

Stato carenziale preclinico della vitamina B₁₂ in soggetti asintomatici: importanza del dosaggio dell'olotranscobalamina (vitamina B₁₂ attiva)

Cristina Novembrino¹, Rachele De Giuseppe², Valentina Uva², Paola Bonara³, Giovanna Moscato⁴, Claudio Galli⁵, Rita Maiavacca⁶, Fabrizia Bamonti²

¹Dipartimento di Scienze Neurologiche, ²Dipartimento di Scienze Mediche, ³Laboratorio di Citometria a Flusso, Università degli Studi, Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Fondazione IRCCS, Milano

⁴Laboratorio Analisi, Azienda Ospedaliero-Universitaria Pisana, Ospedale di Cisanello, Pisa

⁵Abbott Diagnostici, Roma

⁶Laboratorio di Patologia Clinica, Dipartimento Area Servizi Diagnostici, Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Fondazione IRCCS, Milano

Il presente contributo è stato selezionato fra tutti i poster presentati in occasione del 14° Simposio Ligand Assay 2007 per l'assegnazione del Premio ELAS-FORUM

RIASSUNTO L'identificazione precoce della carenza di cobalamina (tB₁₂) è importante in soggetti asintomatici e con livelli di tB₁₂ normali, ma a rischio di sviluppare deficit vitaminico in seguito ad un particolare stato fisiologico o stile di vita. La carenza, anche latente, di cobalamina può comportare, tra l'altro, iperomocisteinemia. Per valutare l'utilità clinico-diagnostica della determinazione dell'Olotranscobalamina (Holo-TC), frazione attiva della tB₁₂, è stato analizzato lo status della cobalamina in 227 soggetti suddivisi in 5 gruppi (anziani, forti fumatori, obesi, donne in terapia estroprogestinica, vegani). Per ciascun soggetto veniva determinato il metabolismo dell'omocisteina e delle vitamine metabolicamente correlate (tB₁₂ e folato). In ciascun gruppo erano presenti soggetti con moderata iperomocisteinemia, in parte dovuta al deficit di cobalamina (anche con folato nella norma). Il deficit di tB₁₂ (<164pM) era presente in circa il 50% dei soggetti carenti di HoloTC (<40pM). La debole correlazione tra tB₁₂ e Holo-TC (R²=0,39) indicava che la carenza della tB₁₂ e della sua frazione biologicamente attiva non sempre coincidono. La determinazione di Holo-TC può quindi evidenziare una carenza di cobalamina anche in presenza di valori di tB₁₂ normali. Il nostro studio suggerisce l'utilità di una sua valutazione soprattutto in soggetti asintomatici.

Parole chiave: Carenza di Cobalamina, Vitamina B₁₂, Olotranscobalamina, Iperomocisteinemia, Folato

ABSTRACT **Sub-clinical vitamin B₁₂ deficiency in asymptomatic subjects: the importance of holotranscobalamin (Holo-TC i.e. active B₁₂) assay.** **Introduction:** Vitamin B₁₂ (cobalamin) is essential to mammalian intracellular metabolism. Low intake or impaired intestinal absorption of this vitamin may lead to a negative nutritional balance and, finally, to functional deficiency when tissue stores are depleted. In order to avoid possible hematological and/or, sometimes irreversible, neurological complications, it is important to prevent vitamin B₁₂ deficiency. The prevalence of a sub-clinical cobalamin deficiency is higher than previously expected in the general population. An early identification of vitamin deficiency is crucial especially in asymptomatic subjects with normal total circulating B₁₂ (tB₁₂) concentrations but at higher risk of developing cobalamin deficiency due to a physiological condition and/or lifestyle. Moreover, cobalamin and/or folate low levels or deficiency in our diet result in moderate hyperhomocysteinemia. Serum tB₁₂ is bound to two proteins, transcobalamin (TC) and haptocorrin (HC). Only transcobalamin-cobalamin complex (holotranscobalamin, Holo-TC i.e. Active B₁₂), a minor fraction of circulating tB₁₂, is available for ubiquitous cellular uptake and, therefore, physiologically relevant. The serum tB₁₂ assay is a widely applied standard method, but the test itself has poor predictive value. A good monitoring of cobalamin status should include measuring Holo-TC, folate and homocysteine (Hcy) concentrations. **Aim:** In order to evaluate whether or not Holo-TC determination is clinically and diagnostically useful, cobalamin status was assessed in 227 apparently healthy subjects. **Materials and Methods:** The subjects were divided into 5 groups as follows: elderly (19M/21F, aged 73±7 years), heavy smokers (35M/26F, aged 51±10 years), obese (25M/60F, aged 44±11 years, BMI>30), women on estroprogestinic therapy, EPT (21F, aged 27±4 years), vegans (11M/9F, aged 45±12 years). Data on medical history, lifestyle and diet were obtained by interviews and questionnaires. For each subject, serum tB₁₂ and Holo-TC, serum and erythrocyte folate and plasma Hcy concentrations were determined by immunoenzymatic methods using relevant kits on AxSYM analyser (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA). **Results:** Subjects with Holo-TC concentrations below 40 pmol/L cut-off (43% elderly, 28% smokers, 21% obese, 43% EPT women) were about twice as many as those with tB₁₂ concentrations below 164 pmol/L cut-off (20% elderly, 11% smokers, 7% obese, 24% EPT women). Vegans' Holo-TC and tB₁₂ deficiency percentages were both higher than in the other groups (77%) due to a strictly vegetarian diet. Interestingly, Holo-TC deficiency does not always correspond to tB₁₂ deficiency because of a weak correlation between the two analytes (R²= 0.39). Moderate hyperhomocysteinemia was present in 70% elderly people, 56% smokers, 45% obese, 29% EPT women, 71% vegans, partly due to cobalamin deficiency rather than to folate insufficiency. **Discussion:** Treatment of sub-clinical functional B₁₂ deficiency is important to prevent neurological

