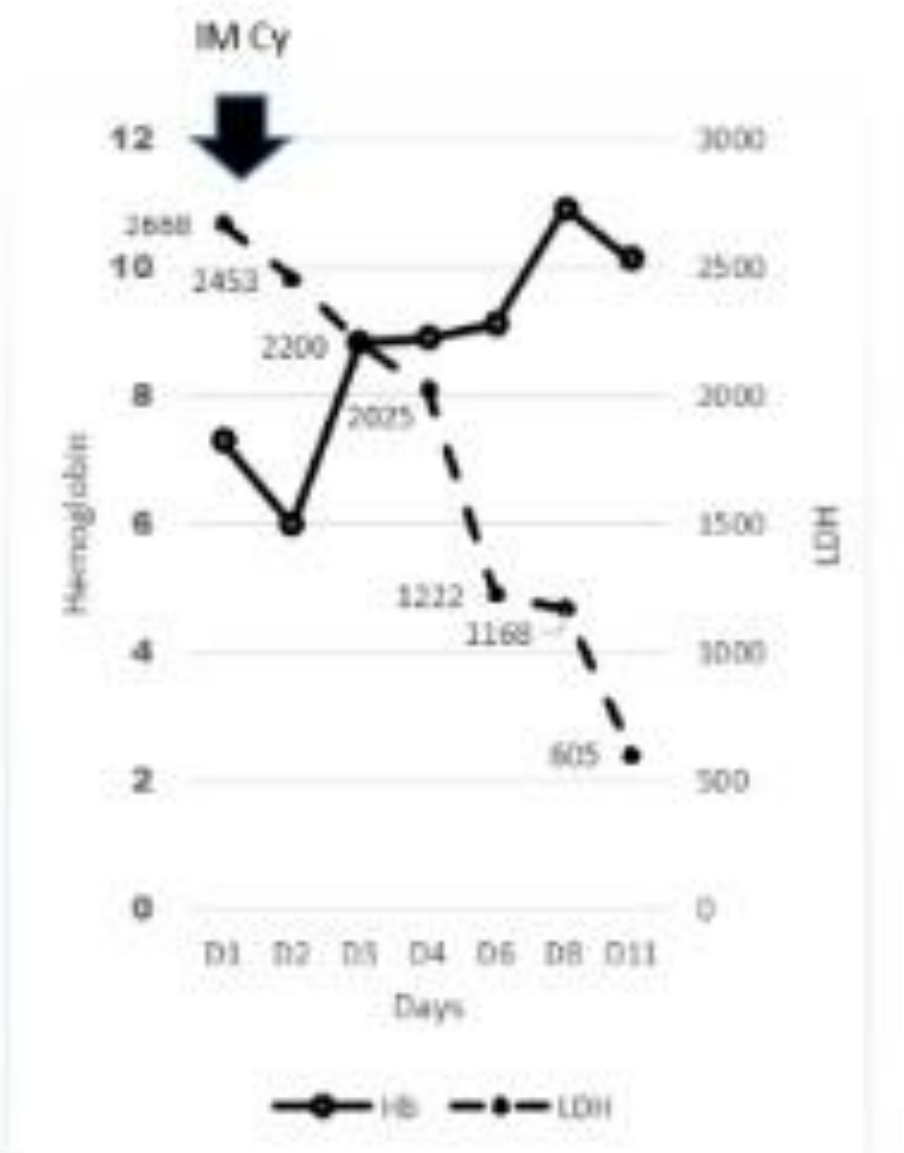
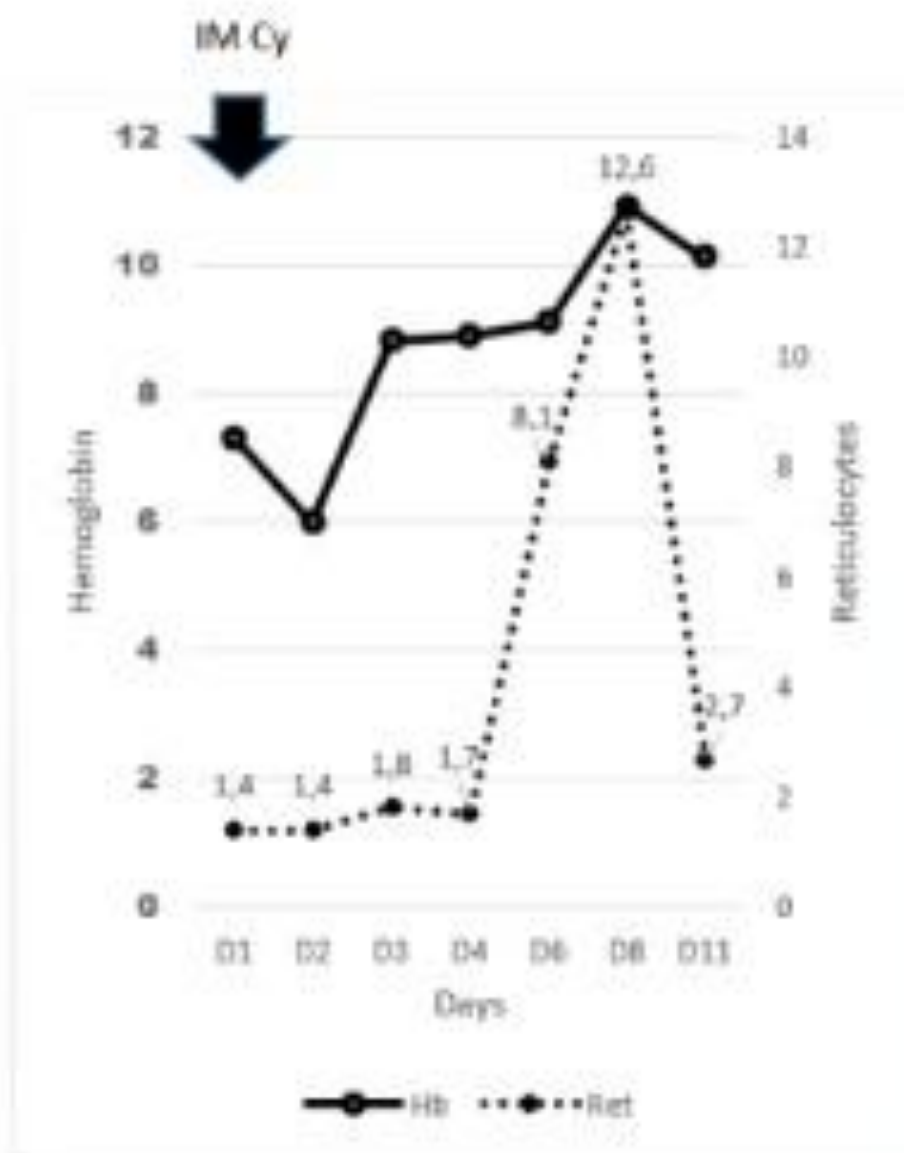
- Asthénie
- Odynophagie
- Paresthésie symétrique des deux jambes
- Dépression

Résultats du laboratoire:

- Anémie macrocytaire (7,3 g/dL, 111 fL) , réticulocytes bas
- Leucopénie ($< 2.000/mm^3$) avec neutropénie, thrombopénie ($135.000/mm^3$)
- Dysplasie des 3 lignées à la ponction médullaire
- LDH élevés (2668 UI/L)
- CD négatif
- Vitamine B12 (387 pmol/L)
- Ac anti-Facteur intrinsèque +++
- Ac Anti cellules pariétales négatif

- Ponction médullaire : signe de dysplasie dans les 3 lignées

- Gastroskopie : atrophie gastrique et gastrite



Cas clinique 2

B12 totale > 2000 ng/L chez un patient présentant des signes d'anémie mégaloblastique

Folates OK

Mise en évidence d'un complexe d'immunoglobuline IgG anti-transcobalamine 2 causant la rétention de B12 au niveau sérique

La formation du complexe n'interférait pas sur la capacité de la transcobalamine à fixer la B12 mais bien dans sa capacité à délivrer la B12 aux cellules => interférerait dans la fixation au récepteur

Cas clinique 3

Femme de 45 ans

Myélome multiple récemment diagnostiqué (IgG kappa)

Dosage de la vitamine B12 => « no result »
(electrochemiluminescence Vitros°)

Dilution 25 fois => résultat obtenu 3512 pg/mL

Reprélevé sur un tube anit-anticorps hétérophile => idem

Traitement au PEG 6000 => résultat obtenu 887 pg/mL

=> Valeurs faussement augmentées par la présence de la paraprotéine.

