

Determinazione della olotranscobalamina sierica: valutazione analitica e ruolo in soggetti fumatori asintomatici

Rachele De Giuseppe¹, Valentina Uva¹, Cristina Novembrino², Roberto Accinni³, Cinzia Della Noce³, Dario Gregori⁴, Silvia Lonati¹, Rita Maiavacca⁵, Gianfranco Schiraldi⁶, Paola Bonara⁷, Fabrizia Bamonti¹

¹Dipartimento Scienze Mediche, Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Fondazione IRCCS, Milano

²Dipartimento Scienze Neurologiche, Centro "Dino Ferrari", Università degli Studi di Milano, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Fondazione IRCCS, Milano

³Istituto di Fisiologia Clinica, CNR, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

⁴Dipartimento Salute Pubblica, Università di Torino, Torino

⁵Dipartimento Area Servizi Diagnostici, Laboratorio di Patologia Clinica, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Fondazione IRCCS, Milano

⁶Dipartimento Pneumologia, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

⁷Dipartimento Medicina Interna 1 B, Ospedale Maggiore Policlinico, Mangiagalli e Regina Elena, Fondazione IRCCS, Milano

ABSTRACT

Determination of serum holotranscobalamin: analytical evaluation and role in asymptomatic heavy smokers.

Prevalence of subclinical cobalamin (B₁₂) deficiency is higher than expected. Holotranscobalamin (Holo-TC) reflects the actual vitamin status better than total B₁₂. Cobalamin and/or folate deficiency leads to hyperhomocysteinemia, which, like cigarette smoking, is an independent cardiovascular risk factor. We aimed to evaluate a new Holo-TC immunoenzymatic assay (Active B₁₂, Abbott Diagnostics) carried out on an automated analyser (AxSYM, Abbott) and to verify diagnostic utility of Holo-TC in healthy smokers. Analytical performance was assessed by standard procedures. In 61 (35 males, aged 51±10 years) healthy heavy (>20 cigarettes/day) smokers, homocysteine metabolism (homocysteine, folate, B₁₂, Holo-TC) was evaluated using relevant commercial kits on AxSYM analyser. All subjects followed mediterranean diet. Measuring Holo-TC, the inter-assay imprecision (CV) ranged from 3.0% to 7.7%. Mean recovery was 100% (range 93-111%); a good linearity was shown between 8.8 and 143 pmol/L (r²=0.99). The studied subjects showed an altered homocysteine metabolism: mild hyperhomocysteinemia (>10.5 μmol/L) was present in 56% (significantly higher in men than in women, P <0.05); serum and erythrocyte folate concentrations were below reference intervals in 15% and 56% of cases, respectively; a decreased B₁₂ was found in 16.4% (significantly lower in men than in women, P <0.05) and Holo-TC was below the cut-off in 29.5% of cases. The AxSYM Holo-TC assay is suitable for routine use. Preliminary data confirm the role of Holo-TC in early detection of B₁₂ deficiency in healthy heavy smokers.

INTRODUZIONE

La vitamina B₁₂ (B₁₂), essenziale per la proliferazione e differenziazione cellulare e per il metabolismo dei composti monocarboniosi (1, 2), è presente nel siero legata alle proteine trasportatrici aptocorrina (HC; transcobalamina I, TC I), e transcobalamina II (TC II o semplicemente TC) (3). HC lega il 70-90% della B₁₂ sierica ed è considerata metabolicamente inerte perché, ad eccezione che nel fegato, non sono ancora stati individuati recettori cellulari specifici per la sua internalizzazione. Si ipotizza che HC possa agire come "scavenger" per potenziali analoghi nocivi di B₁₂, trasportandoli al fegato e favorendone la secrezione biliare (4). Il restante 10-30% della B₁₂ sierica si lega alla TC II dando luogo al complesso olotranscobalamina (Holo-TC) che, grazie a specifici recettori ubiquitari, può entrare nelle cellule. Per questo motivo, la B₁₂ legata a TC II viene considerata la frazione biologicamente attiva (4).