and/or hematological complications and/or elevated Hcy concentrations but requires a reliable diagnosis. According to our findings, serum Holo-TC and total vitamin B₁₂ determination can help evaluate B₁₂ status especially in asymptomatic or seemingly healthy subjects with no evidence of total vitamin B₁₂ deficiency but at risk of developing it because of a physiological condition and/or lifestyle. On the basis of our evaluations and in agreement with other authors' studies, the assessment of all the above analytes, performed on a unique automatic analyser, provides a reliable and useful diagnostic tool, which can be used as a fully predictive "panel" of tHcy concentrations (the high prevalence of hyperhomocysteinemia is frequently due to vitamin B deficiency). In particular, we want to highlight the importance of the new Holo-TC assay, which helps define B₁₂ status and, in some cases, an early intracellular B₁₂ deficiency. In conclusion, the determination of Holo-TC (Active B₁₂) may, therefore, be used as a complementary diagnostic strategy to avoid the development of pathological complications (macrocytic anemia or neurological disease) before symptoms emerge and as a parameter in large scale screening of subjects at latent risk of cobalamin deficiency.

Keywords: Cobalamin deficiency, Vitamin B₁₂, Holotranscobalamin, Hyperhomocysteinemia, Folate

INTRODUZIONE

La cobalamina o vitamina B₁₂ (B₁₂), vitamina fotosensibile ed idrosolubile, è essenziale per la proliferazione ed il differenziamento cellulare e per il metabolismo dei composti monocarboniosi^{1,2}.

La B₁₂ assunta con la dieta si lega nello stomaco ad una proteina trasportatrice che ne permette il passaggio nell'intestino; qui, staccatasi dal trasportatore, si lega al Fattore Intrinseco, prodotto dallo stomaco, e legata ad esso giunge nell'ultimo tratto dell'intestino tenue dove il complesso viene assorbito e diffuso in circolo. La B₁₂ presente nel siero è legata a due proteine: aptocorrina (HC) e transcobalamina (TC). L'HC lega il 70-90% della cobalamina sierica, ma è considerata metabolicamente inerte perché i suoi recettori specifici sono stati dimostrati solo a livello epatico. Il restante 10-30% della cobalamina si lega alla TC II dando luogo al complesso olotranscobalamina (Holo-TC o Vitamina B₁₂ Attiva), che rappresenta la quota biologicamente attiva della cobalamina, in quanto promuove l'ingresso della B₁₂ ad essa legata in tutte le cellule attraverso specifici recettori ubiquitari³.

Un ridotto apporto di cobalamina con la dieta o un malassorbimento intestinale possono portare ad un bilancio negativo e col tempo, quando i depositi tissutali sono esauriti, ad una carenza severa.

Le conseguenze cliniche della carenza di cobalamina comprendono patologie ematologiche, quali l'anemia megaloblastica, e patologie progressive del sistema nervoso centrale e periferico ed inoltre, essendo la cobalamina cofattore nella reazione di rimetilazione dell'omocisteina (Hcy) a metionina, una sua carenza può causare iperomocisteinemia (HHcy), noto fattore indipendente di rischio cardiovascolare³⁻⁵. È noto che la cobalamina ed il folato sono rispettivamente cofattore e cosubstrato delle reazioni enzimatiche coinvolte nel metabolismo dell'omocisteina.

La valutazione della cobalamina circolante viene fatta routinariamente mediante il dosaggio delle concentrazioni sieriche della vitamina B₁₂ totale (tB₁₂); tuttavia, come sta emergendo sempre più dalla letteratura^{3,6,7}, questo dosaggio ha un'accuratezza diagnostica limitata (bassa sensibilità) poiché, nella maggioranza dei casi, risulta "diagnosticamente" utile quando sono già comparse evidenze clinico-ematologiche, ovvero nello stadio avanzato della malattia, ma non è in grado di rivelare un eventuale deficit vitaminico a livello intracellulare, dove possono essere già

in atto danni irreversibili. Poiché i segni clinici rappresentano uno stadio abbastanza tardivo del deficit di B₁₂, è risultato di fondamentale interesse diagnostico l'individuazione di un marcatore precoce che consentisse di prevenire i danni neurologici irreversibili⁸, intervenendo in modo tempestivo e mirato con un'adeguata supplementazione di tale vitamina.

