Rassegna

La Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT), nuovo marker di abuso alcolico cronico e la sua determinazione mediante elettroforesi capillare zonale

G. De Paoli[a], M. Trettene[a], J.P. Pascali[a], M. Trevisan[b], F. Bortolotti[a], F. Tagliaro[a]

[a] Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale, Università di Verona, Policlinico, Verona
[b] Unità Operativa Autonoma di Laboratorio, ULSS 20, Verona

Introduction: Alcoholism represents one of the most important medical and social problems in the western world with important consequences for the individual and the society. For objective diagnosis of alcohol abuses several markers have been proposed, among which carbohydrate deficient transferrin, known as CDT, because of its high diagnostic sensitivity and specificity has become the most used marker in both clinical and forensic environments.
Currently the determination of CDT is performed using commercial kit based on extraction of CDT isoforms onto anion exchange disposable cartridges followed by a immunoassay of the eluates. In addition instrumental methods are available including isoelectric focusing, anion exchange liquid chromatography, mass spectrometry and recently capillary electrophoresis.
The aim of the present work was to present a brief review of the analytical methods for CDT determination and to carry out a comparison between the results obtained with a commercial immunoassay and those obtained with a capillary electrophoretic method previously validated by our group.

Methods: Serum samples from 120 subjects with different alcohol consumption have been analyzed with the immunoassay %CDT-TIA (Axis Shield) in parallel with capillary electrophoresis. The immunoassay analysis has been carried out following the producer's instructions; the capillary electrophoretic analysis has been performed using a previously validated method, based on zonal separation in borate buffer pH 8,3 with UV detection at 200 nm.

Results and conclusions: Overall a highly significant ($p<0,001$) correlation between immunoassay and capillary electrophoresis has been found ($R=0,8721$). On the contrary the correlation was not significant ($R=0,2567$) at values close to immunoassay cut-off. This evidence affects the reliability of immunoassay results particularly at the concentration values most interesting for forensic analysis, i.e. close to the cut-off between normal and pathological values.
In conclusion, an instrumental confirmation of CDT results from the immunoassay is needed, at least for the samples "positive" at the screening analysis.

Premessa: Considerata l'importanza delle conseguenze mediche, sociali, medico legali ed economiche dell'abuso di alcol, risulta di primaria importanza poter formulare una diagnosi oggettiva di questa condizione. Per tale ragione è indispensabile l'impiego di indicatori diagnostici (markers biologici) il più possibile affidabili. Tra questi la carbohydrate-deficient transferrin, più comunemente nota con l'acronimo di CDT, si sta imponendo per l'elevata sensibilità e specificità diagnostica. Attualmente la CDT è misurata prevalentemente mediante kit commerciali basati sulla separazione in microcolonna a scambio ionico combinata con immunodosaggio. I metodi strumentali disponibili includono la focalizzazione isoelettrica (IEF), la cromatografia a scambio ionico, la spettrometria di massa e l'elettroforesi capillare (CE). Quest'ultimo metodo si è dimostrato particolarmente idoneo all'impiego routinario. Scopo del presente lavoro è stato quello di fare una breve rassegna degli aspetti analitici della determinazione e di confrontare l'accuratezza analitica di un metodo immunometrico per l'analisi della CDT disponibile sul mercato con un metodo strumentale CZE precedentemente validato.
Metodi: I sieri di 120 soggetti con differente consumo alcolico sono stati analizzati sia mediante metodo immunometrico (%CDT-TIA, Axis Shield) che

Corrispondenza a: Dott. Franco Tagliaro, Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale, Policlinico - 37134 Verona - Tel. 045 8074618 - Fax 045 8027623

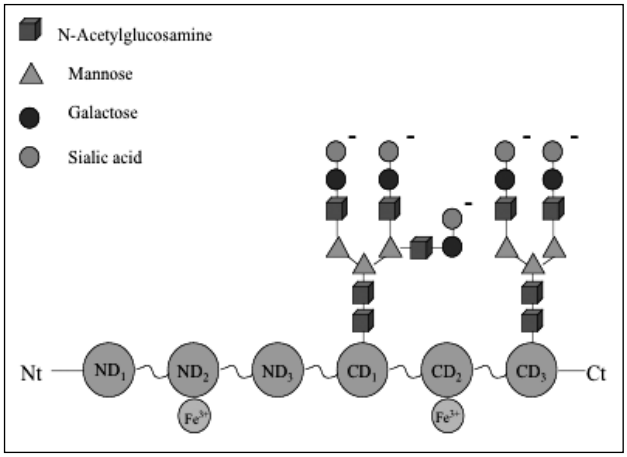
mediante CE con rivelazione UV a 200 nm. Le analisi immunometriche sono state eseguite secondo le istruzioni del produttore; le analisi CZE secondo una procedura validata in precedenza.
Risultati e Conclusioni: E' stata evidenziata una correlazione altamente significativa (P<0.001) tra CE ed immunoassay (R=0.8721). Tuttavia, ai valori prossimi al cut-off dell'immunoassay (2,6%) la correlazione si è rivelata non significativa (R= 0,2567). Questo pregiudica il valore diagnostico dell'immunoassay nella regione più critica per la diagnostica medico legale.
Per questo motivo, è necesario confermare i dati ottenuti tramite saggio immunologico con analisi strumentale come la CE, almeno nei campioni che risultano positivi allo screening.