Protocole de traitement au PEG

Au laboratoire :

4 g de PEG 6000 dissout dans 10 mL d'eau distillée
300 µL de cette solution ajouté à 300 µL d'échantillon
Incubation 1 h à 37°C
Centrifugation 3 min à 2000 rpm
Surnageant analysé

Autre protocole: (J. Jeffery et al. / Clinical Biochemistry 43 (2010) 82-88)

2,4 g de PEG 6000 dissout dans 10 mL de solution saline
200 µL de cette solution ajouté à 200 µL d'échantillon
Incubation 10 min à t° ambiante
Centrifugation 20-30 min à 2000 rpm
Surnageant analysé

Protocole Abbott:

2,5 g de PEG 8000 dissout dans 10 mL de PBS à pH 7,4
250 µL de cette solution ajouté à 250 µL d'échantillon
Incubation 10 min à t° ambiante
Centrifugation 30 min à 1800 g
Surnageant analysé

Pièges analytiques

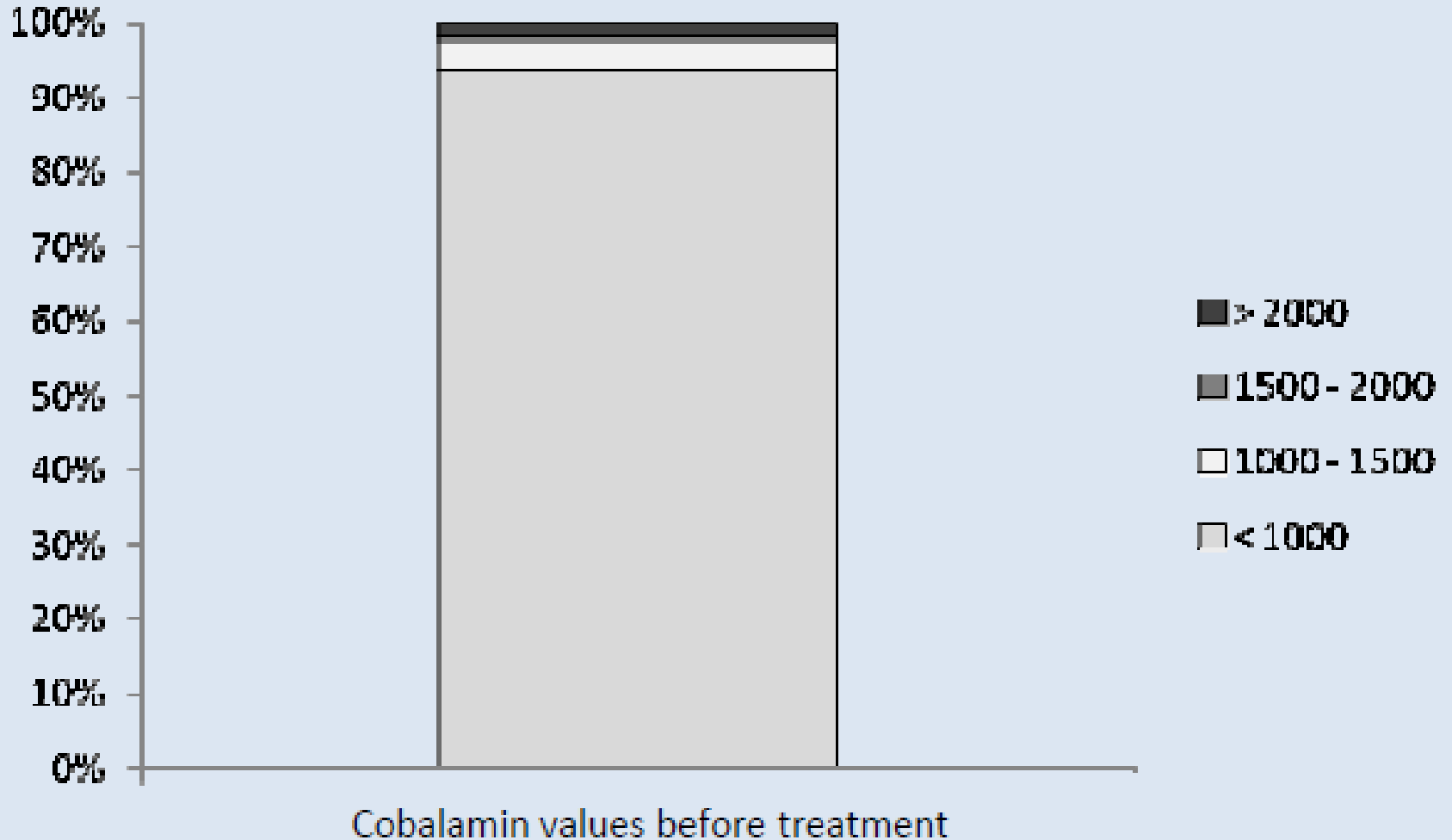
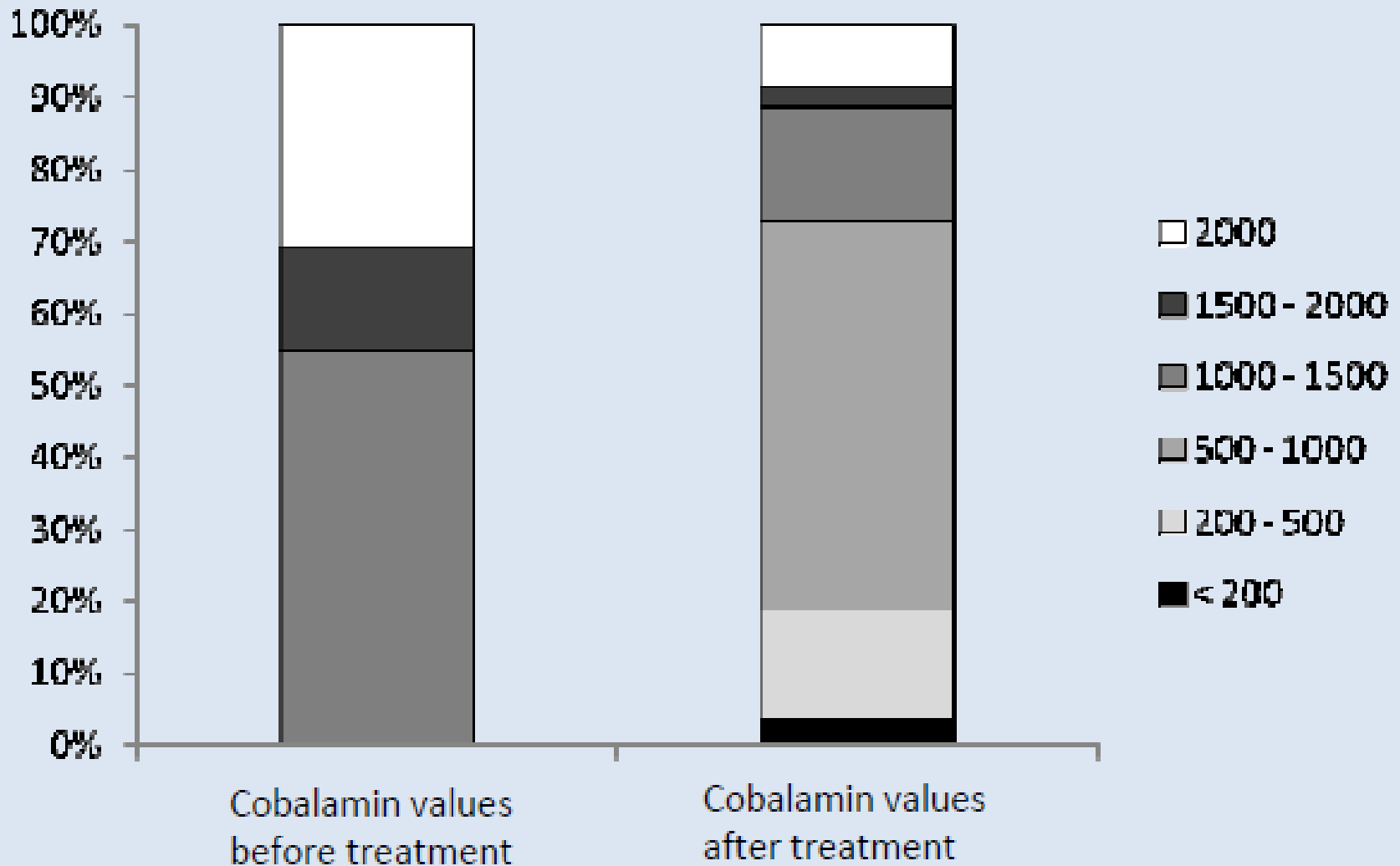
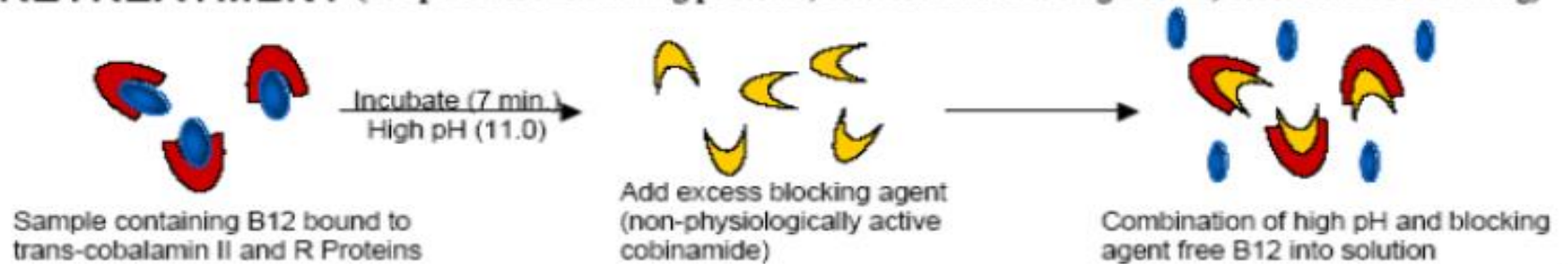


Fig. 1: Serum with cobalamin > 1000 ng/L represents 6.5% of the prescribed cobalamin dosage.

