

Determinazione della vitamina B₁₂ nel siero: indicazioni per la richiesta e l'interpretazione dei risultati

Simona Ferraro, Alberto Dolci, Roberta Mozzi, Mauro Panteghini

UOC Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco", e Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare, Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche, Università degli Studi, Milano

ABSTRACT

Determination of vitamin B₁₂ in serum: recommendations for test request and result interpretation. The measurement of vitamin B₁₂ (B12) in serum has an overall poor capability to rule out subjects for B12 deficiency. Furthermore, trying to identify those subjects by resorting to one solely test threshold level (e.g., the lower reference limit) may mislead the clinical diagnosis. Clinical laboratories should therefore optimize the test interpretation by replacing in their report the standard reference interval with a categorization of risk for B12 deficiency. Accordingly, a B12 concentration <100 ng/L may indicate a probable B12 deficiency and the need for vitamin supplementation. A possible or unlikely deficiency may be associated with marker results, respectively, below and above 300 ng/L. Finally, in subjects with B12 concentrations >400 ng/L, the vitamin deficiency may be excluded. Hemodialysis patients and pregnant woman have emerged as a target for B12 testing, although cost-effectiveness evaluations are difficult to perform in absence of reliable literature data. Monitoring B12 concentrations in serum to evaluate the effectiveness of B12 supplementation is not clinically useful.

PREMESSE

Cenni di fisiopatologia

Con il termine generico di vitamina B₁₂ (B12) si identifica un gruppo di sostanze chimicamente attive classificate come cobalamine. La B12 viene introdotta con la dieta, assorbita mediante un "carrier" proteico (fattore intrinseco) e trasportata in circolo prevalentemente dalla transcobalamina II. E' principalmente immagazzinata nel fegato e l'eccesso è eliminato per via renale. In condizioni fisiologiche, il fegato è in grado di captare ~1 mg di B12, quantità equivalente a saturare il fabbisogno per 2000 giorni. Per questo, quando la supplementazione dietetica o i meccanismi di trasporto si alterano, il deficit di B12 può non evidenziarsi per oltre 5 anni.

La B12 è necessaria in forma coenzimatica per il corretto funzionamento di almeno 12 sistemi enzimatici (1). Difetti congeniti nel trasporto della B12 o nella sintesi dei coenzimi derivati possono causare condizioni spesso letali, quali chetoacidosi metabolica e metilmalonicoaciduria (deficit di sintesi di adenosilcobalamina) o severa iperomocisteinemia (alterazioni della via della metionina sintetasi), associata

a patologia cardiocerebrovascolare. I deficit di B12 imputabili a malassorbimento o inadeguato apporto causano eritropoiesi inefficace (insufficienza midollare) e patologie demielinizzanti, con degenerazione neurologica (atrofia cerebrale e demenza). In genere, si tratta di condizioni reversibili e correggibili attraverso la supplementazione vitaminica (2).

Utilizzo clinico del dosaggio di B12 sierica

La richiesta del dosaggio di B12 sierica è orientata a definire la presenza del deficit vitaminico principalmente nei pazienti con diagnosi o sospetto di:

- 1) insufficienza midollare e mielodisplasia,
- 2) neuropatia demielinizzante,
- 3) anemia perniziosa (AP), ancora oggi una delle principali cause di malassorbimento e deficit vitaminico (2).

Oltre a tali quadri patologici, la richiesta del dosaggio di B12 viene estesa ad alcune popolazioni a rischio di deficit vitaminico, e di conseguente patologia cardiocerebrovascolare, quali:

- 1) anziani (>70 anni) (prevalenza deficit di B12 pari al 20% dei casi totali) (3);
- 2) casi di malassorbimento vitaminico imputabili a:

Corrispondenza a: Simona Ferraro, UOC Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco", Via GB Grassi 74, 20157 Milano. Tel. 02390442290, Fax. 0250319835, E-mail ferraro.simona@hsacco.it