Introduzione

Come è a tutti noto l'abuso di alcol rappresenta una delle condizioni più problematiche non solo in ambito medico ma anche economico, sociale e legale. Su questa base risulta di primaria importanza poter formulare una diagnosi di abuso alcolico su base oggettiva considerate le importanti conseguenze che tale diagnosi può comportare. Per tale ragione risulta indispensabile l'utilizzo di indicatori diagnostici (markers biologici) il più possibile affidabili[1, 2, 3, 4].
D'altra parte l'uso di indicatori biochimici, rappresentati essenzialmente da marker di danno epatico, è da tempo accettato nella diagnostica alcologica. Tra questi rcordiamo in particolare:
1) γ-glutamil transferasi (GGT), la cui concentrazione sierica aumenta per un meccanismo di induzione enzimatica alcol-correlata[5];
2) transaminasi epatiche (AST,ALT) e soprattutto il rapporto AST/ALT >2;
3) volume globulare medio (MCV)

E' stata anche proposta l'associazione di più markers al fine di aumentare la specificità o la sensibilità dei test. Si deve sottolineare come, tuttavia, nessuno dei parametri sopra citati soddisfi pienamente le esigenze, soprattutto in termini di specificità diagnostica, poste dalle problematiche cliniche e medico legali dell'alcolismo.
Più recentemente sono stati proposti altri indicatori di abuso alcolico tra cui ricordiamo in particolare la beta-esosaminidasi, il 5-idrossitriptofolo urinario (5-HTLO), gli addotti proteici dell'acetaldeide, gli esteri etilici e metilici degli acidi grassi (FAEE, FAME), la cui affidabilità e/o praticabilità, tuttavia, non è stata ancora adeguatamente accertata per una applicazione routinaria[4,6,7]. Tra gli indicatori più recenti si sta imponendo nella pratica di laboratorio un nuovo marcatore, dotato di buona sensibilità e soprattutto di elevata specificità diagnostiche. Si tratta della carbohydrate-deficient transferrin, nota con l'acronimo di CDT.
La CDT, proposta per la prima volta alla fine degli anni settanta come marker di abuso alcolico, è stata ampiamente studiata dal punto di vista biochimico, epidemiologico ed analitico[3,8,9]. Questo marker si identifica con un gruppo di isoforme minori della transferrina che, come è noto, è la principale proteina sierica trasportatrice di ferro. Essa è costituita da una singola catena di 679 aminoacidi (pm 80000 dalton), che costituisce due domini globulari, ciascuno con un sito legante per lo ione Fe^{+++}. Sono inoltre presenti due catene glucidiche complesse e ramificate, ciascuna delle quali porta in posizione terminale una o più molecole di acido sialico, cariche negativamente (Figura 1).

Figura 1. Rappresentazione schematica della glicosilazione della molecola della transferrina umana (isoforma pentasialo).



Nell'uomo l'isoforma principale, nota come tetrasialotransferrina, contiene quattro catene oligosaccaridiche, ciascuna terminante con un residuo di acido sialico. Sono state descritte isoforme contenenti da 0 a 8 residui di tale molecola, tra queste la trisialo-Tf e la pentasialo-Tf sono normalmente le più rappresentate. Le isoforme più carboidrato-deficienti, vale a dire le disialo-Tf, la monosialo-Tf e l' asialo-Tf, che costituiscono la CDT, sono presenti nel siero di soggetti non abusatori di alcol in basse concentrazioni (1-2% della concentrazione totale della transferrina). L'abuso di alcol determinerebbe attraverso fasi di inibizione enzimatica mediate dall'acetaldeide, una riduzione del grado di glicosilazione della Tf, producendo un incremento della CDT. E' stato infatti rilevato come l'assunzione quotidiana di almeno 50-80 g di etanolo per una settimana determini un aumento significativo della CDT serica in circa l'80% dei soggetti. A seguito di astinenza la concentrazione sierica di CDT si dimezza in circa 10-15 giorni.