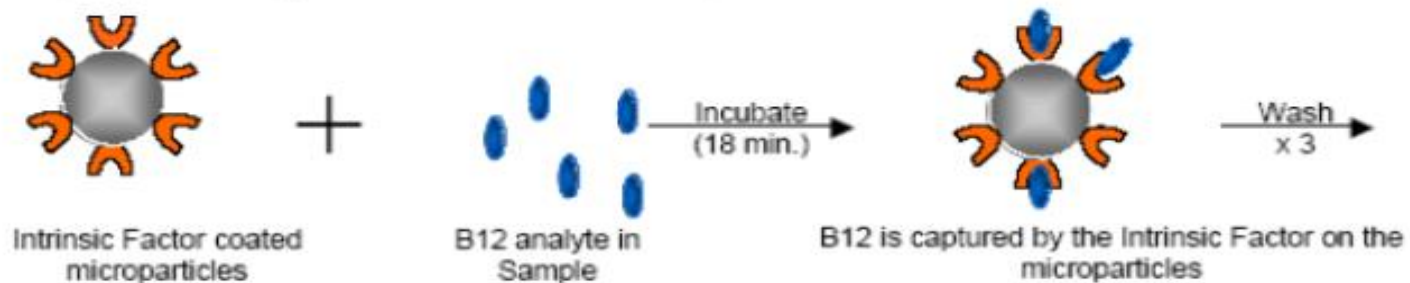
Pièges analytiques



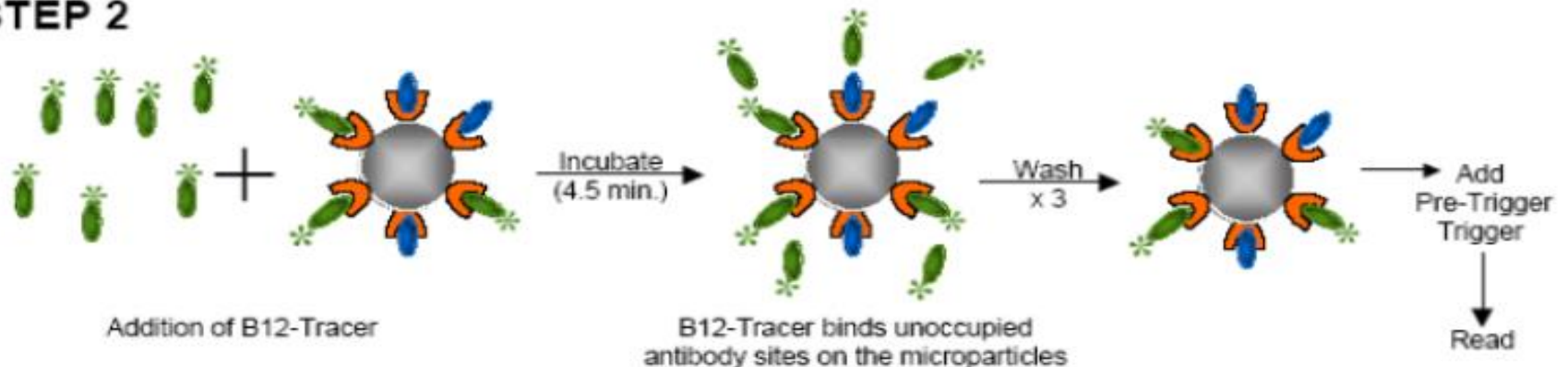
PRETREATMENT (Strip B12 from binding proteins, convert B12 to a single form, block from re-binding)



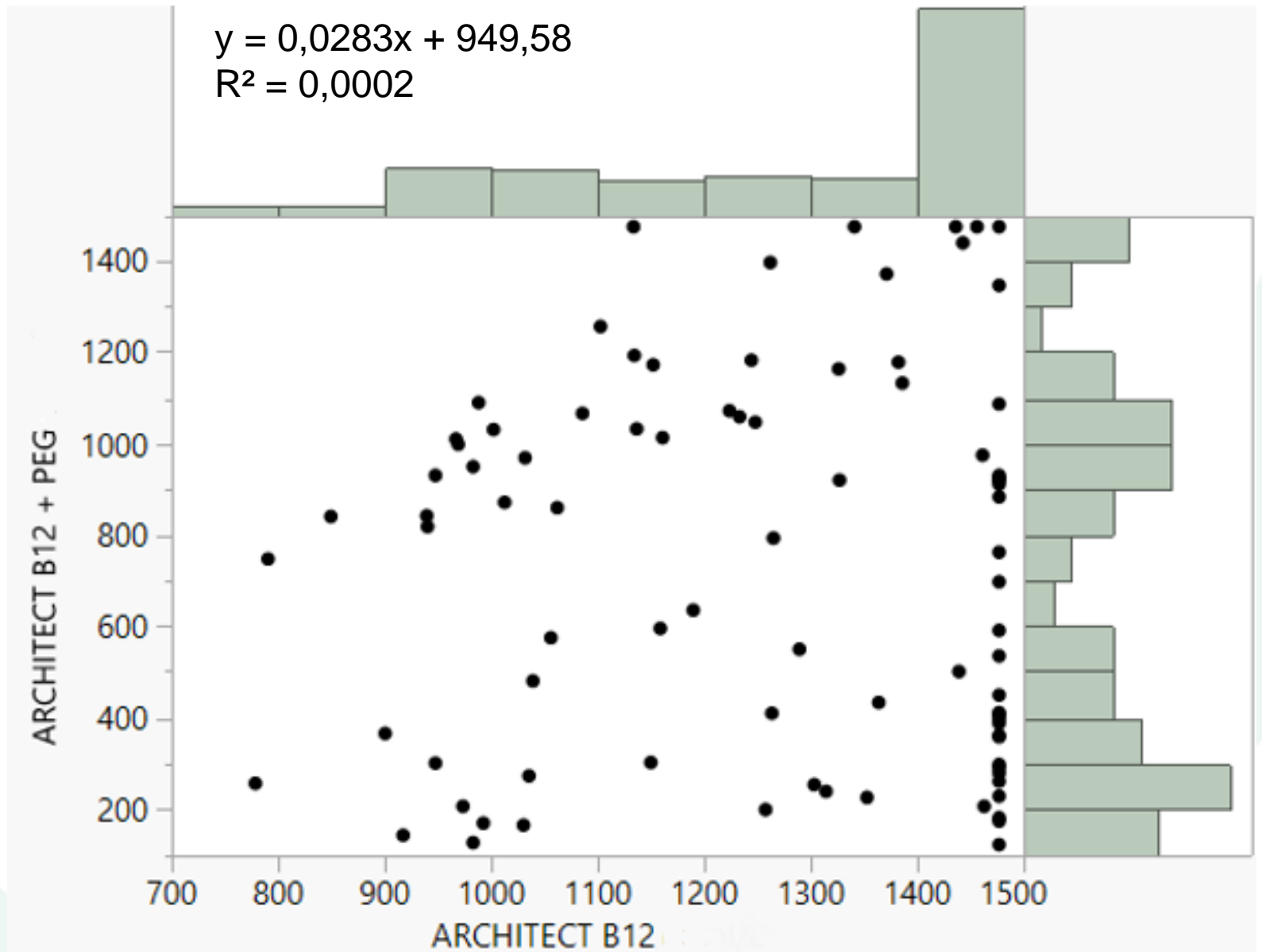
STEP 1 (Aliquot of sample taken from Pretreatment)