Ricevuto: 04.03.2014

Revisionato: 13.03.2014

Accettato: 18.03.2014

- a) sindrome da mancata dissociazione di B12 dai "carrier" proteici, associata a ipocloridria,
 - b) patologie gastrointestinali su base infiammatoria e autoimmune, quali gastrite autoimmune, morbo di Crohn, colite ulcerosa, celiachia, nonché cause iatrogene (gastrectomia parziale/totale, bypass gastrico),
 - c) utilizzo/abuso di farmaci, quali inibitori di pompa protonica, metformina, ossido di diazoto/protossido di azoto (2);
- 3) casi di ridotta assunzione di B12 dovuta a restrizioni dietetiche (vegetariani, vegani).

La richiesta del dosaggio di B12 viene inoltre estesa (con modalità di screening e nel corso del "follow-up") a soggetti in cui l'eventuale deficit vitaminico può rappresentare una condizione letale o fortemente invalidante, quali donne in gravidanza e pazienti con insufficienza renale (4). In gravidanza, il deficit condiziona lo sviluppo del sistema nervoso nel feto (5). Allo stesso modo, pazienti con insufficienza renale in dialisi sono, sia per restrizioni dietetiche che a causa del trattamento dialitico stesso, ad alto rischio di deficit di B12. Questo può limitare da un lato l'efficacia dell'emodialisi e dall'altro incrementare la resistenza al trattamento con eritropoietina (6). Se ragioni etiche e/o di costo-efficacia delle terapie depongono in questi casi a favore della determinazione di B12, è importante tuttavia sottolineare che, sia in gravidanza che nell'insufficienza renale, l'interpretazione delle concentrazioni sieriche di B12 può non essere attendibile, a causa di alterazioni degli equilibri proteici e della funzionalità renale. Per questi motivi, in un'ottica preventiva e cautelativa, la supplementazione di B12 (non essendo noti effetti avversi da sovradosaggio) dovrebbe comunque essere avviata indipendentemente dal risultato del marcatore. Non vi sono infine evidenze che supportino l'utilizzo del dosaggio di B12, associato o meno a quello di omocisteina (HCY), nella definizione dell'efficacia clinica della supplementazione di B12 (7).

Richieste di B12 all'Ospedale "Luigi Sacco"

Da una recente valutazione, il numero annuo di dosaggi di B12 eseguiti nell'Azienda Ospedaliera "Luigi Sacco" ammonta a ~6.200. La maggior parte delle richieste (22%) è eseguita dall'UOC Ematologia e Medicina TrASFusionale ed è riferibile a pazienti con mielodisplasie; seguono la Medicina Interna (20% delle richieste) e il Dipartimento di Malattie Infettive (13%). Se si considera l'intervallo di riferimento riferito al sistema analitico in uso presso il nostro laboratorio (Roche Modular EVO: 190-665 ng/L), i risultati ottenuti possono essere così classificati: 6,8% <190 ng/L, 74,7% compreso tra 190 e 665 ng/L, 17,4% compreso tra 666 e 2000 ng/L e 0,1% >2000 ng/L. Avendo il 92,2% dei soggetti valutati concentrazioni fisiologiche o superiori al limite superiore di riferimento, si potrebbe ipotizzare che la maggior parte delle richieste di B12 non sia fondata su uno specifico sospetto clinico e che, in una buona parte dei soggetti, l'esame venga richiesto per monitorare

l'efficacia della supplementazione vitaminica. Considerando un costo reagente per test di 4 €, la spesa annua ammonta a ~25.000 €.

EVIDENZE SULL'UTILITÀ DELLA DETERMINAZIONE DI B12

Nonostante le condizioni riportate nel paragrafo relativo all'utilizzo clinico suggeriscano la necessità di disporre di indicazioni e/o raccomandazioni circostanziate, a oggi non sono disponibili documenti di consenso e/o linee guida relativi alla richiesta ed interpretazione della determinazione di B12 nel contesto clinico, come pure a definizione, diagnosi e monitoraggio dello stesso.