Aspetti analitici

I metodi strumentali attualmente impiegati per la determinazione della CDT si avvalgono di separazioni

basate sul diverso punto isoelettrico (pI), sul rapporto carica/massa o sul riconoscimento strutturale di biomolecole e sono rappresentati principalmente dalla focalizzazione isoelettrica (IEF), dalla cromatografia liquida a scambio ionico, dall'elettroforesi capillare (CZE) e dalla spettrometria di massa.
La focalizzazione isoelettrica (IEF) e' stata la metodica d'elezione in numerosi studi di base, in valutazioni sia qualitative che quantitative[10,11]. Le isoforme della transferrina sono separate in base al loro diverso punto isoelettrico in un gel a gradiente di pH adeguato. Successivamente alla separazione, le bande di transferrina sono visualizzate mediante immunofissazione (IEF/IF) e colorazione dei complessi CDT-anti-Tf con determinazione quantitativa tramite analisi densitometrica. Tale tecnica risulta molto efficiente ma poco riproducibile dal punto di vista quantitativo[12,13] a causa delle complesse e non standardizzate procedure analitiche e all'eccessivo range dinamico richiesto all'analisi densitometrica dovendosi leggere con accuratezza e precisione sia le bande della tetrasialo transferrina che contengono 80-85% della proteina sia le bande CDT correlate che nel normale sono dell'ordine dell'1-2%.
Allo scopo di semplificare l'analisi e di migliorare la riproducibilità in termini quantitativi, e la produttività, notoriamente punti deboli delle tecniche di gel elettroforesi, e' stato proposto un metodo basato sulla cromatografia eseguita con microcolonna a scambio anionico, seguito da determinazione immunometrica (MAEC/RIA): il siero ferro-saturo viene fatto percolare attraverso una microcolonna a scambio anionico che fissa la transferrina in funzione inversa al numero di residui di acido sialico. Sull'eluato, che contiene teoricamente solo le isoforme CDT-correlate, viene quindi eseguito un saggio immunometrico che impiega un antisiero anti-transferrina non selettivo per le varie isoforme[8].
Una determinazione strumentale della CDT mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) a scambio ionico e' stata introdotta da Jeppsson et al (1993)[14], su colonna Mono-Q, con rivelazione UV-Vis a 460 nm del complesso Fe-Tf. La determinazione via HPLC offre il vantaggio di poter identificare direttamente le isoforme della transferrina riducendo così i rischi di errore intrinsecamente associati alle tecniche immunologiche. Su questa base la determinazione della CDT mediante HPLC/UV-Vis è divenuto il metodo di riferimento. Tuttavia tale metodica richiede lunghi tempi per il pretrattamento del campione, per l'eluizione e per la rigenerazione della colonna ed inoltre risulta piuttosto costosa a causa dell'elevato costo delle colonne stesse.
Recentemente un metodo rapido per la determinazione della CDT è stato sviluppato impiegando la cromatografia liquida di immunoaffinità associata alla spettrometria di massa con sorgente ESI (electrospray ionization)[15]. Le isoforme della transferrina vengono separate dapprima mediante il passaggio attraverso la colonna di immunoaffinità, e successivamente concentrate in una colonna C_4 prima di venire sottoposte ad identificazione con spettrometria di massa.
Attualmente la determinazione della CDT viene eseguita prevalentemente avvalendosi dell'impiego di kits commerciali basati su evoluzioni del metodo inizialmente proposto da Stibler[8]. Tuttavia impiegando le microcolonne proposte nella prima fase analitica la separazione delle isoforme può essere incompleta con coeluizione parziale nelle frazioni CDT dell'isoforma trisialo-transferrina. La possibilità di eluizione di frazioni di transferrina "non CDT" è un limite rilevante nell'affidabilità del metodo in quanto, come sopra ricordato, gli antisieri usati nell'immunodosaggio non sono specifici verso le isoforme CDT correlate. Quindi la selettività analitica dipende quasi esclusivamente dalle colonne monouso, la cui riproducibilità non può essere controllata da misure di standardizzazione interna. In condizioni normali la trisialo-transferrina rappresenta dal 3 al 9% della concentrazione totale della transferrina, contro un 1-2% della CDT, per questo anche una coeluizione solo parziale può influire sensibilmente sui valori determinati[8,16]. Con queste metodiche, inoltre, la presenza di una situazione di eterozigosi in cui, accanto alla transferrina C, siano espresse varianti genetiche della proteina, tipo varianti D o B, può portare ad un errore interpretativo per coeluizione di queste varianti nelle frazioni della CDT.