La B₁₂ è coinvolta nel metabolismo dell'omocisteina (Hcy) agendo come cofattore in reazioni enzimatiche nelle quali il folato è cosubstrato; una carenza di una delle due vitamine o di entrambe può portare ad iperomocisteinemia, noto fattore indipendente di rischio cardiovascolare (5-7). Un deficit di B₁₂ può comportare, inoltre, un aumento delle concentrazioni ematiche di acido metilmalonico (MMA). Un ridotto apporto di B₁₂ con la dieta e/o un malassorbimento intestinale possono portare ad un bilancio vitaminico negativo e, con il tempo, ad una severa carenza. Le conseguenze cliniche del deficit di tale vitamina comprendono patologie ematologiche, quali anemia megaloblastica, e patologie progressive del sistema nervoso centrale e periferico.

E' stata evidenziata un'associazione tra fumo di sigaretta ed elevate concentrazioni di omocisteina totale (tHcy) (8, 9); numerosi studi hanno riportato che le concentrazioni sieriche totali di B₁₂ in soggetti forti fumatori sono significativamente più basse rispetto a quelle dei

non fumatori, poiché i nitriti organici, l'ossido nitrico, i cianati e gli isocianati contenuti nel fumo di sigaretta interagiscono con la B₁₂ trasformandola in un composto biologicamente inattivo (10). Ulteriori studi hanno evidenziato che nei soggetti fumatori una condizione di iperomocisteinemia può essere associata ad una dieta alimentare caratterizzata da uno scarso apporto vitaminico (10).

Poiché i segni clinici rappresentano lo stadio tardivo del deficit di B₁₂, risulta fondamentale l'individuazione di un marcatore precoce per consentire, intervenendo per tempo con un'adeguata supplementazione, di prevenire danni neurologici irreversibili (11). Attualmente, l'esame biochimico più comunemente utilizzato per diagnosticare il deficit di B₁₂ è la determinazione della B₁₂ sierica totale (tB₁₂). L'esame ha un'accuratezza diagnostica limitata (bassa sensibilità), in quanto nella maggioranza dei casi il parametro risulta alterato quando sono già comparsi i segni clinici e spesso non fornisce un'utile informazione nelle forme subcliniche (12). Essendo l'emivita dell'HC (6 giorni) superiore a quella dell'Holo-TC (6 min), una diminuita concentrazione del complesso Holo-TC può rappresentare un marcatore più precoce della carenza di B₁₂ (12). È stato dimostrato che elevate concentrazioni ematiche di tHcy e di MMA possono essere considerate marcatori alternativi alla tB₁₂ per un deficit di B₁₂ (5). Tuttavia, pur essendo riportato che elevate concentrazioni di questi metaboliti precedono in genere i sintomi clinici, la misurazione di entrambe le molecole presenta alcuni limiti. Infatti, l'incremento di Hcy nel plasma non è specifico: le concentrazioni di tHcy sono influenzate da fattori genetici, fisiologici e/o acquisiti (quali ad es. stile di vita, malattie in corso, assunzione di farmaci). La presenza di iperomocisteinemia è inoltre spesso riscontrata in soggetti con deficit di folato e/o vitamina B₆ ed è una caratteristica frequente in soggetti con insufficienza renale. Il MMA, pur risultando più specifico ed indipendente dallo status del folato rispetto all'Hcy, richiede per la sua misura una strumentazione sofisticata ed una tecnica analitica complessa (ad es. spettrometria di massa), inadatta per un uso routinario (5, 11).

L'Holo-TC sierica può essere considerata un parametro sensibile e precoce per individuare una carenza di B₁₂ (1, 7). I primi studi sulla sua utilità diagnostica sono stati effettuati con metodi RIA od ELISA (1). Negli ultimi anni è stato messo a punto un metodo immunoenzimatico utilizzabile su analizzatore automatizzato ed inseribile, pertanto, nel pannello di esami clinici per la diagnosi differenziale di macrocitosi.

Il presente studio è stato condotto per evidenziare il possibile ruolo della concentrazione di Holo-TC circolante quale marcatore di deficit di B₁₂; pertanto è stato valutato un nuovo sistema commerciale per la determinazione automatizzata della concentrazione di Holo-TC nel siero ed è stata valutata la possibile correlazione tra questo parametro e quelli misurati abitualmente (tB₁₂, folato e Hcy) nella diagnosi di carenza di B₁₂ in soggetti forti fumatori.