Alcuni studi hanno evidenziato che la breve emivita in circolo dell'Holo-TC fa sì che una sua diminuzione sia uno degli indici più precoci della carenza di cobalamina; infatti, il dosaggio di tale complesso indica, con maggiore attendibilità l'effettiva concentrazione intracellulare biologicamente attiva della vitamina B₁₂ rispetto a quello della cobalamina sierica totale che, come già spiegato, misura anche la quota di B₁₂ legata alla HC⁶⁻⁹. La concentrazione di Holo-TC risulta essere, inoltre, indipendente da una recente assunzione della vitamina stessa. L'identificazione precoce di uno stato carenziale di cobalamina è importante soprattutto in soggetti asintomatici e con livelli di B₁₂ nella norma, ma esposti ad un rischio più elevato di sviluppare una carenza vitaminica a causa di un particolare stato fisio-patologico e/o dello stile di vita, quali, ad esempio, casi appartenenti alle categorie di seguito descritte:

- a) soggetti anziani, nei quali la carenza di B₁₂ è frequente (>20%), ma molto spesso non è riconosciuta né investigata poiché le sue manifestazioni sono subcliniche. Le principali cause di tale carenza sono dovute ad una ridotta produzione o mancanza di fattore intrinseco (15-20% dei casi), un alterato assorbimento di cobalamina (>60% dei casi), ed un insufficiente apporto dietetico¹⁰
- b) fumatori, nei quali le concentrazioni sieriche di cobalamina sono significativamente più basse di quelle dei non fumatori; è infatti riportato che i nitriti organici, l'ossido nitrico, i cianati e gli isocianati contenuti nel fumo di sigaretta interagiscono con la B₁₂ inattivandola¹¹
- c) soggetti obesi, i quali possono mostrare bassi livelli di micronutrienti come conseguenza di un apporto dietetico e/o di un assorbimento alterati¹²
- d) donne in terapia con estroprogestinici, nelle quali è frequente riscontrare una diminuzione dei livelli sierici di tB₁₂^{13,14}
- e) soggetti vegani i quali sono a rischio di sviluppare una carenza di alcuni nutrienti essenziali, ed in particolare di B₁₂, in quanto la loro dieta prevede solo cibi di origine vegetale¹⁵⁻¹⁷.

Scopo del presente studio è stato, pertanto, quello di determinare lo *status* della cobalamina all'interno del pannello del metabolismo dell'Hcy (Hcy, tB₁₂, folato) in soggetti asintomatici, appartenenti ai suddetti gruppi, al fine di accertare l'utilità clinico-diagnostica della determinazione della sua frazione attiva, Holo-TC, valutando la prevalenza di casi "a rischio silente".

MATERIALI E METODI

Nello studio osservazionale sono stati arruolati 227 soggetti suddivisi in cinque gruppi sulla base del loro stato fisio-patologico e dello stile di vita: anziani, gruppo A (19 maschi e 21 femmine, età 73±7 anni); forti fumatori senza problemi respiratori, gruppo F (35 maschi e 26 femmine, età 51±10 anni); obesi, gruppo O (25 maschi e 60 femmine, età 44±11 anni, BMI >30); donne in terapia con estrogeni, gruppo EPT (21 femmine, età 27±4 anni); vegani, gruppo V (11 maschi e 9 femmine, età 45±12 anni). Per tutti i soggetti esaminati i criteri di esclusione dallo studio erano: malattie croniche (in particolare epatopatie, malassorbimento, ipotiroidismo) e/o neoplastiche; malattie cardiovascolari; ipertensione; diabete mellito; dislipidemia familiare e/o resistente alla dieta; difetti della coagulazione o trombofilia; reazioni allergiche; terapie croniche, in particolare ipolipemizzanti; assunzione regolare di vitamine o altri integratori alimentari; gravidanza; fumo (ad eccezione del gruppo F).

Per ciascun soggetto sono state determinate sia le concentrazioni plasmatiche di Hcy, con metodica FPIA (*Fluorescence Polarization Immunoassay*), sia le concentrazioni di tB₁₂ e Folato sierico (S-fol) ed eritrocitario (Ery-fol), con metodica MEIA (*Microparticle Enzyme Immunoassay*), mediante l'utilizzo dei rispettivi kit commerciali su analizzatore automatizzato AxSYM (Abbott Diagnostics, USA)¹¹. I livelli sierici di Holo-TC sono stati misurati con il nuovo kit B₁₂ Attiva che sfrutta la stessa tecnologia MEIA su analizzatore AxSYM.

Ciascun soggetto, al mattino a digiuno, veniva sottoposto ad un prelievo di sangue venoso periferico raccolto in

due provette, una contenente anticoagulante EDTA per il dosaggio di Hcy ed Ery-fol, l'altra priva di anticoagulante per la determinazione dei livelli di tB₁₂, S-fol e Holo-TC.