L'elettroforesi capillare

L'elettroforesi capillare (CE) rappresenta l'ottimizzazione strumentale delle tecniche elettroforetiche largamente utilizzate sin dalla fine del secolo scorso[17,18]. E' una tecnica sostanzialmente nuova in quanto, seppur basata sui principi tradizionali della classica elettroforesi, è caratterizzata da un peculiare sistema di separazione all'interno di capillari di diametro interno ridotto (20-100 μm) frequentemente con rivelazione ottica di tipo "on column". Il calore generato all'interno del capillare viene efficientemente dissipato attraverso le pareti permettendo così l'impiego di alti voltaggi (400-1000 V/cm) che consentono una più rapida separazione e una migliore efficienza.
L'altissima efficienza di separazione, i ridotti tempi di analisi, il basso consumo di reagenti, l'interfacciamento con differenti sistemi di rilevazione e la possibilità di operare separazioni basate su principi chimico-fisici diversi, impiegando la stessa strumentazione di base, rendono la CE estremamente versatile ed in grado di affiancarsi a e/o competere con le tecniche analitiche più affermate sia di tipo elettroforetico che cromatografico. La strumentazione di base della CE e' semplice: include un capillare, i cui estremi (inlet e outlet) sono immersi in due recipienti (reservoir) distinti contenenti il tampone (buffer), dotato di una "finestra" che consente la rilevazione,un rivelatore, generalmente UV, un sistema di iniezione e, in

ciascun reservoir, un elettrodo di platino collegato con la sorgente di potenziale ad alto voltaggio a completare il circuito elettrico. Poiche' il volume interno dei capillari utilizzati in CE e' assai limitato, per ottenere una elevata efficienza, caratteristica delle separazioni capillari, devono essere iniettati solo piccoli volumi di campione (20-40 nl). I capillari utilizzati sono, in genere, di silice fusa rivestita esternamente di poliimide per garantire loro una adeguata elasticità e resistenza meccanica. Il diametro interno varia tra i 20 e i 100 μm e la lunghezza e' compresa tra i 20 e 100cm. Sulle pareti interne del capillare hanno origine due importanti fenomeni che influenzano in modo sostanziale il processo di separazione: l'adsorbimento di composti sulla superficie e il flusso elettroendoosmotico (EOF).
L'EOF origina dal fatto che a valori di pH maggiori di 1.5, la silice presenta i gruppi silanoli in forma ionizzata, che pertanto attraggono i cationi del campione. Si realizza così una nuvola cationica nei pressi della parete, che equilibra le cariche negative fisse. L'applicazione del campo elettrico lungo il capillare causa la migrazione di una parte di questi cationi verso il catodo, con conseguente trasporto di acqua per ragioni osmotiche generando un flusso di tampone. Normalmente i potenziali usati nelle separazioni sono costanti . Sia la velocità della migrazione elettroforetica degli analiti, che la velocità dell'EOF sono proporzionali al campo elettrico e quindi alla differenza di potenziale applicata. L'impiego di alti potenziali comporta una maggiore efficienza del sistema, essendo sfavorito il fenomeno della diffusione durante il processo elettroforetico, ma a valori troppo elevati il calore sviluppato per effetto Joule determina moti convettivi che provocano una rapida degradazione della capacità separativa. In CE possono essere usati vari tipi di rivelatori: di assorbanza, di fluorescenza, elettrochimici, spettrometri di massa.

L'elettroforesi capillare applicata allo studio della CDT

Nel 1989 Kilar e Hjerten[19,20] hanno applicato la focalizzazione isoelettrica capillare (CIEF) alla separazione delle principali isoforme della transferrina umana, ma a causa di una rilevante complessita' analitica questo metodo non venne applicato per svolgere esami di routine. Successivamente, gli stessi autori hanno impiegato tecniche di CZE per la separazione delle isoforme della transferrina mediante l'utilizzo di capillari rivestiti internamente di poliacrilammide. Nel 1996 Oda e Landers[21] hanno pubblicato uno studio dettagliato sulla separazione in CZE delle isoforme della transferrina di specie diverse (inclusa quella umana) impiegando capillari non rivestiti, tamponi borato e diversi additivi cationici. I risultati si erano dimostrati promettenti, dal momento che era stata realizzata la separazione delle quattro principali isoforme della transferrina umana ferro-satura, tuttavia il metodo si era dimostrato inadeguato per l'applicazione clinica in termini di durata delle analisi e risoluzione. Più recentemente è stata riportata, da parte di Oda e Prasad (1997)[22] un'eccellente separazione usando capillari rivestiti (DB-17) e tamponi contenenti cellulose alchilate (idrossietilcellulosa e metilcellulosa). Questo approccio analitico è stato applicato con successo per determinare le isoforme della transferrina in pazienti con un difetto congenito del metabolismo delle glicoproteine (carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome) e in alcolisti cronici. Tuttavia entrambi questi metodi richiedono una complessa preparazione del campione, basata su tecniche di immunoestrazione del siero.
Allo scopo di poter applicare l'analisi CZE della CDT in ambito routinario, un metodo alternativo è stato proposto dal nostro gruppo di ricerca[23]. Tale metodo implica l'uso di un tampone borato 100mM a pH 8.3 e di un capillare non rivestito con un diametro interno di 20 μm. La rivelazione viene effettuata ad una lunghezza d'onda di 200nm. Mediante questo metodo e' stata ottenuta la separazione delle isoforme della transferrina in tempi ragionevoli (20 min), senza complessi pretrattamenti del campione (saturazione con soluzione ferrica e diluizione in acqua 1:10). La metodica è risultata essere sufficientemente accurata e precisa per applicazioni routinarie. Ulteriori miglioramenti hanno previsto l'aggiunta di 1.5mM di diaminobutano (DAB), un additivo cationico, in grado di ridurre le interazioni delle proteine con la parete del capillare. A seguito di tale aggiunta sono migliorate efficienza ($N > 10^6$), risoluzione e sensibilità[24].
Più recentemente sono stati proposti kit commerciali per la determinazione della CDT in elettroforesi capillare. La metodica su cui questi sono basati prevede l'impiego di capillari di 50 μm di diametro interno, nonchè l'uso di un doppio coating dinamico per la separazione. Con questa metodica i tempi di analisi sono molto ridotti (6 minuti) e la riproducibilità è elevata[25,26,27].