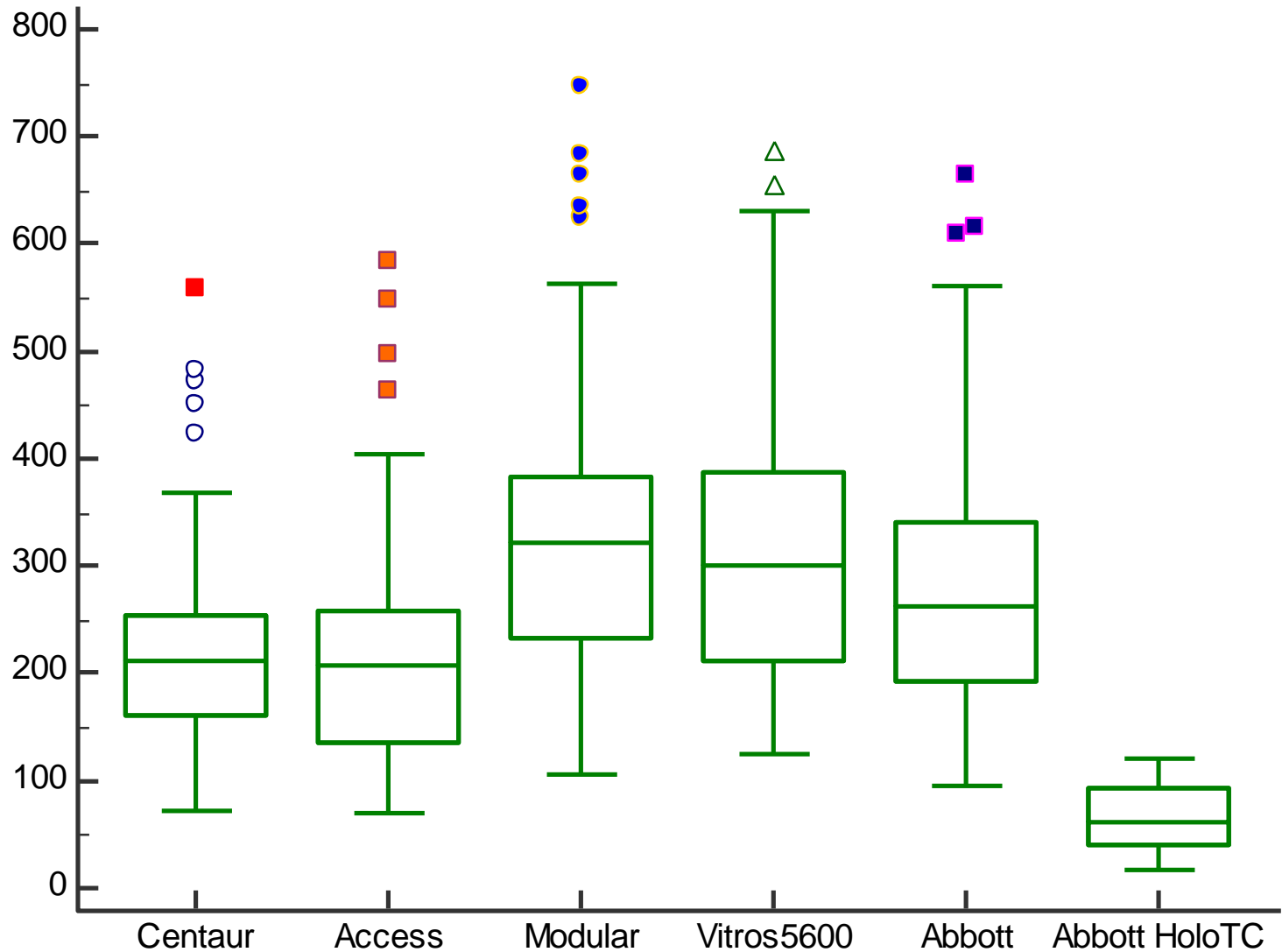
STEP 2



Pièges analytiques



Comparaison de 5 méthodes de dosages de la Vitamine B12 totale



Vranken et al. Comparison of six automated assays for the determination of cobalamin and holotranscobalamin in serum. Is there any better assay?

Comparaison de 5 méthodes de dosages de la Vitamine B12 totale

	Lower Cut-off (pmol/L)	Number of patients below the threshold	Percentage of patients below the threshold (%)
Modular	141	1	1,82
Access	133	9	16,4
Centaur	156	12	21,81
Vitros	176	6	10,9
Architect Total B12	138	4	7,27
Architect HoloTC	25,1	1	1,82

Comparaison des méthodes de dosages de la Vitamine B12 totale

Table 2a

Serum B₁₂ in the index case assayed by five immunoassays before and after PEG precipitation.

Method	Serum vitamin B ₁₂ result before PEG precipitation (ng/L)	Serum vitamin B ₁₂ result after PEG precipitation (ng/L)
Roche Modular	9184	465
	9577	432
Beckman Access	8080	389
	7616	336
	8314	354
	7863	283
	7631	354
Siemens Centaur	5350	340
Abbott Architect	8286	426
	7650	344
	8555	327
	9060	466
DPC Immulite	7500	309
	10,670	310

Samples were diluted in saline prior to analysis where concentrations of B₁₂ were above the working range of the assay.

Table 2

Cobalamin and IFBA Concentrations of IFBA-Positive Pools

Characteristic	Cobalamin Concentration, pg/mL ^a		IFBA Detection, U ^b	
	Untreated	PEG Treated	Untreated	PEG Treated
	High cobalamin pool	>2,000	>2,000	83.8
Normal cobalamin pool	286	322	83.3	1.0
Low cobalamin pool	76	112	94.6	1.9

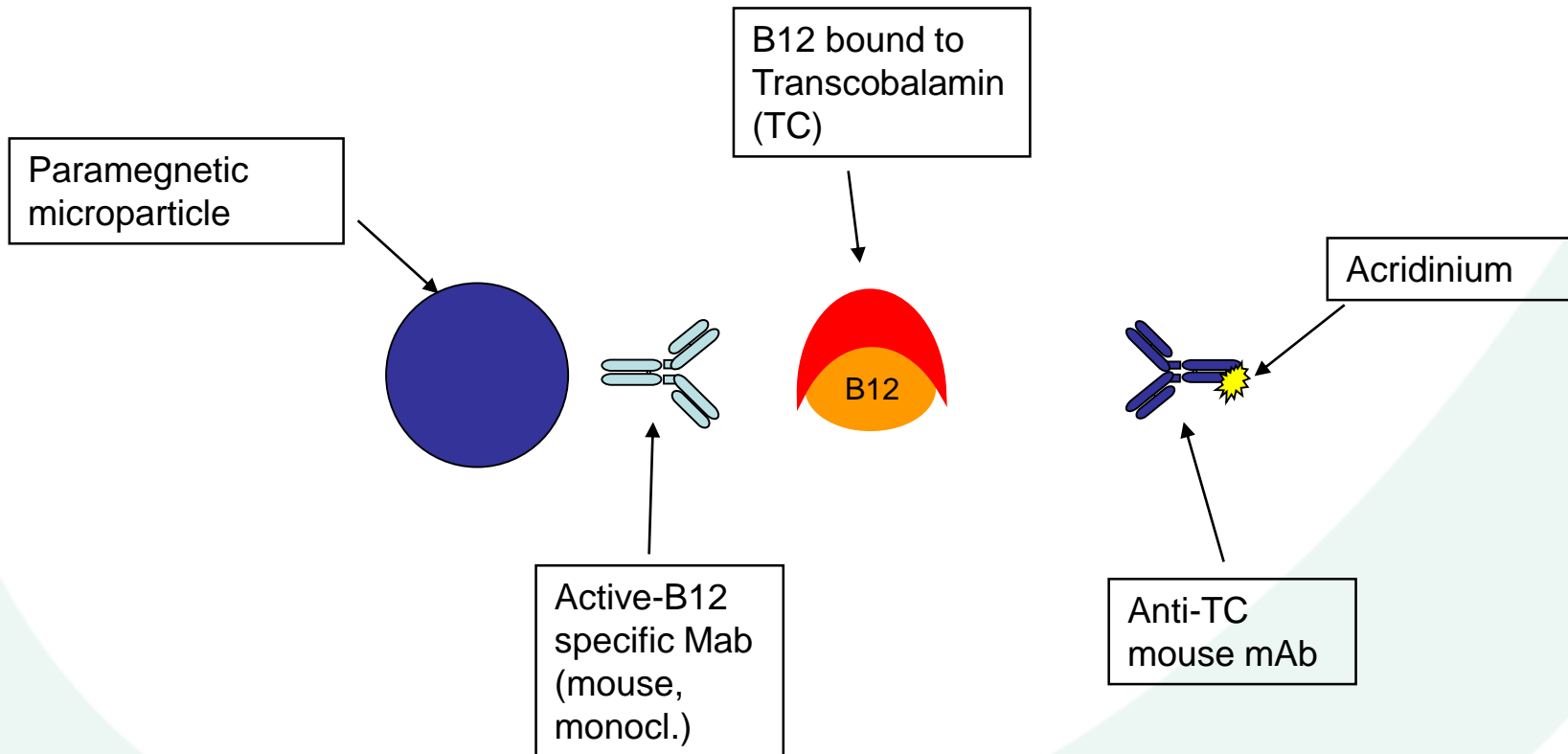
IFBA, intrinsic factor binding antibody; PEG, polyethylene glycol.

^a To convert cobalamin values to pmol/L, multiply by 0.7378. Reference range: 210 to 911 pg/mL.

^b Positive: ≥ 25 .

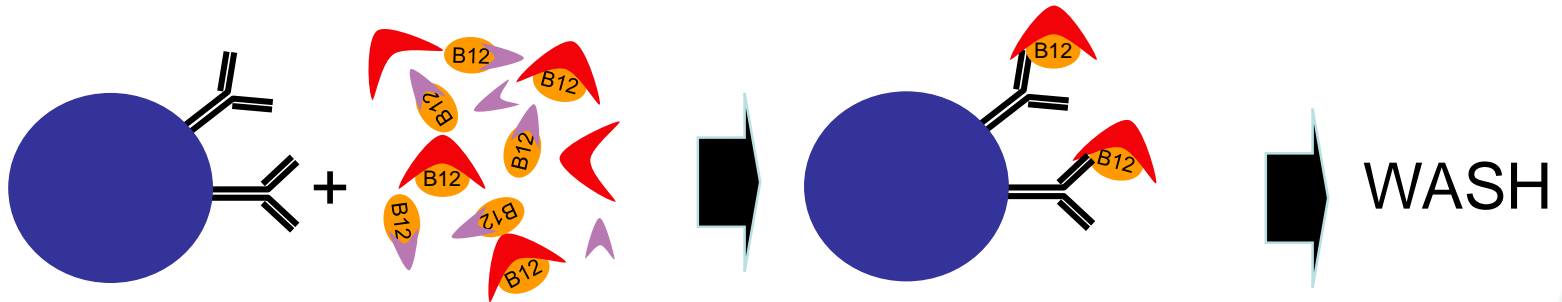
Holotranscobalamine

Valeurs de reference
25.1-165 pmol/L



Techniques de dosages

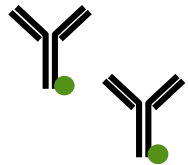
Holotranscobalamine



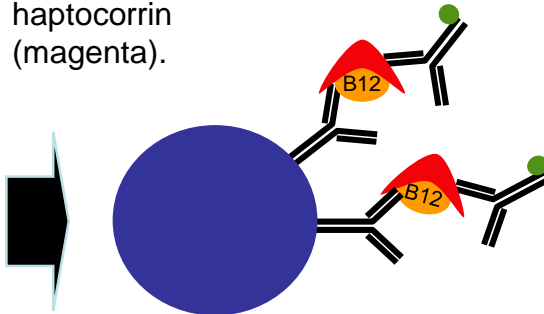
Active-B12 specific Mab (mouse, monocl.) immobilised on paramagnetic microparticle.

