

Studio delle varianti genetiche della transferrina nella popolazione bresciana con un metodo HPLC

Marzia Bernini, Daniela Ruffini

Dipartimento di Specialità Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Medico Forensi, Cattedra di Medicina Legale, Università degli Studi di Brescia

Caro Editore,

la transferrina carboidrato-carente (CDT) è internazionalmente accettata come efficace marcatore di assunzione cronica di alcool (1). In particolare, con l'acronimo CDT si indicano le isoforme della transferrina sierica con $pl >5,7$ (disialotransferrina, asialotransferrina e monosialotransferrina) (2,3). Come conseguenza dell'abuso alcolico è stato dimostrato un incremento delle isoforme asialo- e disialo- della transferrina senza un sostanziale cambiamento nell'isoforma maggiormente rappresentata nel siero costituita dalla tetrasialotransferrina (4).

Esistono differenti varianti genetiche di transferrina dovute alla sostituzione di diversi amminoacidi nella catena polipeptidica (5). Sono conosciute circa quaranta sostituzioni differenti, di cui almeno quattro mostrano una prevalenza $>1\%$; in particolare, la variante C è la più frequente (oltre il 95% di tutte le varianti rilevate) nella popolazione caucasica. Le varianti B e D possono interferire con la determinazione della CDT. Infatti il pl della forma intatta della transferrina D è simile alla forma carboidrato-carente della transferrina C. Per tale motivo può accadere che persone che assumono quantità normali di alcool possano risultare falsamente positive all'esame in quanto eterozigoti per la transferrina CD. L'interferenza della variante D nel determinare una sovrastima di CDT dipende non solo dal sottotipo personale, ma anche dal metodo di determinazione. La variante B, invece, ha un pl minore e coeluisce con le forme normali, cosicché il bevitore cronico di alcool portatore di variante genetica di tipo B può risultare falsamente negativo alla determinazione della CDT.

Lo scopo del presente studio è stato di valutare la prevalenza delle varianti della transferrina nella popolazione bresciana rilevate sui tracciati di HPLC eseguiti per la determinazione della CDT nei campioni inviati al nostro laboratorio. Nello studio sono stati valutati 2442 campioni di sangue, utilizzati in maniera anonima, relativi a soggetti (2331 maschi e 111 femmine) sottoposti ad esame alcolemico in ottemperanza ai controlli relativi all'articolo 186 del Nuovo Codice della Strada, raccolti nel periodo maggio 2004-maggio 2006. La CDT è stata determinata su siero conservato a -20°C fino al momento dell'analisi. Tutti i reattivi utilizzati per l'effettuazione dell'analisi erano prodotti da Recipe Chemical+Instruments e commercializzati in Italia da B.S.N. Ad un'aliquota di $150\ \mu\text{L}$ di siero erano aggiunti $30\ \mu\text{L}$ di reagente stabilizzante e successivamente $10\ \mu\text{L}$ di una soluzione contenente una miscela di precipitanti per le lipoproteine e di saturante per il ferro. Dopo incubazione e centrifugazione, erano prelevati $100\ \mu\text{L}$ di sovrantante diluiti 1:10 in acqua Millipore ed ogni campione analizzato con metodo HPLC/UV in un sistema fornito da Thermo Electron Corporation; l'analisi era conseguita in gradiente, con lettura alla lunghezza d'onda di $460\ \text{nm}$ e velocità di fase mobile di $1\ \text{mL/min}$. Il cutoff di positività adottato per la CDT, espresso come percentuale di disialotransferrina rispetto alla transferrina totale, era pari al 2%, valore precedentemente individuato con uno studio su popolazione locale di riferimento. Nella nostra casistica, costituita per il 96% (2331/2442 soggetti) da individui di sesso maschile, i campioni positivi, tutti di soggetti maschi, sono stati 118, pari al 4,8% del totale della popolazione. La media del valore di CDT dei campioni positivi è risultata uguale a 3,31%, con un intervallo compreso tra 2,1% e 14,9%.

Il numero di varianti genetiche della transferrina rilevato è risultato pari a 3 (0,80%) nei sei mesi del 2004, a 10 (0,65%) nell'anno 2005 e a 3 (0,52%) nei 6 mesi del 2006, per un totale di 16 casi (0,65%) nel periodo di 24 mesi preso in considerazione. Tali varianti genetiche sono state individuate esclusivamente sulla base del profilo cromatografico ed in nessuno dei casi si è proceduto con l'identificazione del tipo di variante, limitandosi ad indicare nel referto la sua presenza.

La determinazione della CDT mediante tecnica HPLC, consentendo di verificare il profilo delle isoforme, è particolarmente utile nel caso in cui ci si trovi in presenza di varianti genetiche della transferrina, che risultano ben riconoscibili, in quanto, nonostante l'isoforma non CDT di una variante possa mostrare tempi di eluizione identici a quelli di un'isoforma CDT della transferrina nativa, sul cromatogramma si rilevano modificazioni tipiche a carico della tetrasialotransferrina della variante (Figura 1). Con la valutazione del tracciato del campione analizzato in HPLC si riduce quindi la percentuale di campioni che possono essere interpretati come falsamente positivi per la CDT, ma che in realtà sono espressione di varianti genetiche.