Parte sperimentale

Scopo del presente lavoro è stata la verifica dell'affidabilità della determinazione immunometrica della CDT mediante un validato metodo strumentale impiegante l'elettroforesi capillare. Questo studio mirava a verificare la correttezza, particolarmente per scopi medico legali e/o amministrativi, dell'impiego di tecniche, quali le immunometriche, generalmente non accettate per impiego al di fuori di un ambito strettamente clinico.

Metodi

Campioni

Sono stati analizzati i sieri di 60 soggetti di età compresa tra i 28 e 50 anni ai quali era stata ritirata la

patente per guida in stato di ebbrezza. Sono inoltre stati analizzati altri 60 sieri provenienti da soggetti donatori di sangue, di età compresa tra i 18 e i 40 anni, di cui non era noto il consumo di alcol. I campioni sono stati raccolti in un intervallo di tempo compreso tra ottobre 2003 e febbraio 2004 presso l'Unità operativa autonoma di Laboratorio dell'Azienda Sanitaria ULSS 20 di Verona. Ciascun siero è stato suddiviso in due aliquote, una delle quali è stata sottoposta immediatamente a screening immunologico, mentre l'altra è stata conservata a -20°C per l'analisi in CE.

Metodi

Immunoassay

La determinazione mediante immunoassay è stata eseguita utilizzando un Kit commerciale (%CDT-TIA, Axis Shield, Oslo, Norvegia). L'analisi è stata eseguita seguendo le istruzioni del kit. In breve la procedura prevedeva una fase di saturazione ferrica, seguita dall'estrazione delle isoforme CDT-correlate mediante colonnine a scambio anionico monouso e dalla determinazione immunoturbidimetrica dell'estratto.

Elettroforesi capillare

Tutte le analisi sono state condotte con un elettroferografo capillare P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Fullerton, CA) dotato di un detector UV a lunghezza d'onda singola con un filtro di interferenza a 200nm. I capillari erano di silice fusa, uncoated della lunghezza totale di 57 cm, effettiva di 50 cm e diametro interno di 50 μm (Beckman Coulter). Ogni mattina il capillare è stato lavato con NaOH 1M per 5 minuti, seguiti da un lavaggio con NaOH 0.1 M per 5 minuti, acqua per 10 minuti e tampone di corsa per 15 minuti. Successivamente il sistema veniva condizionato applicando un voltaggio di 20 kV per 20 minuti, fino al raggiungimento di una linea di base ottimale. L'iniezione è stata eseguita applicando una pressione iniziale di 0.5 psi per 20 secondi. Il tampone di corsa era composto da 100 mM sodio tetraborato portato a pH 8.3 con 6M HCl ed addizionato con diamminobutano (DAB) (SIGMA, Saint Louis, MO, US) alla concentrazione finale di 2 mM. Il voltaggio applicato era di 13,9 kV (corrente di 14 mA), la temperatura di 25°C. La rivelazione era a 200nm. Prima dell'iniezione, i campioni di siero (0,2 ml) sono stati saturati con ferro attraverso un'incubazione con una soluzione contenente 10 mM di $FeCl_3$ (5 μl) e 500 mM $NaHCO_3$ (5 μl) per 30 minuti e successivamente diluiti 1:8 in acqua.

Calcolo dei risultati e analisi statistica

La concentrazione delle isoforme della CDT misurata tramite CE è stata espressa come percentuale del rapporto delle aree dei picchi delle diverse isoforme rispetto all'area del picco della tetrasialo-Tf. La concentrazione della CDT attraverso analisi %CDT-TIA è stata espressa come percentuale delle diverse isoforme sulla transferrina totale. L'analisi statistica è stata condotta utilizzando parametri di statistica descrittiva. La correlazione statistica è stata condotta attraverso il metodo dei minimi quadrati.