Sample B12 bound to transcobalamin (red) and haptocorrin (magenta).

Only B₁₂-TC (Active-B12) will bind to solid phase.



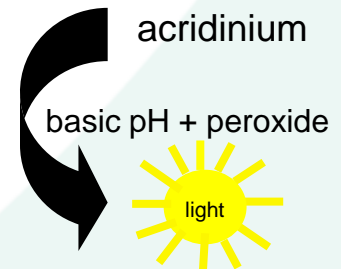
Anti-TC:acridinium conjugate (mouse, moncl.) is added.



Conjugate binds to TC bound to solid phase.

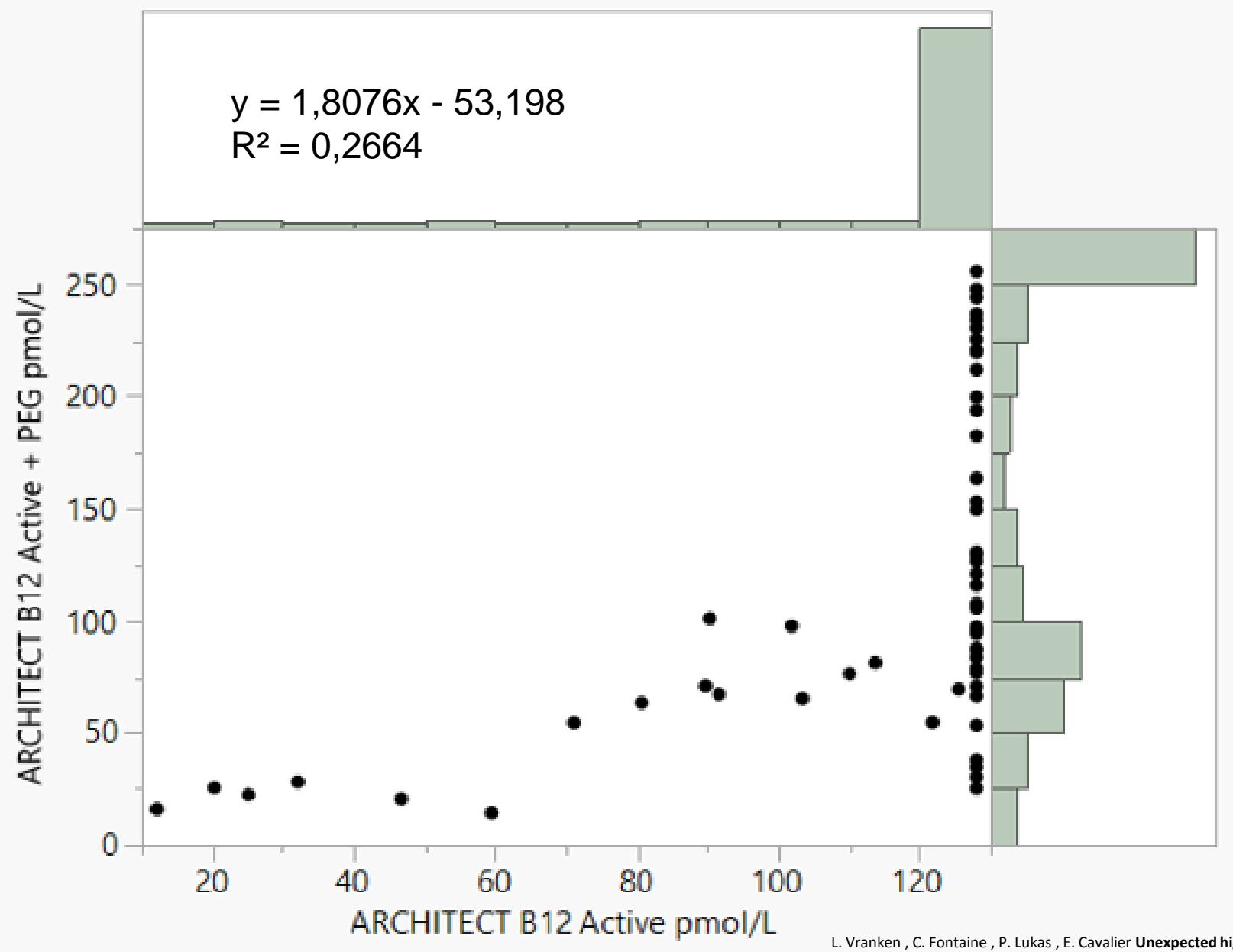
+
WASH

Unbound conjugate is removed.



Rate of chemiluminescence is directly proportional to [Active-B12] in sample.