Linee guida internazionali e meta-analisi

La Società Americana di Ematologia non ha mai diffuso specifiche linee guida, nonostante le richieste di B12 siano prevalentemente indirizzate alla valutazione di anemia, pancitopenia e mielopatia. Lo stesso dicasi per le società internazionali di Gastroenterologia nei casi di sospetto clinico di AP.

L'Accademia Americana di Neurologia raccomanda in tutti i soggetti con sospetta polineuropatia la valutazione di B12 e acido metilmalonico (MMA) sierici, con o senza aggiunta di HCY (8). Il documento tuttavia segnala la necessità, in caso di risultati discrepanti tra B12 e metaboliti (e spesso anche tra MMA e HCY), di procedere all'interpretazione dei dati considerando questi ultimi come i marcatori più sensibili di deficit di B12. Un'indicazione simile, esclusivamente orientata alla valutazione di HCY e MMA, è stata rilasciata nel 1998 dall'Istituto Americano di Medicina della Nutrizione (IM-FNB) (9). Anche questo documento allerta, in modo forse più incisivo del precedente, sulla possibile scarsa concordanza tra i risultati di MMA e HCY. Inoltre, è importante evidenziare come in fase di monitoraggio, IM-FNB raccomandi esclusivamente la valutazione della risposta ematologica (conteggio eritrociti/reticolociti, concentrazione ematica dell'emoglobina ed ematocrito) come indice accurato di successo terapeutico.

L'Istituto Nazionale Americano di Salute Pubblica e Nutrizione (NHANES) ha recentemente raccomandato il monitoraggio dello stato vitaminico nella popolazione generale, suggerendo la valutazione congiunta della B12 sierica [o dell'olotranscobalamina (holoTC)] e di un marcatore funzionale di B12 (preferibilmente MMA) (10). L'Associazione Americana di Dietetica e dei Dietologi Canadesi, nelle linee guida per i vegetariani, non riporta alcuna indicazione relativa agli esami di laboratorio utili per la valutazione dello status vitaminico, ma solo raccomandazioni relative alla supplementazione di B12 (11). Allo stesso modo, la Società degli Ostetrici e Ginecologi canadesi ha rilasciato chiare raccomandazioni relative alla supplementazione, ma non richiede la valutazione di alcun marcatore prima di avviare il trattamento (12). Anche per i pazienti con insufficienza renale cronica le raccomandazioni sono

rilasciate soltanto in merito al trattamento e non alla valutazione di laboratorio dello status vitaminico. Infine, nel caso di deficit funzionale noto o sospetto (soprattutto deficit genetici ed ereditari nel neonato), la valutazione di B12 non si è dimostrata utile neppure per individuare la popolazione a rischio da sottoporre agli esami genetici (13, 14).

L'unica meta-analisi presente in letteratura (gruppo ASTUTE, "Assessing Service and Technology Use to Enhance Health") dimostra la scarsa capacità del test di individuare [stima del rapporto di verosimiglianza positivo (LR+)] o di escludere il deficit vitaminico [stima del rapporto di verosimiglianza negativo (LR-)] (15). Nel caso si consideri come riferimento diagnostico la determinazione di MMA, le stime di LR+ e LR- erano, rispettivamente, di 2,7 (intervallo di confidenza al 95%: 2,0-3,8) e 0,6 (intervallo di confidenza al 95%: 0,5-0,7). Considerando come riferimento diagnostico i soli criteri clinici, le stime di LR+ ed LR- risultavano, rispettivamente, di 3,3 (intervallo di confidenza al 95%: 0,9-12,1) e 0,3 (intervallo di confidenza al 95%: 0,1-0,9).