Il campione in EDTA veniva posto immediatamente in ghiaccio (per bloccare il rilascio di Hcy da parte degli eritrociti) e centrifugato entro mezz'ora dal prelievo a 1250 g per 10 minuti; il plasma così ottenuto veniva suddiviso in aliquote e congelato a -80°C fino al momento del dosaggio.

Il campione senza anticoagulante veniva lasciato a temperatura ambiente per almeno un'ora, per consentire il processo di coagulazione, e successivamente centrifugato a 1250 g per 10 minuti; il siero ottenuto veniva suddiviso in aliquote e congelato a -80°C fino al momento del dosaggio. Per tutti i parametri considerati, i valori ottenuti sono stati confrontati con i rispettivi valori di riferimento o cut-off in uso nel nostro laboratorio ricavati da una popolazione di soggetti apparentemente sani.

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il test di correlazione di Pearson.

RISULTATI

In Tabella 1 sono riportati i risultati ottenuti nei vari gruppi di popolazione, espressi come mediana (intervallo interquartile), e la percentuale di soggetti con valori patologici dell'analita.

La Figura 1 mostra la distribuzione dei valori di vitamina B₁₂ totale nei diversi gruppi considerati, con particolare evidenza per i valori patologici, intendendo come tali i livelli di tB₁₂ inferiori a 164 pM. In Figura 2 è invece riportata la distribuzione dei valori di olotranscobalamina nei diversi gruppi considerati, con particolare evidenza per i valori patologici, intendendo come tali i livelli di Holo-TC inferiori a 40 pM. La Figura 3 evidenzia la distribuzione dei valori di omocisteina nei diversi gruppi considerati, con particolare evidenza per i valori patologici, intendendo come tali i livelli di Hcy superiori a 10 μM.

Le Figure 4 e 5 mostrano la distribuzione dei valori di folato sierico ed eritrocitario, rispettivamente, nei diversi gruppi considerati; sono evidenziati i valori patologici,

Tabella 1

Concentrazioni dei vari analiti e relativa percentuale di soggetti con valori patologici ottenuti per i diversi gruppi di popolazione indagati. I dati sono espressi come mediana (intervallo interquartile)

Gruppo	tB ₁₂ (pM)	tB ₁₂ <164 pM ^a	Holo-TC (pM)	Holo-TC <40 pM ^a	Hcy (μM)	Hcy >10,0 μM ^{a,b}	S-fol (nM)	S-fol <7 nM ^a	Ery-fol (nM)	Ery-fol < 421 nM ^a
A	237 (202-330)	20%	51,1 (33,9-64,8)	43%	13,4 (10,7-17,9)	70 % ^b	15,6 (12,5-23,5)	0%	704 (552-904)	0%
F	272 (211-351)	11%	58 (43,7-77,7)	28%	10,8 (8,1-13,2)	56%	12,9 (10-17,6)	15%	441 (356-598)	49%
O	275 (225-350)	7%	55,5 (43,8-64,6)	21%	10,4 (8,4-12,4)	45%	16,5 (11,7-22,6)	4%	668 (547-847)	7%
EPT	217 (178-283)	24%	51,2 (37,8-58,5)	43%	8,1 (7,5-11,2)	29%	23,3 (14-28,5)	5%	679 (617-786)	5%
V	118 (72-164)	77%	15,4 (7,9-33,8)	77%	14,2 (10,1-18,7)	71%	34,8 (28,7-37,3)	0%	1070 (731-1660)	0%

^acut-off di normalità utilizzati presso il laboratorio per i differenti analiti

^bper pazienti anziani è stato considerato un cut-off <12,5 μM

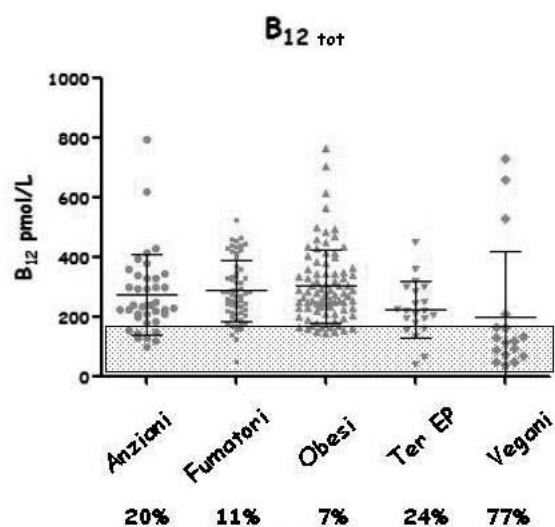


Figura 1
 Diagrammi a distribuzione univariata delle concentrazioni sieriche di vitamina B₁₂ totale nei diversi gruppi considerati; è evidenziato l'intervallo di valori considerati patologici. Sono inoltre riportate le % dei soggetti con valori all'interno di questo intervallo.