MATERIALI E METODI

Valutazione analitica

Le determinazioni di Holo-TC sono state effettuate mediante kit di reagenti Active B₁₂ (Abbott Diagnostics) su analizzatore AxSYM (Abbott Diagnostics) (13). Il metodo di misurazione è basato sulla tecnologia MEIA ("microparticle enzyme immunoassay") che prevede l'utilizzo di microparticelle di lattice sulle quali è immobilizzato un anticorpo monoclonale murino anti-Holo-TC, che cattura l'Holo-TC presente nel campione. Successivamente viene aggiunto un anticorpo monoclonale anti-TC coniugato con fosfatasi alcalina; l'aggiunta del substrato (metilumbelliferilfosfato) determina lo sviluppo di un prodotto fluorescente (direttamente proporzionale alla concentrazione di Holo-TC del campione) che viene rivelato dal sistema ottico MEIA. I calibratori sono preparati a partire da una soluzione contenente Holo-TC ricombinante umana; il materiale di controllo è preparato a partire da un pool di sieri umani cui è aggiunta Holo-TC ricombinante umana alla concentrazione desiderata (13).

L'imprecisione è stata determinata mediante analisi replicate sia di controlli forniti dal produttore [low (L) e high (H)] sia su materiale preparato in laboratorio come miscela di sieri contenenti concentrazioni differenti di Holo-TC (P). I campioni sono stati analizzati in duplicato in due sedute analitiche al giorno per 5 giorni. Recupero e linearità sono stati stimati analizzando campioni ottenuti miscelando in proporzioni diverse aliquote di un pool di siero ad alta e di uno a bassa concentrazione di Holo-TC: i valori misurati sono stati confrontati con quelli attesi. Il limite di bianco, calcolato dai valori di 25 repliche analitiche (nella stessa serie) del calibratore 0, è stato definito come la concentrazione di Holo-TC (pmol/L) a 3 DS dalla media del calibratore 0.

Valutazione clinica

Sono stati arruolati 61 soggetti (35 maschi e 26 femmine, età 51±10 anni), definiti forti fumatori sulla base del numero di sigarette fumate durante la giornata (più di 20 sigarette al giorno da almeno dieci anni) e sani in quanto, al momento dell'arruolamento effettuato presso il Dipartimento di Pneumologia dell'Ospedale Cà Granda Niguarda di Milano, non presentavano alterazioni della funzione respiratoria, come dimostrato dall'esame spirometrico. I principali criteri di esclusione dallo studio sono stati: indice di massa corporea (BMI) superiore a 25 Kg/m²; gravidanza e/o allattamento; ipertensione; dislipidemia; patologie croniche e gastrointestinali; terapie farmacologiche croniche (inclusa terapia estroprogestinica); regolare supplementazione vitaminica. Lo studio è stato condotto in accordo alla Dichiarazione di Helsinki sulla Ricerca in Soggetti Umani ed è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale S. Giuseppe e Sacra Famiglia di Erba (MI). Tutti i soggetti hanno firmato un consenso informato. I partecipanti allo studio hanno compilato un questionario dal quale è risultato che tutti consumavano una dieta mediterranea. La valutazione

del questionario, che prevedeva, per ciascuno dei 13 punti esaminati, l'assegnazione di un punteggio pari a 0 qualora l'abitudine fosse corretta o di un punteggio pari ad 1 in caso contrario, ha consentito di ricavare un punteggio globale cumulativo, inversamente proporzionale alla correttezza dello stile di vita (14).