Nel nostro laboratorio, in tutti i casi di varianti genetiche della transferrina non si è proceduto al calcolo della percentuale di disialotransferrina rapportata al totale delle aree cromatograficamente ottenute, ma ci si è limitati alla sola indicazione qualitativa di presenza di variante.

La bassa percentuale di varianti genetiche della transferrina rilevate sulla popolazione selezionata rende la CDT

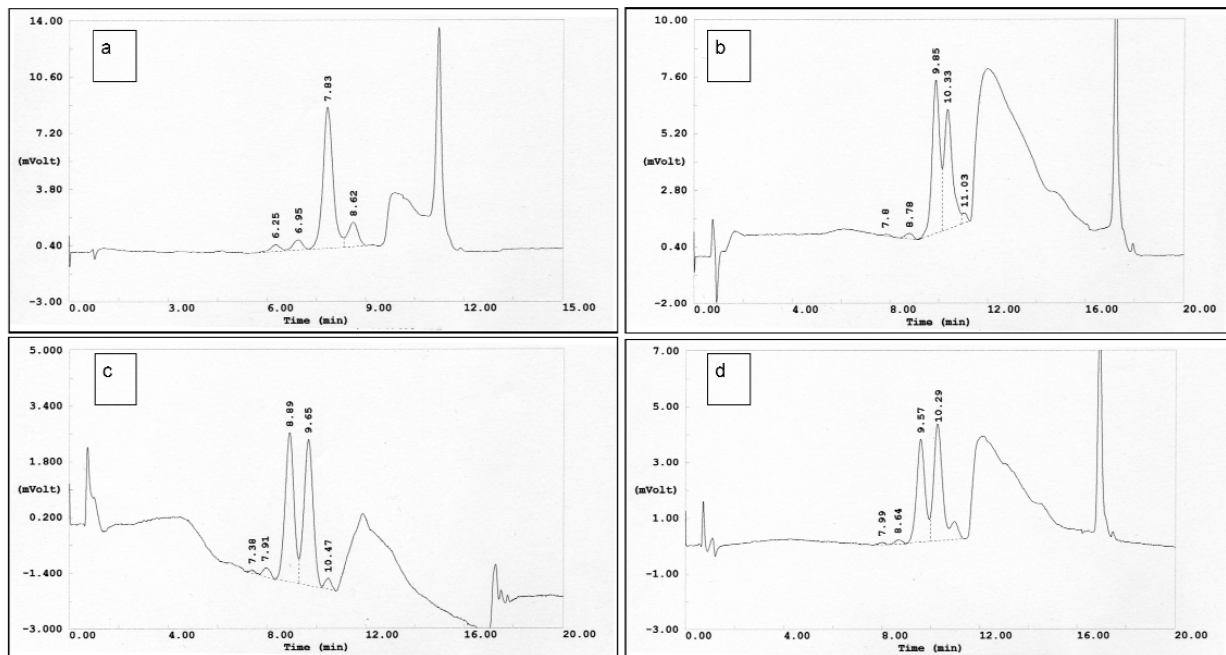


Figura 1

Esempi di tracciati cromatografici ottenuti nel nostro studio. a) Tracciato cromatografico della transferrina A nativa: sono riconoscibili da sinistra la disialotransferrina (tempo di eluizione (t.e.) 6,25 min), la trisialotransferrina (t.e. 6,95 min), la tetrasialotransferrina (t.e. 7,83 min) ed infine la pentasialotransferrina (t.e. 8,62 min). b-d) sono riconoscibili 3 diversi profili di variante rispetto al cromatogramma a). Con il metodo HPLC in uso le diverse varianti non sono direttamente identificabili come B, C o D ma solo rilevabili cromatograficamente.

un parametro utilizzabile senza problemi interpretativi nella quasi totalità della popolazione. Tuttavia, nel caso di presenza di varianti, è necessario disporre di metodologie alternative a più elevata specificità per fornire indicazioni accurate all'autorità giudiziaria. La ricerca sistematica su ampi strati di popolazione potrebbe portare ad una più accurata definizione dell'incidenza delle varianti della transferrina, anche in funzione delle diverse etnie che attualmente compongono il tessuto sociale, promuovendo anche lo studio di avanzamenti metodologici e strumentali necessari per la corretta determinazione della CDT in presenza di tali varianti.

BIBLIOGRAFIA

1. Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;841:96-109.
2. Stibler H, Allgulander C, Borg S, et al. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Med Scand* 1978;204:49-56.
3. Helander A, Husa A, Jeppson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881-90.
4. Fleming MF, Anton RF, Spies CD. A review of genetic, biological, pharmacological and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1347-55.
5. Wuyts B, Delanghe J, Kasvosve I. Carbohydrate-deficient transferrin and alcohol ingestion in subjects with transferrin CD-variants. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:937-43.