Risultati

Il metodo CE per l'analisi della CDT utilizzato in questo lavoro è stato già dettagliatamente descritto in altri lavori[23,24,25,26,27], tuttavia è necessario sottolineare che la separazione delle differenti isoforme della CDT (asialo-Tf, monosialo-Tf, disialo-Tf) tra di loro e tra le altre isoforme non CDT (tetrasialo-Tf, pentasialo-Tf) è completa. La sensibilità è adeguata per la determinazione della disialo-Tf, la maggiore componente della CDT sia in soggetti normali che in alcolisti cronici pur con rivelazione UV diretta, senza necessità di colorazione, blotting o altra procedura (Figura 2).
Le componenti minori della CDT, e in particolare la asialo-Tf possono essere quantificate solo quando la loro concentrazione è elevata, fenomeno che si verifica solamente nei sieri contenenti elevate percentuali di disialo-Tf (~10%). Quindi il valore diagnostico di questa componente nella maggioranza dei casi di interesse medico legale è limitato e conseguentemente il presente lavoro è basato unicamente sulla determinazione della disialo-Tf. I campioni analizzati con il saggio immunologico commerciale (con cut-off 2,6%) presentavano risultati sia normali che borderline che elevati (range 1-12%, media 3,25%, SD 1,38). Gli stessi campioni analizzati mediante CE fornivano risultati in un range compreso tra 1.0 e 11.0% con un valore medio di 3.05% (SD 2,52). E' stata rilevata una correlazione altamente significativa ($P<0.001$) tra la CE e l'immunoassay, come descritto dall'equazione $y=1,6146x-2,2059$ ($R=0.8743$, $n=120$) dove x corrisponde ai risultati della CE ed y ai risultati dell'immunoassay (Figura 3).

Nonostante l'elevata significatività statistica della correlazione, è stata osservata un'ampia dispersione dei dati.
Allo scopo di indagare più accuratamente questo problema abbiamo suddiviso i casi in tre gruppi secondo i risultati del saggio immunologico. Il primo sottogruppo (media 3,02% ± 0,57, n=30) includeva i sieri con valori di CDT borderline (2,6%-4% CDT-TIA). Il secondo sottogruppo (media 2,4% ± 0.57, n=60) includeva i campioni con valori di CDT normali (%CDT-TIA <2,6%) e il terzo sottogruppo (media 5,21% ± 1,22, n=30) i valori medio-alti di CDT (CDT-TIA >4%). Il sottogruppo che ha mostrato indici di correlazione più elevati tra analisi CE e saggio

Figura 2. Sinistra**:** esempio di elettroferogramma delle isoforme della CDT presenti nel siero di un soggetto normale (asialo-Tf=0, monosialo-Tf=0 , disialo-Tf=1,91%).
Destra: soggetto abusatore di alcool (asialo-Tf=10,16%, monosialo-Tf=0 , disialo-Tf=26,34 %).

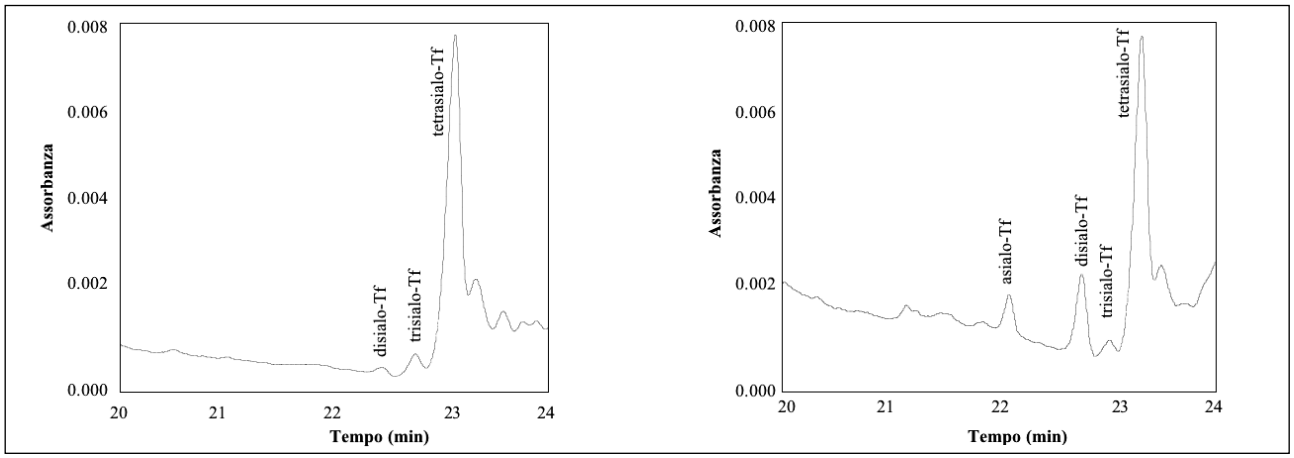
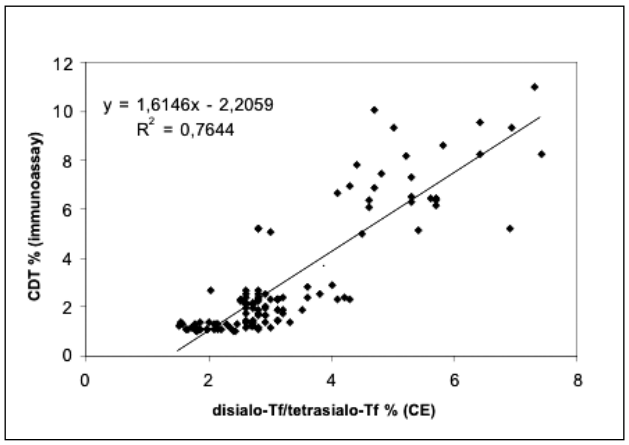