Ciascun soggetto è stato sottoposto ad un prelievo di sangue venoso periferico raccolto in due provette, una contenente anticoagulante EDTA e l'altra priva di anticoagulante. Il campione con EDTA è stato posto immediatamente in ghiaccio (per bloccare il rilascio di Hcy da parte degli eritrociti) e centrifugato entro 30 min dal prelievo a 1250g per 10 min; il plasma così ottenuto è stato suddiviso in aliquote da circa 200 µL e congelato a -80 °C fino al momento della determinazione di Hcy. Il campione coagulato è stato centrifugato a 1250g per 10 min; il siero è stato suddiviso in aliquote da circa 200 µL ciascuna, analizzate subito dopo il prelievo o conservate a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Per ciascun soggetto sono state determinate le concentrazioni plasmatiche di tHcy con metodica FPIA ("fluorescence polarization immunoassay"), le concentrazioni sieriche di B₁₂ e di Holo-TC e le concentrazioni di folato sierico ed eritrocitario con metodica MEIA. Si sono utilizzati i rispettivi kits commerciali (Abbott Diagnostics) su analizzatore AxSYM (15, 16).

Come intervalli di riferimento sono stati considerati quelli in uso nel nostro laboratorio.

La significatività statistica (test di Wilcoxon) ed il coefficiente di correlazione sono stati calcolati mediante l'utilizzo del software statistico R-Project (versione per windows R-2.8.1) e sono stati considerati significativi i dati con P <0,05.

RISULTATI

I risultati riguardanti la valutazione dell'imprecisione del metodo di determinazione MEIA dell'Holo-TC sono riportati nella Tabella 1. I valori misurati sono risultati linearmente correlati con la concentrazione di Holo-TC nell'intervallo compreso tra 8,8 e 143 pmol/L ($r^2=0,99$) (Figura 1). Il recupero medio è stato del 100% (intervallo: 93%-111%) ed il limite di rilevabilità della misurazione è stato 0,07 pmol/L.

I risultati ottenuti sui soggetti studiati sono riportati nella Tabella 2. I soggetti analizzati erano omogenei per

età (femmine: mediana 51 anni, intervallo interquartile (IQR) 42-59; maschi: mediana 53 anni, IQR 44-62) e punteggio globale nutrizionale (femmine: mediana 5, IQR 4-6; maschi: mediana 6, IQR 4-8). Il BMI era significativamente più alto nei maschi (mediana 24,5; IQR 23,8-24,8) rispetto alle femmine (mediana 22,6; IQR 21,9-24,2) (P=0,001).

L'analisi del pannello vitaminico evidenziava elevate concentrazioni di tHcy (>10,5 µmol/L) in oltre la metà dei soggetti (56% dei casi), con concentrazioni di tHcy nei maschi significativamente più elevate rispetto a quelle delle femmine. I livelli di folato sierico ed eritrocitario erano al di sotto del limite inferiore di riferimento nel 15% e 56% dei casi, rispettivamente, senza differenze significative tra maschi e femmine. Le concentrazioni di tB₁₂ sono risultate generalmente all'interno dell'intervallo di riferimento, ma con valori significativamente più bassi nei maschi rispetto alle femmine. Inoltre, il 29,5% dei soggetti mostrava valori di Holo-TC al di sotto del cut-off (>40 pmol/L), risultando circa il doppio dei soggetti che aveva valori di tB₁₂ al di sotto del limite inferiore di riferimento (16,4% dei casi).

E' stata riscontrata una debole correlazione tra le concentrazioni di Holo-TC e quelle di tB₁₂ ($r^2=0,2$; P <0,01): infatti non tutti i casi che presentavano concentrazioni di Holo-TC al di sotto del valore di cut-off avevano anche bassi livelli di tB₁₂ e non tutti i casi nei quali i livelli di tB₁₂ erano al di sotto del valore limite presentavano bassi valori di Holo-TC; solo nel 11,5% dei casi (7 soggetti) entrambi i parametri erano alterati.