Opinione di esperti e interpretazione dei risultati

Alcuni esperti suggeriscono la valutazione di anticorpi anti-fattore intrinseco nei pazienti con concentrazioni sieriche di B12 <200 ng/L confermate serialmente oppure con B12 <203 ng/L e HCY >13 μmol/L o MMA >0,4 μmol/L (in assenza di insufficienza renale e deficit di acido folico/vitamina B₆) (7, 16, 17). Altri raccomandano la valutazione congiunta di MMA e B12 sierici (o holoTC) per identificare i soggetti che necessitano di supplementazione. Il trattamento dovrebbe essere somministrato solo quando i risultati dei due esami siano concordi nel definire lo stato vitaminico (riduzione di B12 e incremento di MMA) (18).

Nella diagnostica di primo livello ("primary care"), altri esperti hanno suggerito l'interpretazione dei risultati di B12 in termini di rischio di deficit (bassa, media, elevata probabilità di deficit) (19). Nella Tabella 1 è riportato lo "score" del rischio di deficit da applicarsi nei soggetti con alterazioni ematologiche e sintomatologia neurologica. Il trattamento vitaminico è raccomandato nei soggetti con valori di B12 <100 ng/L, mentre quelli con possibile deficit (B12 <300 ng/L) andrebbero trattati solo se MMA e HCY risultano alterati (19).

Linee guida a diffusione locale consentono l'applicazione dell'esame a un ampio spettro di soggetti, in presenza di anomalie ematologiche, neurologiche, gravidanza, glossite, malassorbimento dovuto a cause differenti, somministrazione di metformina e nei pazienti dializzati (20, 21). Altre rassegne considerano la sola valutazione dei metaboliti funzionali (2).

Nel monitoraggio terapeutico sono stati suggeriti due approcci differenti e tra loro contrapposti: a) la sola valutazione clinica della correzione dei sintomi a 6 mesi dall'inizio della supplementazione vitaminica, insieme all'esecuzione dell'esame emocromocitometrico dopo due mesi (2) oppure b) il monitoraggio delle concentrazioni di B12 sierica ogni 6 mesi (21). Le recenti

Tabella 1

Probabilità di rischio di deficit vitaminico in relazione alle concentrazioni di vitamina B₁₂ nel siero

Categoria	Concentrazione vitamina B ₁₂ (ng/L)
Probabile deficit e necessità di supplementazione	<100
Possibile deficit	<300
Verosimile assenza di deficit	300-400
Assenza di deficit	>400

raccomandazioni dell'Associazione di Biochimica Clinica e Medicina di Laboratorio anglosassone stabiliscono che il monitoraggio della misura di B12 è clinicamente inutile (22).

CONCLUSIONI

Considerando i limiti del test in termini di sensibilità diagnostica e le possibili interferenze, la valutazione della B12 sierica dimostra una scarsa capacità di escludere il deficit vitaminico e discriminare soggetti con e senza deficit, soprattutto con l'impiego di una singola soglia decisionale (ad es., il limite inferiore di riferimento). L'esame dovrebbe comunque essere eseguito, per scopi etici e per le condizioni letali o invalidanti associate al possibile deficit, in pazienti sottoposti a trattamento di emodialisi e a donne in gravidanza (4). Tuttavia, il clinico dovrebbe essere informato sulla possibilità di ottenere risultati non dirimenti il quesito clinico a causa di una bassa accuratezza diagnostica del test.

Il dosaggio di B12 non è raccomandato nello screening della carenza vitaminica nella popolazione generale e per il monitoraggio dell'efficacia clinica della terapia di supplementazione vitaminica. L'esame può essere indicato in soggetti con sintomatologia neurologica e/o alterazioni ematologiche, che orientino verso un sospetto di deficit vitaminico, tenendo presente che è raccomandabile interpretare i risultati di B12 in termini di rischio di deficit (Tabella 1). Infine, è sconsigliata la ripetizione del dosaggio di B12 a 6-12 mesi nello stesso soggetto per monitorare l'efficacia della terapia vitaminica.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