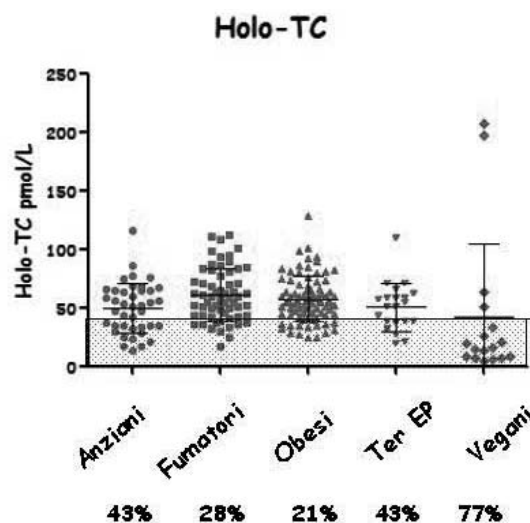


Figura 2
 Diagrammi a distribuzione univariata delle concentrazioni sieriche di olotranscobalamina nei diversi gruppi considerati; è evidenziato l'intervallo di valori considerati patologici. Sono inoltre riportate le % dei soggetti con valori all'interno di questo intervallo.

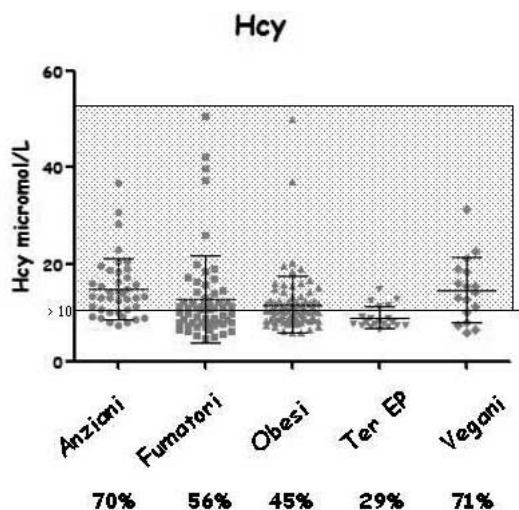


Figura 3
 Diagrammi a distribuzione univariata delle concentrazioni sieriche di omocisteina nei diversi gruppi considerati; è evidenziato l'intervallo di valori considerati patologici. Sono inoltre riportate le % dei soggetti con valori all'interno di questo intervallo.

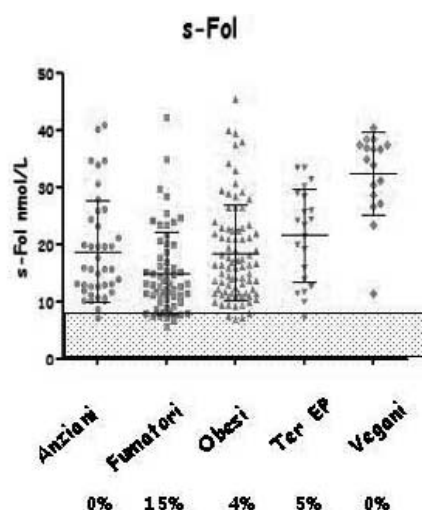


Figura 4
 Diagrammi a distribuzione univariata delle concentrazioni sieriche di folato sierico nei diversi gruppi considerati; è evidenziato l'intervallo di valori considerati patologici. Sono inoltre riportate le % dei soggetti con valori all'interno di questo intervallo.

intendendo come tali i livelli di S-fol ed Ery-fol inferiori a 7 nM e 421 nM rispettivamente.

Per quanto riguarda lo *status* della cobalamina, in Figura 6 sono messi a confronto, per ciascun gruppo, le percentuali dei soggetti con valori patologici dei due analiti (tB₁₂ e Holo-TC).

DISCUSSIONE

Le manifestazioni cliniche della carenza di cobalamina rappresentano lo stadio tardivo del deficit comportando anemia megaloblastica e/o disordini neuropsichiatrici; in particolare, una carenza di B₁₂, se non trattata, conduce alla degenerazione irreversibile del sistema nervoso.

Per questo motivo una diagnosi precoce di carenza di tale vitamina risulta essere molto utile per consentire un tempestivo intervento con una supplementazione e prevenire pertanto danni neurologici irreversibili¹⁵. Attualmente è possibile dosare l'olotranscobalamina quale analita che può evidenziare precocemente una carenza di vitamina B₁₂. Come è noto, la vitamina B₁₂ è coinvolta, assieme al folato, nel metabolismo dell'omocisteina, nel quale sono rispettivamente cofattore e cosubstrato delle reazioni enzimatiche ed una carenza di una o entrambe le vitamine può portare ad iperomocisteinemia, noto fattore indipendente di rischio cardiovascolare¹⁷.