Pièges analytiques



Pièges analytiques

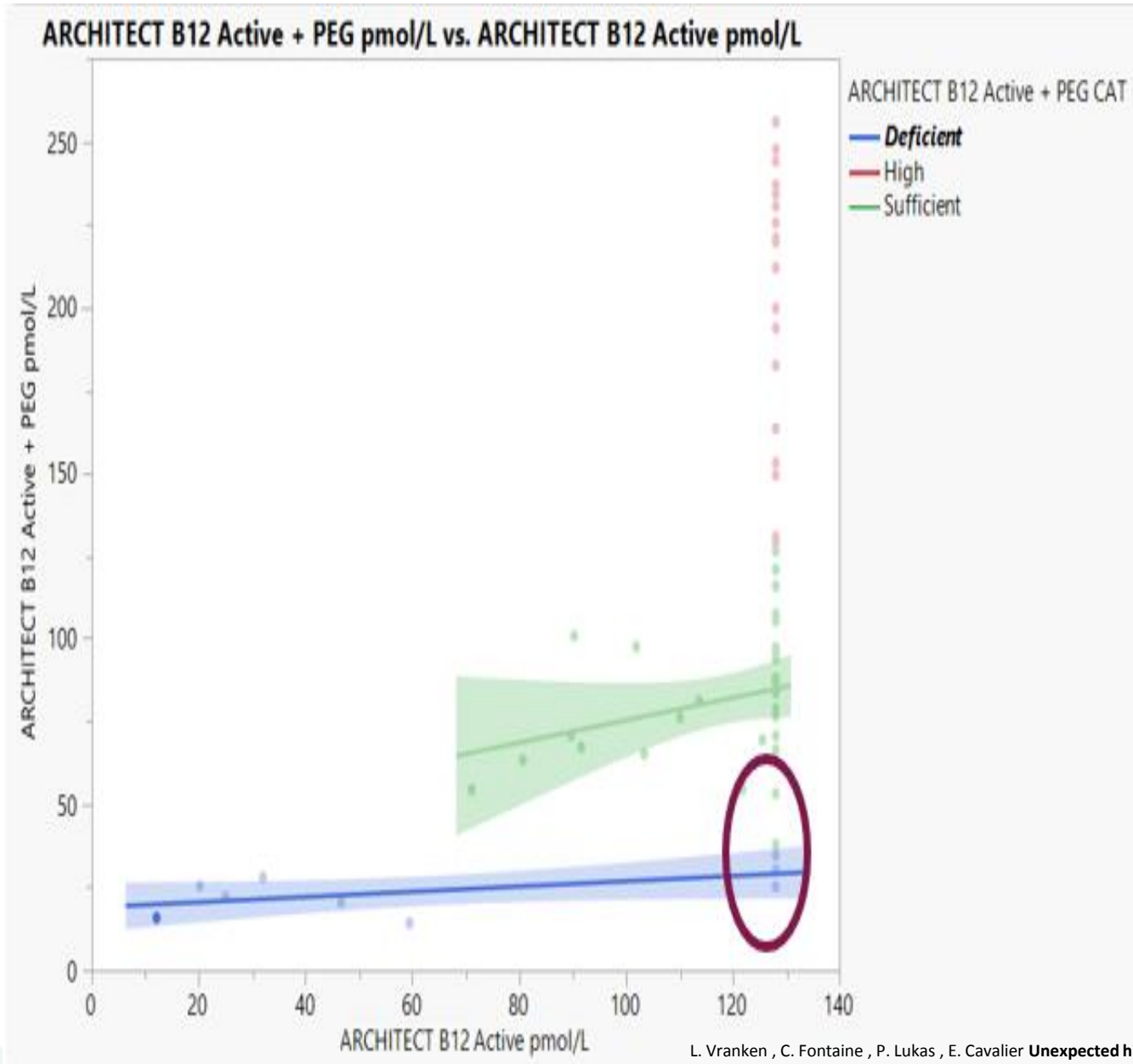


Table 2 Sensitivity and specificity—HoloTC versus B₁₂—original research data

Reference	Sensitivity	Specificity	Cut-off	AUC
Bamonti et al. (2010)	0.74	0.52	HoloTC < 40 pmol/L	0.75
Clarke et al. (2007) (definite deficiency)	0.771 versus 0.757	0.761 versus 0.724	MMA > 0.75 µmol/L	0.85 versus 0.76
Clarke et al. (2007) (probable deficiency)	0.647 versus 0.626	0.792 versus 0.748	MMA > 0.45 µmol/L	0.79 versus 0.87
Goringe et al. (2006)			HoloTC < 38 pmol/L	0.75 versus 0.72
Heil et al. (2012)	0.83 versus 0.64	0.60 versus 0.64	MMA > 0.45 µmol/L	0.78 versus 0.70
Herrmann et al. (2003a)	0.87 versus 0.45	0.75 versus 0.98	MMA > 0.271 µmol/L	0.879 versus 0.836
Herrmann and Obeid (2013)	0.72 versus 0.72	0.54 versus 0.41	MMA > 0.300 µmol/L	0.714 versus 0.632
Hvas and Nexø (2003)	1.0	0.89		
Hvas and Nexø (2005)			MMA > 0.75 µmol/L	0.90 versus 0.85
Lindemans et al. (2007)			MMA > 0.26 µmol/L	0.80 versus 0.68
Lloyd-Wright et al. (2003)			MMA > 0.75 µmol/L	0.87 versus 0.86
Miller et al. (2006)			holoTC < 35 pmol/L	0.828 versus 0.816
Obeid and Herrmann (2007a)	0.72		MMA > 0.300 µmol/L	0.71 versus 0.60
Palacios et al. (2013)	0.44 versus 0.20	0.94 versus 0.94	HoloTC < 35 pmol/L	0.75 versus 0.69
Schrepf et al. (2011)	0.563 versus 0.662	0.505 versus 0.621	MMA > 47 µg/L	0.66 versus 0.72
Scott et al. (2007)			MMA > 0.75 µmol/L	0.85 versus 0.75, 0.74, 0.72
Valente et al. (2011)	0.55 versus 0.33	0.96 versus 0.95	Red cell cobalamin <33 pmol/L	0.90 versus 0.80

Clarke et al. (2007) compared the HoloTC immunoassay to two assay methods for total vitamin B₁₂: Beckman and Centaur

Scott et al. (2007) compared the HoloTC immunoassay to three assay methods for total vitamin B₁₂: Beckman, Centaur and micro assays

AUC, area under ROC curve for HoloTC or total vitamin B₁₂; ROC curve, Receiver Operating Characteristic = sensitivity versus (1 – specificity) = true positive versus false positive (Miller et al. 2006); Cut-off, analyte and cut-off value used to define vitamin B₁₂ deficiency

Conclusion des études comparatives HTC – B12

Table 3 Sensitivity and specificity—HoloTC versus B₁₂—original research conclusions

Positive conclusions	Negative or neutral conclusions
Augoustides-Sawopoulou et al. (2007)	Al Aisari et al. (2010)
Bhat et al. (2009)	Chen et al. (2005)
Black et al. (2006)	Clarke et al. (2007)
Bor et al. (2004)	Goringe et al. (2006)
Čabarkapa et al. (2007)	Loikas et al. (2003)
Fragasso et al. (2012)	Loikas (2007)
Heil et al. (2012)	Miller et al. (2006)
Herrmann et al. (2003a)	Nilsson et al. (2004)
Herrmann et al. (2005)	Palacios et al. (2013)
Herrmann and Obeld (2013)	Remacha et al. (2014)
Hvas and Nexø (2003)	Schrempf et al. (2011)
Hvas and Nexø (2005)	Sobczyńska-Malefora et al. (2014)
Lee et al. (2009)	van Asselt et al. (2003)
Lindemans et al. (2007)	
Lindgren et al. (1999)	
Lloyd-Wright et al. (2003)	
Lobreglio et al. (2008)	
Morkbak et al. (2007)	
Nexø et al. (2002a)	
Obeld and Herrmann (2007a)	
Scott et al. (2007)	
Serefhanoglu et al. (2008)	
Sikaris (2010)	
Valente et al. (2011)	
Vanpoucke et al. (2007)	
Woo et al. (2010)	

Positive, neutral or negative conclusions are as understood by this author to be the intention of authors of cited article

Quotations from original reports are available in tables in Microsoft Excel spreadsheet file, Additional file 3

Corrélation avec le vitamine B12 totale

Table 6 Correlation between total vitamin B₁₂ and HoloTC

Reference	HoloTC versus B ₁₂ correlation coefficient (r)
Al Aisari et al. (2010)	0.765
Augoustides-Savvopoulou et al. (2007)	0.882
Bamonti et al. (2010)	0.42
Čabarkapa et al. (2007)	0.53
Chen et al. (2005)	0.45
Clarke et al. (2007)	0.61
Fragasso et al. (2012)	0.64
Goringe et al. (2006)	0.63 ($r^2 = 0.397$)
Herrmann et al. (2003a)	0.75
Herrmann and Obeid (2013)	0.577 (whole), 0.524 (low B ₁₂), 0.403 (high B ₁₂)
Hvas and Nexo (2005)	0.71
Lee et al. (2009)	0.6591
Lloyd-Wright et al. (2003)	0.75
Lobreglio et al. (2008)	0.495
Loikas et al. (2003)	0.80
Loikas (2007)	0.78
Nexo et al. (2002b)	0.45
Palacios et al. (2013)	0.65
Refsum et al. (2006)	0.65 (male), 0.61 (female)
Schrempf et al. (2011)	0.577–0.637
Scott et al. (2007)	0.5
Vanpoucke et al. (2007)	0.53 ($r^2 = 0.28$)

Herrmann and Obeid (2013) reported three values for r: for the whole range of total vitamin B₁₂; for low values of vitamin B₁₂; for high values of vitamin B₁₂

Refsum et al. (2006) reported separate values for r for males and females

Table 5 Half-life of HoloTC

Reference	Half-life HoloTC
Axis-Shield (2007b)	1–2 h
Bor et al. (2004)	1–12 h
Carmel and Agrawal (2012)	Minutes
Chatthanawaree (2011)	1 h
Chen et al. (2005)	Few hours
Green (2007)	6 min
Herbert (1994)	6 min
Herrmann et al. (2003a)	6 min
Hvas et al. (2005)	1–2 h
Lindgren et al. (1999)	1–2 h
Loikas et al. (2003)	60 min
Quadros (2010)	1–2 h
von Castel-Roberts et al. (2007)	18 h

Homocystéine

Valeur de référence
5 - 15 $\mu\text{mol/L}$

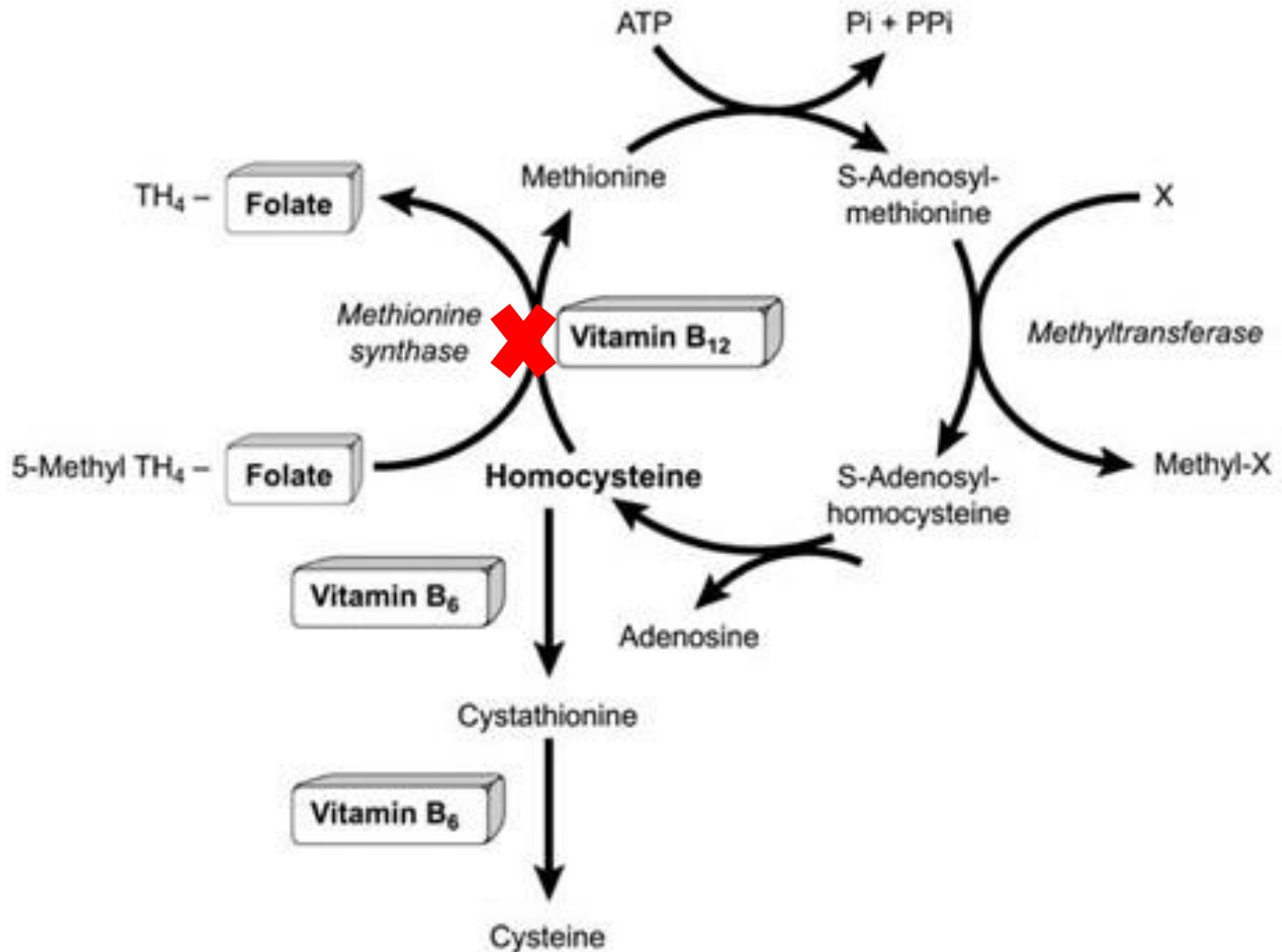
- Méthodes chromatographiques : GC-MS ou HPLC
- Méthodes enzymatiques : radioenzymatique ou immunoenzymatique