DISCUSSIONE

La B₁₂ è un cofattore essenziale per numerose reazioni enzimatiche di importanza vitale. La sua carenza è una condizione insidiosa e diverse possono esserne le cause; se non trattata, può portare ad anemia megaloblastica e/o disordini neuropsichiatrici. La determinazione della concentrazione di B₁₂ è quindi di fondamentale importanza nella prevenzione, diagnosi e/o prognosi di numerose patologie associate ad alterazioni del suo metabolismo. Tuttavia, è da evidenziare che la determinazione della concentrazione sierica di tB₁₂ non fornisce, da sola, un quadro completo sullo status della vitamina (17, 18). Di conseguenza, è sembrato clinicamente molto utile individuare un marcatore in grado di eviden-

Tabella 1
Imprecisione analitica del metodo di determinazione dell'olotranscobalamina su analizzatore Abbott AxSYM

Imprecisione	Materiale	Media ± DS (µmol/L)	CV (%)
Entro la serie	Controllo basso	21,8 ± 0,7	3,2
	Controllo alto	41,3 ± 1,2	2,9
	Pool di sieri	75,5 ± 4,5	6,0
Tra le serie	Controllo basso	22,5 ± 0,7	3,0
	Controllo alto	42,8 ± 1,8	4,1
	Pool di sieri	76,0 ± 5,6	7,7

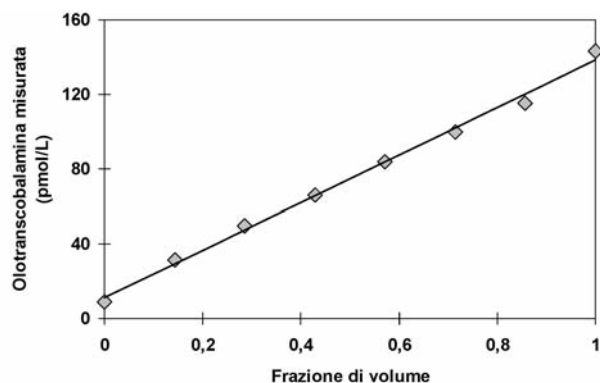


Figura 1

Concentrazioni di olotranscobalamina misurate in miscele di due sieri in proporzioni variabili. La linea continua rappresenta la retta di regressione (metodo dei minimi quadrati, $r = 0,9975$; $y = 124,4x + 11,1$).

ziare stati precoci di deficit di B₁₂ in soggetti ancora asintomatici.

Sebbene alcuni Autori non abbiano riscontrato una superiorità dell'Holo-TC rispetto alla tB₁₂ per quanto riguarda l'accuratezza diagnostica (17, 19), numerosi studi hanno per contro dimostrato che la determinazione di Holo-TC è risultata molto sensibile nell'evidenziare situazioni di carenza vitaminica (11, 12, 20). In particolare, secondo lo studio di Hermann et al. (1), MMA e soprattutto Holo-TC sono risultati marcatori più sensibili rispetto alla tB₁₂ sierica nella diagnosi in soggetti a rischio di carenza di B₁₂ (ad es. vegetariani ed anziani), in quanto hanno permesso di evidenziare un deficit di tale vitamina in soggetti ancora asintomatici.

Prima di includere la determinazione dell'Holo-TC nel pannello clinicamente utilizzato per la valutazione del metabolismo dell'Hcy, è stata effettuata una valutazione analitica del nuovo metodo immunoenzimatico diretto per la determinazione di Holo-TC (Active B₁₂, Abbott Diagnostics) eseguito su analizzatore AxSYM. I risultati ottenuti erano in accordo con quelli di un recente studio

di Brady et al. (13), evidenziando una buona prestazione analitica del sistema.

È stato quindi analizzato, in soggetti forti fumatori asintomatici, il "pannello del metabolismo dell'Hcy" o dell'"anemia macrocitica" per evidenziare una possibile correlazione tra Holo-TC ed i principali parametri misurati routinariamente nella diagnosi di carenza di B₁₂ e valutare l'eventuale ruolo diagnostico di Holo-TC. Per tale verifica è stato scelto il gruppo dei fumatori in quanto è emerso da diversi studi che il fumo di sigaretta può interferire nel metabolismo della B₁₂ (10). Dall'analisi del questionario alimentare, compilato dai soggetti al momento dell'arruolamento, è emerso che tutti seguivano una dieta mediterranea, che prevedeva il consumo regolare di carne, uova e/o latticini, nonché di frutta e verdura. A conferma di questo, i soggetti presi in esame presentavano concentrazioni di tB₁₂ mediamente nella norma e valori leggermente elevati di colesterolemia totale (mediana 229 mg/dL; IQR 206-261). In accordo con i dati della letteratura (8, 9), la maggior parte dei soggetti (56%), presentava lieve o moderata iperomocisteinemia (riferita ad un valore soglia di 10,5 μmol/L).