Recenti studi hanno riportato che l'omocisteina, oltre all'acido metilmalonico, si è dimostrata essere un analita

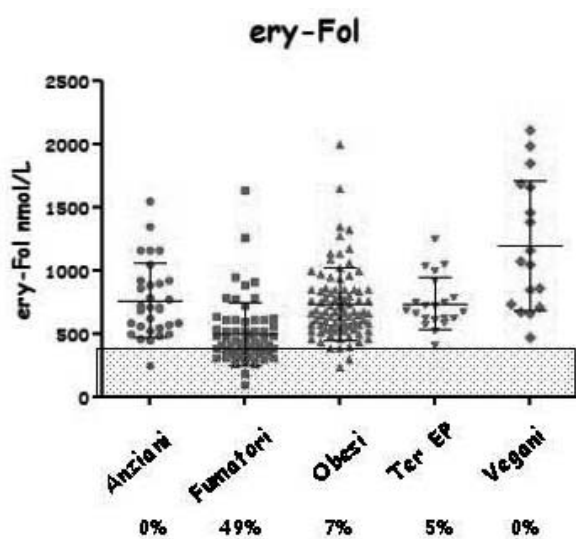


Figura 5
Diagrammi a distribuzione univariata delle concentrazioni sieriche di folato eritrocitario nei diversi gruppi considerati; è evidenziato l'intervallo di valori considerati patologici. Sono inoltre riportate le % dei soggetti con valori all'interno di questo intervallo.

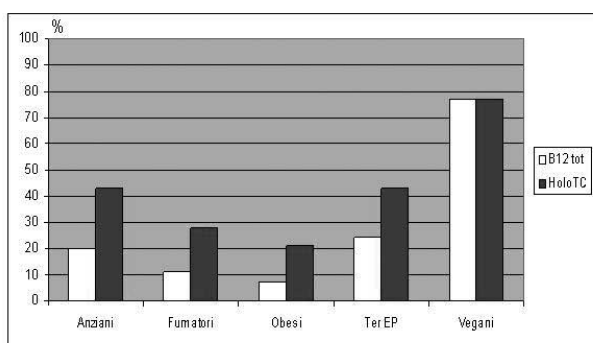


Figura 6
Istogrammi relativi alle percentuali dei soggetti con valori patologici di vitamina B₁₂ totale e di olotranscobalamina nei diversi gruppi esaminati

più sensibile rispetto alla tB₁₂ nella diagnosi di carenza di cobalamina in fase subclinica, poiché l'incremento dei suoi livelli plasmatici precede i sintomi clinici. Questo parametro mostra tuttavia un importante limite che è rappresentato dall'aspecificità; i livelli di Hcy, infatti, risentono di fattori genetici e/o fisiologici, dello stile di vita, di malattie in corso, dell'assunzione di farmaci. Inoltre, l'iperomocisteinemia è presente in soggetti con deficit di folato e/o vitamina B₆ e con insufficienza renale.

In tutti i gruppi considerati nel nostro studio una percentuale non trascurabile di soggetti (29-71%) ha presentato iperomocisteinemia di grado lieve o moderato; poiché la percentuale di soggetti che riportavano un deficit di folato è risultata essere piuttosto bassa, o addirittura nulla (0-15%) in alcuni gruppi, si può ragionevolmente supporre che le elevate concentrazioni di Hcy siano in parte dovute ad un deficit di vitamina B₁₂.

Al fine di valutare l'attendibilità dell'Holo-TC quale indice precoce dello stato della cobalamina, è stato analizza-

to lo *status* della vitamina B₁₂ in soggetti asintomatici che, sulla base dello stato fisiologico (quali, ad esempio, l'età) e dello stile di vita (quali, ad esempio, il fumo), sono maggiormente esposti al rischio di ipovitaminosi.

I risultati ottenuti sembrano confermare una carenza di vitamina B₁₂ in una buona percentuale dei soggetti analizzati. In accordo con gli studi precedenti, che riportano un rischio crescente di sviluppare una carenza di cobalamina correlata all'avanzare dell'età¹⁸, anche noi abbiamo riscontrato un deficit della B₁₂ ed una lieve o moderata iperomocisteinemia nel 70% dei soggetti anziani analizzati.

Per quanto riguarda i soggetti fumatori, ridotti livelli di cobalamina sono solitamente attribuiti all'interazione tra la metilcobalamina e la cianide inalata attraverso il fumo di sigaretta, che trasforma la B₁₂ in un composto biologicamente inattivo¹¹.

Una lieve o moderata iperomocisteinemia era presente nel 56% dei fumatori e bassi livelli di folato intraeritrocitario nel 49%: ciò conferma la tossicità subdola del fumo derivante non solo da un effetto diretto delle sostanze nocive inalate ma anche da uno stato nutrizionale generalmente carente di molte vitamine. È infatti noto in letteratura che il fumo di sigaretta è un fattore dello stile di vita strettamente ed indipendentemente associato ad un aumentato rischio di patologie cardiovascolari, come dimostrato dall'aumento, anche se lieve o moderato, dell'omocisteina¹¹.