Figura 3. Diagramma delle concentrazioni della disialo-Tf (CE) vs. %CDT-TIA. Campioni: siero di 120 soggetti i cui valori di CDT ottenuti con screening immunologico variavano in un range di 1-12%, con cut off 2.6% (y=1,5942x-2,1233, R^2=0,7606).



immunologico si è rivelato essere il terzo (y=1,4523x-0,2861, R=0,8322); comunque anche il gruppo dei valori normali presentava una correlazione significativa, seppur di grado inferiore (y=0,2242x+0,8362, R=0,5365). Di particolare rilievo la scarsa correlazione nel gruppo più critico, cioè quello dei valori borderline (y=0.1253x+1.9955, R= 0,2567), che non raggiungeva la significatività statistica.
I confronti qui discussi descrivono una buona correlazione generale tra i dati in CE e i dati ricavati dal saggio immunologico, ma indicano chiaramente che in alcune situazioni si può verificare una notevole discordanza tra i due metodi, particolarmente nei casi borderline. Per questo motivo, è necessario confermare i dati ottenuti tramite saggio immunologico con analisi strumentale come la CE, almeno nei campioni che si verificano positivi allo screening.

Conclusioni

In tossicologia forense, un criterio universalmente accettato richiede la sistematica conferma dei dati ottenuti impiegando l'immunoassay con tecniche più specifiche e almeno altrettanto sensibili e indipendenti per quanto riguarda i principi chimico-fisici impiegati. Tale considerazione ampiamente accettata nell'ambito dell'analisi di sostanze d'abuso in campioni biologici, dovrebbe essere rigorosamente applicata anche all'analisi della CDT, come consigliato da Stout[28], data la rilevanza di questa analisi in ambito forense o amministrativo. Tuttavia, secondo la nostra esperienza[29], la maggior parte delle analisi della CDT sono condotte attraverso saggi immunologici senza ulteriore conferma. Il presente studio mette in evidenza come i risultati del saggio immunologico risultino spesso inaccurati, quando confrontati con un metodo strumentale come la CE. Ciò è stato confermato anche da un recente studio condotto da altri autori nel quale sono stati posti a confronto i risultati ottenuti con un kit immunologico (CDTect, Bio-Rad) con un metodo HPLC[30].
Da un punto di vista strettamente operativo, la CE fornisce determinazioni selettive e accurate delle principali isoforme della CDT, con maggiore produttività e semplicità operativa e con costi inferiori a qualsiasi altra tecnica strumentale (HPLC, IEF, etc). Perciò la CE può essere raccomandata almeno come analisi di conferma dei risultati all'immunoassay. L'aumento della produttività che può essere facilmente ottenuto con l'introduzione di sistemi multicapillari, potrebbe facilmente consentire la sua applicazione anche per l'analisi routinaria di screening. In questo caso, comunque, una tecnica di conferma sarebbe consigliabile, e in questo caso la HPLC potrebbe rappresentare la prima scelta. Sulla base delle precedenti considerazioni ed in particolare della rilevante inaccuratezza riscontrata con i metodi immunometrici di determinazione, è lecito chiedersi se molta della contrastante letteratura scientifica sulla CDT, in generale basata sull'applicazione di immunoassay senza conferma, non debba essere interamente riveduta e forse riscritta impiegando metodi analitici finalmente accurati.