1. Tietz NW. Clinical guide to laboratory tests. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1995:636-9.
2. Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. N Engl J Med 2013;368:149-60.
3. Andrès E, Loukili NH, Noel E, et al. Vitamin B12 (cobalamin) deficiency in elderly patients. CMAJ 2004;171:251-9.
4. Ferraro S, Mozzi R, Panteghini M. Tracing a roadmap for

- vitamin B12 testing using the health technology assessment approach. *Clin Chem Lab Med* 2014;52:767-77.
5. Dror DK, Allen LH. Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms. *Nutr Rev* 2008;66:250-5.
 6. Saifan C, Samarneh M, Shtaynberg N, et al. Treatment of confirmed B12 deficiency in hemodialysis patients improves Epogen® requirements. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2013;6:89-93.
 7. Huang T, Chen Y, Yang B, et al. Meta-analysis of B vitamin supplementation on plasma homocysteine, cardiovascular and all-cause mortality. *Clin Nutr* 2012;31:448-54.
 8. England JD, Gronseth GS, Franklin G, et al, for the American Academy of Neurology. Practice parameter: evaluation of distal symmetric polyneuropathy: role of laboratory and genetic testing (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, American Association of Neuromuscular and Electrodiagnostic Medicine, and American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *Neurology* 2009;72:185-92.
 9. Institute of Medicine Food and Nutrition Board. Dietary reference intakes: thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and choline. Washington, DC: National Academies Press, 1998.
 10. Yetley EA, Pfeiffer CM, Phinney KW, et al. Biomarkers of vitamin B-12 status in NHANES: a roundtable summary. *Am J Clin Nutr* 2011;94:313S-21S.
 11. American Dietetic Association, Dietitians of Canada. Position of the American Dietetic Association and Dietitians of Canada: vegetarian diets. *J Am Diet Assoc* 2003;103:748-65.
 12. Wilson RD, Johnson JA, Wyatt P, et al; for the Genetics Committee of the Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada and The Motherisk Program. Pre-conceptional vitamin/folic acid supplementation 2007: the use of folic acid in combination with a multivitamin supplement for the prevention of neural tube defects and other congenital anomalies. *J Obstet Gynaecol Can* 2007;29:1003-26.
 13. Herrmann W, Obeid R, Schorr H, et al. Functional vitamin B12 deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1478-88.
 14. Watkins D, Rosenblatt DS. Inborn errors of cobalamin absorption and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2011;157C:33-44.
 15. Willis CD, Elshaug AG, Milverton JL, et al.; ASTUTE Health study group. Diagnostic performance of serum cobalamin tests: a systematic review and meta-analysis. *Pathology* 2011;43:472-81.
 16. Andres E, Serraj K. Optimal management of pernicious anemia. *J Blood Med* 2012;3:97-103.
 17. Andrés E, Affenberger S, Vinzio S, et al. Cobalamin deficiencies in adults: update of etiologies, clinical manifestations and treatment. *Rev Med Interne* 2005;26:938-46.
 18. Carmel R. Biomarkers of cobalamin (vitamin B-12) status in the epidemiologic setting: a critical overview of context, applications, and performance characteristics of cobalamin, methylmalonic acid, and holotranscobalamin II. *Am J Clin Nutr* 2011;94:348S-58S.
 19. Snow CF. Laboratory diagnosis of vitamin B12 and folate deficiency: a guide for the primary care physician. *Arch Intern Med* 1999;159:1289-98.
 20. Volkov I, Rudoy I, Machagna M, et al. What are the recommended guidelines for checking vitamin B12 by primary practitioners? *Eur J Gen Pract* 2007;13:155-6.
 21. McHugh J, Afghan R, O'Brien E, et al. Impact of the introduction of guidelines on vitamin B12 testing. *Clin Chem* 2012;58:471-2.
 22. Lang T. The Association for Clinical Biochemistry & Laboratory Medicine. National minimum re-testing interval project. Prepared for the Clinical Practice Group of the ACB and supported by the Royal College of Pathologists, 2013:1-36.