È riportato nella letteratura anglosassone che soggetti sovrappeso od obesi mostrano concentrazioni di nutrienti più basse dei soggetti normopeso, come conseguenza di un insufficiente apporto dietetico o di alterazioni a livello dell'assorbimento, della distribuzione e del metabolismo dei micronutrienti¹². I soggetti obesi del nostro studio presentavano valori di tB₁₂ inferiori alla norma e valori di Holo-TC inferiori al cut-off in una percentuale non molto alta di soggetti (7% e 21% rispettivamente), forse grazie alla dieta di tipo mediterraneo che riesce a bilanciare in soggetti ancora abbastanza giovani gli squilibri derivanti dal loro stato.

In letteratura i dati riguardanti l'associazione tra l'uso di estrogeni e le concentrazioni plasmatiche di tB₁₂ sono contrastanti: alcuni studi hanno dimostrato una diminuzione significativa dei livelli sierici di cobalamina nelle donne in terapia estrogenica rispetto ai controlli^{13,19}, mentre altri autori non hanno riscontrato variazioni²⁰. I nostri risultati mostrano che una percentuale non bassa delle donne in terapia estrogenica presenta una carenza di tB₁₂ e soprattutto di Holo-TC; inoltre, considerata la loro giovane età, la presenza di una lieve iperomocisteinemia nel 30% circa di esse è un segnale da non sottovalutare.

Per quanto riguarda la dieta vegetariana, è noto che essa promuove salute e longevità e riduce il rischio di malattie cardiovascolari; tale dieta tuttavia è ad alto rischio di sviluppare carenze di nutrienti essenziali, quali alcune vitamine e più precisamente quelle derivanti da prodotti di origine animale. Lo *status* di alcune vitamine del gruppo B, ed in questi casi soprattutto la B₁₂, può a sua volta influenzare il buon funzionamento di tutti i metabolismi correlati.

Nel nostro studio, e come già ampiamente riportato in letteratura¹⁵, è emerso che un'alta percentuale dei vegani analizzati ha riportato una carenza di B₁₂ e di Holo-TC

(77% dei casi). E' importante evidenziare che molti soggetti, anche giovani, presentavano una moderata iperomocisteinemia, nonostante un adeguato *status* del folato, come risultato dai dosaggi del folato sierico ed intraeritrocitario. E' infatti noto che i danni clinici derivanti da una carenza di cobalamina possono presentarsi anche in presenza di folato nella norma; a questo proposito è necessario ricordare la stretta correlazione esistente tra le due vitamine e la ben nota "trappola dei folati".

Il dato importante che emerge da questo nostro studio osservazionale è il ruolo diagnostico che può svolgere il dosaggio della Holo-TC. Infatti, i gruppi degli anziani (A), dei fumatori (F), dei soggetti obesi (O) e delle donne in terapia estroprogestinica (EPT) presentavano una percentuale molto simile di soggetti con valori di tB_{12} inferiori all'intervallo di riferimento (16% circa); tuttavia tale percentuale risultava essere la metà di quella dei soggetti con valori di Holo-TC inferiori al cut-off (34% circa). Nei soggetti obesi, la percentuale di casi con Holo-TC al di sotto del cut-off era addirittura tripla rispetto a quella dei soggetti con tB_{12} bassa (21% e 7% rispettivamente).

Un'eccezione è rappresentata dai soggetti che seguono una dieta vegana (V): in questo gruppo la stessa percentuale di casi (77%) ha evidenziato una carenza sia di tB_{12} sia di Holo-TC.

Escludendo la popolazione dei vegani nella quale la carenza di cobalamina è tale per cui anche la quota di tB_{12} risulta inferiore alla norma, va tuttavia messo in evidenza che, in accordo con gli studi di altri autori, bassi livelli di Holo-TC non sono in tutti i casi strettamente correlati con basse concentrazioni di B_{12} ($R^2=0,39$)²¹. Infatti solo il 9% di tutti i soggetti mostrava bassi livelli sia di B_{12} sia di Holo-TC.

In accordo con i dati riportati in letteratura, i nostri risultati sembrano quindi confermare l'utilità di Holo-TC quale analita in grado di diagnosticare precocemente una carenza di cobalamina^{1,2,6,8}. E' inoltre consigliabile dosare questo analita insieme con la B_{12} totale in tutti i casi di carenza sospetta e/o subclinica della vitamina.

CONCLUSIONI

In accordo con Gonzalez-Gross et al²² si può affermare che il dosaggio dell'intero pannello di analiti che inquadrano il metabolismo dell'omocisteina, effettuabile su un unico analizzatore automatizzato, può risultare effettivamente utile dal punto di vista clinico-diagnostico.

In particolare, da quanto è emerso dal nostro studio, si può affermare che il dosaggio immunoenzimatico di Holo-TC ha consentito di individuare soggetti che, pur asintomatici e con valori di tB_{12} nella norma, presentavano un reale deficit di cobalamina. Il dosaggio di Holo-TC, risulta pertanto essere attendibile ed idoneo per la valutazione dello stato della cobalamina con un'utilità diagnostica soprattutto a scopo preventivo.