Bibliografia

1. Conigrave KM, Saunders JB, Whitfield JB. Diagnostic tests for alcohol consumption. Alcohol Alcoholism 1995;30: 13-26.
2. Mihas AA, Tavassoli M,. Laboratory markers of ethanol intake and abuse: a critical appraisal. Am J Med Sci 1992; 303: 415-428.
3. Allen JP, Litten RZ, Anton RE, Cross GM. Carbohydrate-Deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. Clin Chem 2001; 47: 13-27.
2. Musshoff F, Daldrup TH. Determination of biological markers for alcohol abuse. J Chromatogr B 1998; 713: 245-264.
5. Moussavian JN, Becker RC, Piermeyer JL, Mezey E, Bozian RC. Serum gamma-glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism: influence of alcohol ingestion and liver disease. Digest Dis Sci 1985; 20: 211-214.
6. Karkkeinen P, Poikolainen K, Salaspuro M. Serum hexosaminidase as a marker for heavy drinking. Alcohol Clin Exp Res 1990; 14: 187-190.
7. Voltaire A, Beck O, Borg S. Urinary 5-Hydroxytryptophol: a possible marker of recent alcohol consumption. Alcohol Clin Exp Res 1992; 16: 281-285.
8. Stibler H, Borg S, Joustra M. A modified method for the assay of the carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum. Alcohol Alcohol suppl 1991; 1: 451-454.
9. Arndt T. Carbohydrate-deficient Transferrin as a marker of Chronic Alcohol Abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. Clin Chem 2001; 47: 13-27.
10. Stibler H, Kjellin KG. Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. J Neurol Sci 1976; 30: 269-285.
11. Stibler H, Allgulander C, Borg S, Kjellin KG: Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. Acta Med Scand 1978; 204: 49-56.
12. Girela E, Hernandez-Cueto C, Villanueva E. Carbohydrate-deficient transferrin as indicator of alcohol misuse: evaluation of problems in the methodology. Alcohol Alcohol 1991; 26: 653-654.
13. Xin Y, Rosman S, Lasker JM, Lieber CS. Measurement of carbohydrate-deficient transferrin by isoelectric focusing/Western Blotting and by micro anion-exchange chromatography/radioimmunoassay: comparison of diagnostic accuracy. Alcohol Alcohol 1992; 27: 425-433.
14. Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. Clin Chem 1993; 39: 2115-2120.
15. Lacey JM, Bergen HR, Magera MJ, Naylor S, O'Brien JF. Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. Clin Chem 2001; 47: 513-518.
16. Bean P, Liegmann K, Lovli T, Wetsby C, Sundrehagen E: Semiautomated procedures for evaluation of carbohydrate-deficient transferrin in the diagnosis of alcohol abuse. Clin Chem 1997, 43: 983-989.
17. Jorgenson JV, Lukacs KD. High resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis. J Chromatogr 1981; 218: 209-216.
18. Trout AL, Prasad R, Coffin D, DiMartini A, Lane T, Blessum C, Khatter N, Landers JP. Direct capillary electrophoretic detection of carbohydrate-deficient transferrin in neat serum. Electrophoresis 2000; 21: 2376-2383.
19. Kilar F, Hjerten S. Separation of the human transferrin isoforms by carrier-free high performance zone electrophoresis and isoelectric focusing. J Chromatogr 1989; 20: 351-357.
20. Kilar F, Hjerten S. Fast and high resolution analysis of human serum transferrin by high performance isoelectric focusing in capillaries. Electrophoresis 1989; 10: 23-29.
21. Oda RP, Landers JP. Effect of cationic buffer additives on the capillary electrophoretic separation of serum transferrin from different species. Electrophoresis 1996; 17: 431-437.
22. Oda RP, Prasad R, Stout RL, Coffin D, Patton WP, Kraft DL, et al. Capillary electrophoresis-based separation of transferrin sialoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. Electrophoresis 1997; 18: 1819-1826.
23. Tagliaro F, Crivellente F, Manetto G, Puppi I, Deyl Z, Marigo M. Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis 1998; 19: 3033-39.
24. Crivellente F, Fracasso G, Valentini R, Manetto G, Riviera A, Tagliaro F. Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis. J Chromatogr B 2000; 739: 81-93.
25. Wuyts B, Delanghe JR. The analysis of carbohydrate-deficient tranferrin, marker of chronic alcoholism, using capillary electrophoresis, Clin Chem Lab Med 2003; 41: 739-746.
26. Wuyts B, Delanghe JR, Kasvosve I, Gordeuk VR, Gangaidzo IT, Gomo ZA. Carbohydrate-deficient transferrin and chronic alcohol ingestion in subjects with transferrin CD-variants. Clin Chem Lab Med 2001;39:937-43.
27. Wuyts B, Delanghe JR, Kasvosve I, Wauters A, Neels H, Janssens J. Determination of carbohydrate-deficient transferrin using capillary zone electrophoresis. Clin Chem 2001; 47:247-55.
28. Stout RL: Detecting alcohol abuse: the value of carbohydrate-deficient transferrin. J. Insurance Med 1998; 30: 123-124.
29. Tagliaro F, Bortolotti F, Crivellente F, Cittadini F. Objective diagnosis of alcohol abuse-determiantion of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) with capillary electrophoresis. Forensic Sci. Rev. 2000; 12: 133-148.
30. Turpeinen U, Methuen T, Alfthan H, Laitinen K, Salaspuro M, Stenman UH. Comparison of HPLC and small-column (CDTect) methods for disialotransferrin, Clin Chem. 2001; 47: 1782-1787.