La relazione tra fumo e aumento del rischio di malattie cardiovascolari è ben dimostrata (21, 22). È inoltre riportato che i fumatori presentano concentrazioni plasmatiche di tHcy più elevate rispetto ai non fumatori (23). Tale condizione potrebbe essere un effetto diretto del fumo di sigaretta oppure la conseguenza di una carenza vitaminica. La valutazione approfondita delle vitamine metabolicamente correlate all'Hcy ha reso conto, in parte, di tale alterazione. Infatti, il nostro studio ha dimostrato che la maggioranza dei soggetti presentava un alterato metabolismo dell'Hcy con valori di alcuni parametri al di sotto del limite inferiore di riferimento.

Studi in letteratura hanno evidenziato che la determinazione della concentrazione di Holo-TC, affiancata a quella della tB₁₂, fornisce un quadro più dettagliato dello status della B₁₂ (18); gli stessi studi inoltre suggeriscono che tB₁₂ e Holo-TC, poiché sono parametri indipendenti tra loro, forniscono informazioni differenti dal punto di

Tabella 2

Status vitaminico ed omocisteina nei soggetti forti fumatori studiati. I risultati sono riportati come mediana ed intervallo interquartile (IQR). Tra parentesi per ogni analita è riportato l'intervallo di riferimento o il cut-off utilizzati

Analita	Totale soggetti	Maschi	Femmine	Significatività differenza sessi
Vitamina B ₁₂ (164-835 pmol/L)	272 (211-351) [16,4%]*	252 (199-314)	310 (242-419)	0,037
Olotranscobalamina (>40 pmol/L)	58 (45-78) [29,5%]*	53 (43-76)	60 (50-76)	NS
Folato sierico (7-28 nmol/L)	13 (10-18) [15%]*	13 (10-17)	13 (10-20)	NS
Folato eritrocitario (421-1462 nmol/L)	441 (356-598) [56%]*	404 (318-529)	519 (366-602)	NS
Omocisteina totale (6,8-10,5 μmol/L)	10,8 (8,0-13,2) [56%]*	11,6 (8,8-16,0)	9,0 (6,4-10,9)	0,002

*Percentuale di soggetti con valori più alti o più bassi rispetto all'intervallo di riferimento o al cut-off.
NS, non significativo.

vista diagnostico (18). In accordo con queste osservazioni, la debole correlazione tra Holo-TC e tB₁₂ osservata nel nostro studio, conferma che la carenza della frazione biologicamente attiva della B₁₂ non sempre coincide con una carenza di tB₁₂. In accordo con lo studio di Gonzalez-Gross et al. (24) e con nostri precedenti risultati (25, 26), ciò sottolinea l'utilità diagnostica delle determinazioni di Holo-TC, folato (sierico ed eritrocitario) ed Hcy, affiancate a quelle della tB₁₂, nel tentativo di fornire un quadro più completo sullo status della vitamina B₁₂ sierica.

In conclusione, da quanto è emerso dal nostro studio, si può affermare che il metodo immunoenzimatico per la determinazione di Holo-TC risulta attendibile ed idoneo per essere inserito nel pannello di indagini cliniche per la valutazione dello status della B₁₂. Inoltre, i dati da noi ottenuti sembrano confermare l'utilità della determinazione di Holo-TC a scopo preventivo su soggetti asintomatici con carenza di tB₁₂ non ancora evidente. Infatti, dal momento che le due misurazioni (tB₁₂ e Holo-TC) forniscono informazioni diverse e, per certi versi, complementari, è verosimile che la loro associazione, piuttosto che la misurazione della sola tB₁₂ o della sola frazione attiva, possa fornire un migliore inquadramento degli stati carenziali.