Infine, dal momento che il dosaggio di tB_{12} e della sua frazione attiva Holo-TC fornisce informazioni diverse e, per certi aspetti, complementari, è verosimile che la loro associazione, piuttosto che la misurazione della sola tB_{12} o della sola Holo-TC, possa fornire un migliore inquadramento degli stati carenziali e, soprattutto, consentire di prevenire una carenza latente in soggetti apparentemente sani con adeguato trattamento.

BIBLIOGRAFIA

1. **Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J.** Functional vitamin B_{12} deficiency and determination of Holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1478-88
2. **Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J.** The usefulness of Holotranscobalamin in Predicting Vitamin B_{12} *status* in different clinical settings. *Current Drug Metabolism* 2005; 6:47-53
3. **Carmel R.** Measuring and interpreting holotranscobalamin (holo-transcobalamin II). *Clin Chem* 2002; 48:407-9
4. **Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, Watkins D.** Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology. Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 62-81
5. **Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al.** Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004; 50:3-32
6. **Nexo E, Hvas AM, Bleie O, et al.** Holo-transcobalamin is an early marker of changes in cobalamin homeostasis. A randomized placebo-controlled study. *Clin Chem* 2002; 48:1768-71
7. **Refsum H, Johnston C, Guttormsen AB, Nexø E.** Holotranscobalamin and Total Transcobalamin in human plasma: determination, determinants and reference values in healthy adults. *Clin Chem* 2006; 52:129-37
8. **Hvas A-M, Nexø E.** Holotranscobalamin - a first choice assay for diagnosing early vitamin B_{12} deficiency? *J Intern Med* 2005; 257:289-98
9. **Nexo E, Christensen AL, Hvas A-M, et al.** Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B_{12} deficiency. *Clin Chem* 2002; 48:561-2
10. **Andrès E, Noureddine HL, Noel E.** Vitamin B_{12} (cobalamin) deficiency in elderly patients. *CMAJ* 2004; 171:251-9
11. **Northrop-Clewes CA, Thurnham DI.** Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clin Chim Acta* 2007; 377:14-38. epub 2006 Sep 1. Review
12. **Kimmons JE, Blank HM, Tohill BC.** Association between body mass index and the prevalence of low micronutrient levels among US adults. *MedGenMed* 2006; 8:59
13. **Lussana F, Zighetti ML, Bucciarelli P.** Blood levels homocysteine, folate, vitamin B_6 and B_{12} in women using oral contraceptives compared to non-users. *Thromb Res* 2003; 112:37-41
14. **Sütterlin MW, Bussen SS, Rieger L.** Serum folate and vitamin B_{12} levels in women using modern oral contraceptives (OC) containing 20 μ g ethinyl estradiol. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003; 107:57-61
15. **Herrmann W, Geisel J.** Vegetarian lifestyle and monitoring of vitamin B_{12} *status*. *Clin Chim Acta* 2002; 326:47-59

16. **Herrmann W, Schorr H, Purschwitz K.** Total homocysteine, vitamin B₋₁₂, and total antioxidant *status* in vegetarians. *Clin Chem* 2001; 47:1094-101
17. **Majchrzak D, Singer I, Manner M.** B-vitamin *status* and concentrations of homocysteine in Austrian omnivores, vegetarians and vegans. *Ann Nutr Metab* 2006; 50:485-91
18. **Bates CJ, Schneede J, Mishra G.** Relationship between methylmalonic acid, homocysteine, vitamin B₁₂ and *status* and socio-economic indices, in a subset of participants in the British National Diet and Nutrition Survey of people aged 65y and over. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57:349-57
19. **Riedel B, Björke Monsen AL, Ueland PM.** Effects of oral contraceptives and hormone replacement therapy on markers of cobalamin *status*. *Clin Chem* 2005; 51:778-81
20. **Prasad AS, Lei KY, Moghissi KS.** Effect of oral contraceptives on nutrients. III. Vitamin B₆, B₁₂, and folic acid. *Am J Obstet Gynecol* 1976; 125:1063-9
21. **Herrmann W, Schorr H, Obeid R, Geisel J.** Vitamin B₋₁₂ *status*, particularly holotranscobalamin II and methylmalonic acid concentrations, and hyperhomocysteinemia in vegetarians. *Am J Clin Nutr* 2003; 78:131-6
22. **Gonzalez-Gross M, Sola R, Albers U, et al.** B-vitamins and homocysteine in Spanish institutionalized elderly. *Int J Vitam Nutr Res* 2007; 77:22-33

Per corrispondenza:

Prof.ssa Fabrizia Bamonti
Dipartimento di Scienze Mediche,
Università degli Studi di Milano
Ospedale Maggiore Policlinico,
Mangiagalli e Regina Elena, Fondazione IRCCS
Via F. Sforza, 35 - 20122 Milano
Tel. 02 55033473 - Fax 02 50320403
E-mail: fabrizia.bamonti@unimi.it