Peu spécifique

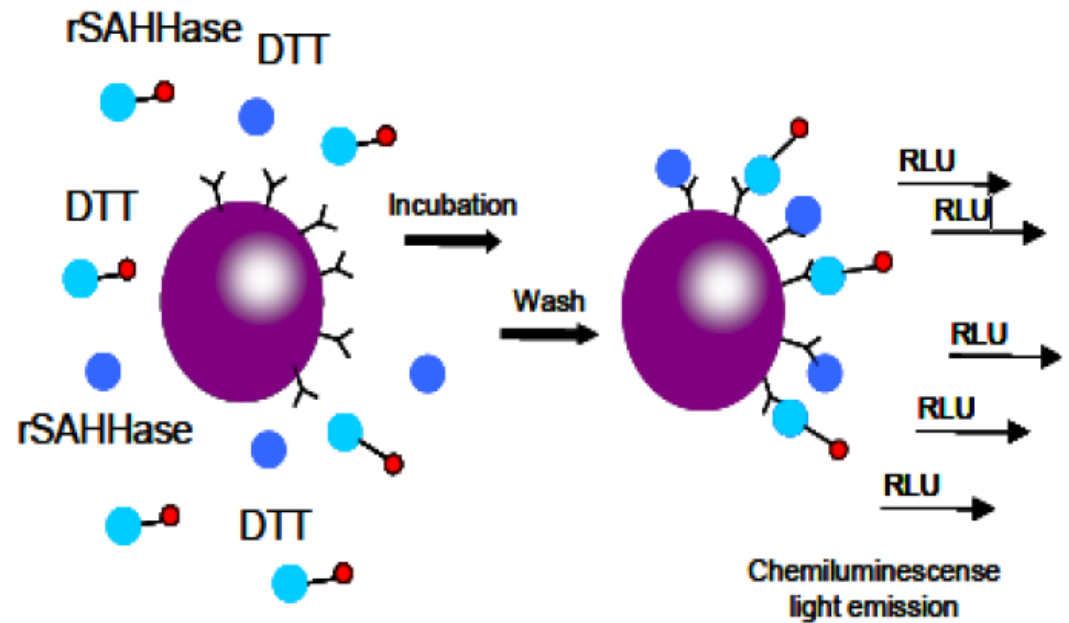
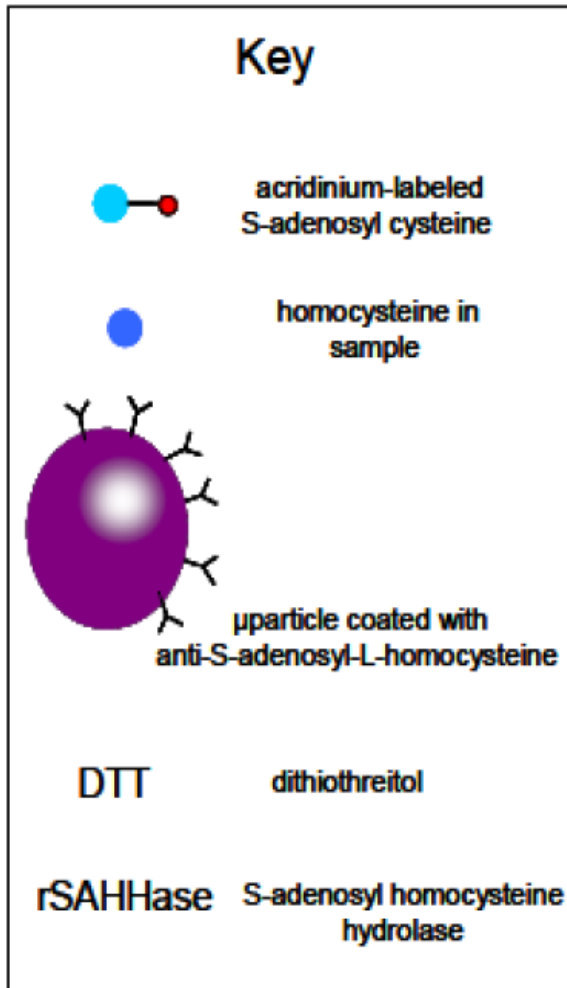
Evaluation du risque cardio-vasculaire

Techniques de dosages

Homocystéine



Homocystéine

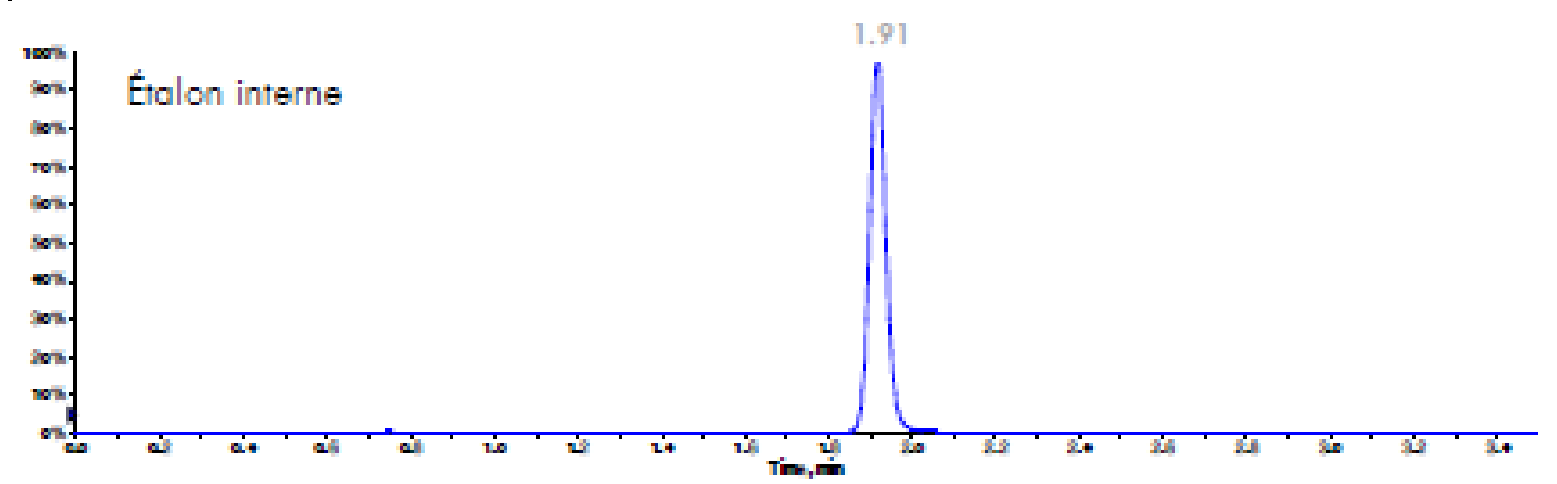
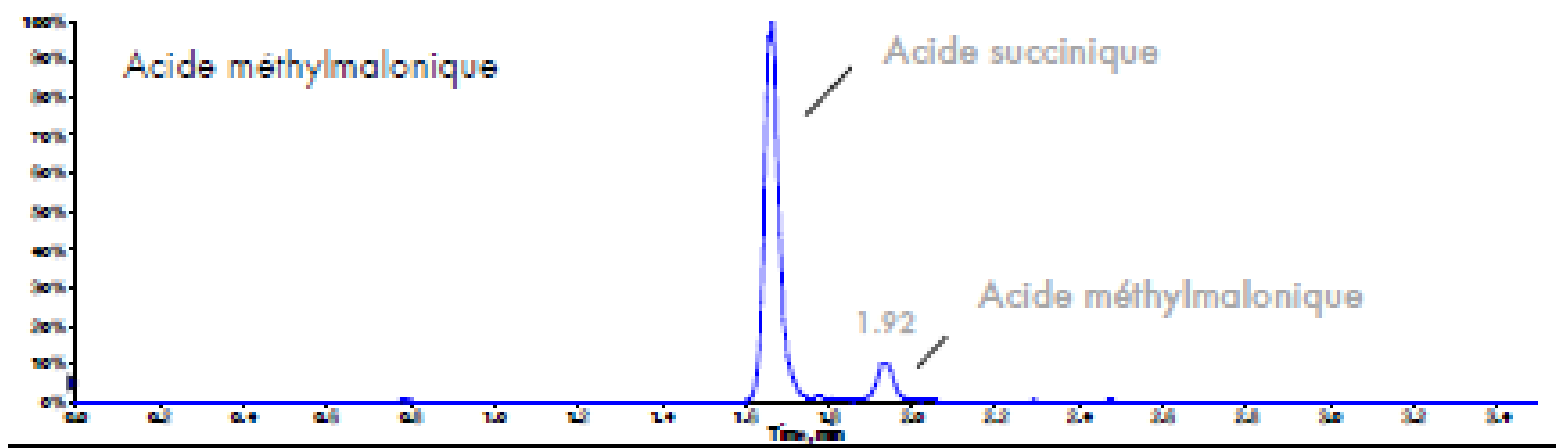