BIBLIOGRAFIA

- Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. Functional vitamin B₁₂ deficiency and determination of holotranscobalamin in populations at risk. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1478-88.
- Herrmann W, Obeid R, Schorr H, Geisel J. The usefulness of holotranscobalamin in predicting vitamin B₁₂ status in different clinical settings. *Curr Drug Metab* 2005;6:47-53.
- Cotran Ramzi S, Kumar V, Robbins CT. *Le basi patologiche delle malattie*. 6^a ed. Padova: Piccin, 2000.
- Ulleland M, Eilertsen I, Quadros EV, et al. Direct assay for cobalamin bound to transcobalamin (holo-transcobalamin) in serum. *Clin Chem* 2002;48:526-32.
- Carmel R, Green R, Rosenblatt DS, et al. Update on cobalamin, folate, and homocysteine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003;1:62-81.
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50:3-32.
- Carmel R. Measuring and interpreting holo-transcobalamin (holo-transcobalamin II). *Clin Chem* 2002;48:407-9.
- Ockene IS, Miller NH. Cigarette smoking, cardiovascular disease, and stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 1997;96:3243-7.
- Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, et al. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *JAMA* 1998;279:119-24.
- Northrop-Clewes CA, Thurnham DI. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clin Chim Acta* 2007;377:14-38.
- Hvas A-M, Nexø E. Holotranscobalamin – a first choice assay for diagnosing early vitamin B₁₂ deficiency? *J Intern Med* 2005;257:289-98.
- Nexø 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.
- Brady J, Wilson L, McGregor L, et al. Active B₁₂: a rapid, automated assay for holotranscobalamin on the Abbott AxSYM analyzer. *Clin Chem* 2008;54:567-73.
- Calvelli L, Accinni R, Gianfranco S, et al. A simple and quick instrument for assessing food preferences. Development of the NSAS Scale. *NUTRAfoods* 2007;6:36-9.
- Bamonti-Catena F, Accinni R, Novembrino C, et al. Analytical and clinical performance evaluation of the IMx homocysteine assay compared to EIA and HPLC methods at the Hospital Maggiore-IRCCS in Milano, Italy. In: European evaluations of IMx homocysteine, Abbott Diagnostic Division. Schroder G, ed. Abbott Diagnostic Educational Services, Germany, 1998;63-6.
- Lonati S, Novembrino C, Ippolito S, et al. Analytical performance and method comparison study of the total homocysteine fluorescence polarization (FPIA) on the AxSYM analyzer. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:228-34.
- Nilsson K, Isaksson A, Gustafson L, et al. Clinical utility of serum holotranscobalamin as a marker of cobalamin status in elderly patients with neuropsychiatric symptoms. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:637-43.
- Miller JW, Garrod MG, Rockwood AL, et al. Measurement of total vitamin B₁₂ and holotranscobalamin, singly and in combination, in screening for metabolic vitamin B₁₂ deficiency. *Clin Chem* 2006;52:278-85.
- Clarke R, Sherliker P, Hin H, et al. Detection of vitamin B₁₂ deficiency in older people by measuring vitamin B₁₂ or the active fraction of vitamin B₁₂, holotranscobalamin. *Clin Chem* 2007;53:963-70.
- Nexø E, Christensen AL, Hvas AM, et al. Quantification of holo-transcobalamin, a marker of vitamin B₁₂ deficiency. *Clin Chem* 2002;48:561-2.
- Galimanis A, Mono ML, Arnold M, et al. Lifestyle and stroke risk: a review. *Curr Opin Neurol* 2009;22:60-8.
- Tsiara S, Elisaf M, Mikhailidis DP. Influence of smoking on predictors of vascular disease. *Angiology* 2003;54:507-30.
- Rocchi E, Bursi F, Ventura P, et al. Anti- and pro-oxidant factors and endothelial dysfunction in chronic cigarette smokers with coronary heart disease. *Eur J Intern Med* 2007;18:314-20.
- 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.
- De Vecchi AF, Bamonti-Catena F, Finazzi S, et al. Homocysteine, vitamin B₁₂, serum and erythrocyte folate in peritoneal dialysis and hemodialysis patients. *Perit Dial Int* 2000;20:169-73.
- Bamonti-Catena F, Bucciati G, Porcella A, et al. Folate measurements in patients on regular hemodialysis treatment. *Am J Kidney Dis* 1999;33:492-9.