Acide méthyl malonique

Valeur de référence
50 – 440 nmol/L

Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

- Etape de précipitation manuelle
- Ionisation par électrospray (ESI)
- Mesure en Multiple Reaction Monitoring (MRM)



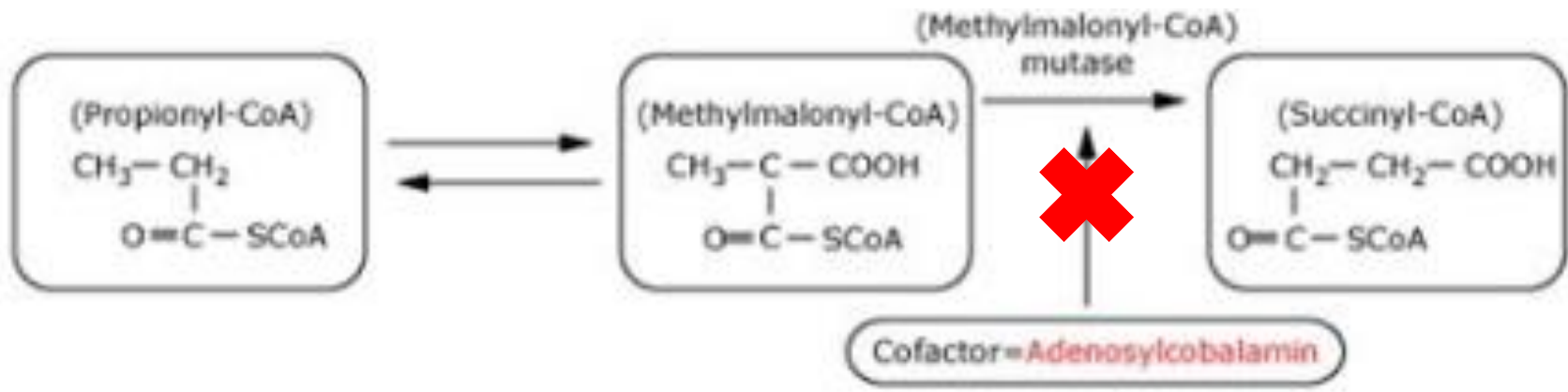


Table 2 Sensitivity and specificity—HoloTC versus B₁₂—original research data

Reference	Sensitivity	Specificity	Cut-off	AUC
Bamonti et al. (2010)	0.74	0.52	HoloTC < 40 pmol/L	0.75
Clarke et al. (2007) (definite deficiency)	0.771 versus 0.757	0.761 versus 0.724	MMA > 0.75 µmol/L	0.85 versus 0.76
Clarke et al. (2007) (probable deficiency)	0.647 versus 0.626	0.792 versus 0.748	MMA > 0.45 µmol/L	0.79 versus 0.87
Goringe et al. (2006)			HoloTC < 38 pmol/L	0.75 versus 0.72
Heil et al. (2012)	0.83 versus 0.64	0.60 versus 0.64	MMA > 0.45 µmol/L	0.78 versus 0.70
Herrmann et al. (2003a)	0.87 versus 0.45	0.75 versus 0.98	MMA > 0.271 µmol/L	0.879 versus 0.836
Herrmann and Obeid (2013)	0.72 versus 0.72	0.54 versus 0.41	MMA > 0.300 µmol/L	0.714 versus 0.632
Hvas and Nexø (2003)	1.0	0.89		
Hvas and Nexø (2005)			MMA > 0.75 µmol/L	0.90 versus 0.85
Lindemans et al. (2007)			MMA > 0.26 µmol/L	0.80 versus 0.68
Lloyd-Wright et al. (2003)			MMA > 0.75 µmol/L	0.87 versus 0.86
Miller et al. (2006)			holoTC < 35 pmol/L	0.828 versus 0.816
Obeid and Herrmann (2007a)	0.72		MMA > 0.300 µmol/L	0.71 versus 0.60
Palacios et al. (2013)	0.44 versus 0.20	0.94 versus 0.94	HoloTC < 35 pmol/L	0.75 versus 0.69
Schrempf et al. (2011)	0.563 versus 0.662	0.505 versus 0.621	MMA > 47 µg/L	0.66 versus 0.72
Scott et al. (2007)			MMA > 0.75 µmol/L	0.85 versus 0.75, 0.74, 0.72
Valente et al. (2011)	0.55 versus 0.33	0.96 versus 0.95	Red cell cobalamin <33 pmol/L	0.90 versus 0.80

Clarke et al. (2007) compared the HoloTC immunoassay to two assay methods for total vitamin B₁₂: Beckman and Centaur

Scott et al. (2007) compared the HoloTC immunoassay to three assay methods for total vitamin B₁₂: Beckman, Centaur and micro assays

AUC, area under ROC curve for HoloTC or total vitamin B₁₂; ROC curve, Receiver Operating Characteristic = sensitivity versus (1 – specificity) = true positive versus false positive (Miller et al. 2006); Cut-off, analyte and cut-off value used to define vitamin B₁₂ deficiency

Techniques de dosages

Quel type de dosage choisir?

Combinaison de plusieurs marqueurs?

Combinaison de plusieurs marqueurs?

- HTC puis MMA si <75 pmol/L (**Hermann and Obeid, 2008**)
- Si HCY > 9 μ M => tester B12 totale et folate (**Schedvin et al., 2005**)
- Si B12 < 118 pmol/L => tester MMA, si $>0,8$ μ mol/L => supplémenter en vitamine B12 (**Berg and Shaw, 2013**)
- Recommandation du *British Committee for standards in Hematology* (**Devalia et al. 2014**)
- Combinaison du folate sérique, folate érythrocytaire, HTC et MMA (**Palacios et al., 2013**)

Combinaison de plusieurs marqueurs?

TABLE 1 | Ranges of combined vitamin B₁₂ status, their equivalence to single cut-off values, and clinical interpretation.

Combined vitamin B ₁₂ status	Equivalence to single cut-points	Interpretation
Elevated B ₁₂ >1.5	B ₁₂ > 650 Holo-TC > 190 tHcy < 8.0 MMA < 0.11	The biological effects of high vitamin B ₁₂ are not fully understood
Adequate B ₁₂ -0.5 to 1.5	186 < B ₁₂ < 650 37 < holo-TC < 190 13.6 > tHcy > 8.0 0.35 < MMA < 0.11	Expected to support normal B ₁₂ -dependent functions
Low B ₁₂ -1.5 to -0.5	119 < B ₁₂ < 186 20 < holo-TC < 37 19.2 > tHcy > 13.6 0.64 < MMA < 0.35	Subclinical deficiency. No hematological changes, subtle neurological impairment
Possible B ₁₂ deficiency -2.5 to -1.5	116 < B ₁₂ < 119 8.4 < holo-TC < 20 51 > tHcy > 19.2 1.7 < MMA < 0.64	Potential manifestations of vitamin B ₁₂ deficiency
Probable B ₁₂ deficiency < -2.5	B ₁₂ < 116 holo-TC < 8.4 tHcy > 51 MMA > 1.7	Clinical manifestations of vitamin B ₁₂ deficiency

Units: B₁₂ and holo-TC are expressed in pmol/L, and tHcy and MMA in μmol/L. Table adapted from Fedosov et al. (2015).

Take home message

- Manque de standardisation entre les méthodes de dosage de la vitamine B12 totale
- Nombreuses interférences analytiques pouvant empêcher le diagnostique de déficience en vitamine B12
- Choix entre différents marqueurs diagnostiques de la carence en B12 mais aucun n'est suffisamment spécifique et sensible pour diagnostiquer seul toutes les déficiences en B12
- Pas de consensus sur les cut-offs utilisés pour les différents tests de laboratoire disponibles
- Place de la holotranscobalamine en routine reste encore à déterminer

Merci pour votre attention !