

Transferrina carboidrato carente: marcatore di abuso alcolico cronico

Vincenza Bianchi^{1,2}, Annalisa Roveta²

¹Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera SS Antonio e C Arrigo Alessandria

²Scuola di Specializzazione di Patologia Clinica Università del Piemonte Orientale "A Avogadro" di Novara

ABSTRACT

Carbohydrate deficient transferrin: a marker of chronic alcohol abuse. Carbohydrate deficient transferrin (CDT) is a useful biomarker for monitoring the chronic use and abuse of alcohol. CDT is characterized by extreme micro-heterogeneity, and this characteristic makes it critical its measurement, more so in relation to legal environment where the measurement is often requested. There are different forms of transferrin, differing in their primary structure, iron load and sugar content. Even the definition of CDT should be reconsidered today with respect to that originally given by Stibler (1991), because of the more sophisticated technologies nowadays used for its identification and measurement. The quick availability of a standardized method, to serve as a reference basis for the harmonization of the commercial analytical systems (instruments and reagents), is also a high-priority need. In this review we discuss the biochemical, analytical and toxicological-legal problems linked to this marker of chronic alcohol abuse, in consideration of the increased number of determination-requests observed in the last years.

INTRODUZIONE

Il problema dell'uso e dell'abuso di alcol è di grande attualità oltre che entità: è un problema sociale e di emarginazione, ma è soprattutto un problema medico se si pensa alle numerose patologie correlate.

Negli Stati Uniti affligge circa 18 milioni di persone con una spesa sociale approssimativamente di 185 miliardi di dollari all'anno. Ogni anno circa 100.000 americani muoiono a causa di eventi legati all'uso di alcol. Un ragazzo su quattro, al di sotto dei 18 anni, vive in famiglie a rischio di problemi legati all'alcol e dal 20 al 40% dei ricoveri in ospedale sono da relazionarsi all'uso di tale sostanza¹.

In Italia dai dati della Società Italiana di Alcologia emerge che sono circa 32 milioni i bevitori regolari, mentre sono bevitori inadeguati- cioè persone che in qualche modo arrivano ad avere intossicazioni acute da uso di sostanze alcoliche- circa 3.5 milioni. Gli alcolisti, vale a dire soggetti che hanno dipendenza alcolica con patologie correlate sono circa un milione, mentre i decessi circa 30.000 all'anno e questo è un dato molto significativo se paragonato ai 1000 decessi/anno per tossicodipendenza: l'uso di alcol rappresenta la quarta causa di morte in Italia.

Il 10% degli assistiti dai Medici di Medicina Generale ha una patologia alcol correlata, il 10% dei ricoveri negli ospedali è legata al consumo di bevande alcoliche².

Da queste considerazioni emerge che, poiché il problema alcol è di grande rilevanza, è prioritario sviluppare strategie efficaci per prevenirlo, diagnosticarlo e trattarlo.

Nell'ambito della diagnosi di abuso alcolico è ormai accettata dalla comunità scientifica l'utilizzo della tran-

sferrina carboidrato carente (CDT) come marcatore biochimico più specifico rispetto ad altri quali γ -glutamilttransferasi, volume corpuscolare medio e rapporto tra le transferasi (AST/ALT). Poiché l'articolo 186 del Nuovo Codice della Strada vieta la guida in stato di intossicazione da alcol, la diagnosi di abuso alcolico entra fortemente nelle pratiche di ritiro e revisione delle patenti di guida.

Ad oggi molto è stato scritto sul rapporto tra CDT e abuso alcolico, ma, mentre è chiaro che la transferrina carboidrato carente è un ottimo marcatore biochimico, c'è ancora una zona grigia per quel che riguarda i metodi di dosaggio, anche se appare sempre più prepotentemente che la risoluzione dei dubbi avvenga con metodi separativi di riferimento e conferma.

Scopo della presente rassegna è la discussione degli aspetti biochimici, clinici, analitici e tossicologico-forensi di questo indicatore di abuso cronico di alcol

ASPETTI BIOCHIMICI

La Trasferrina, glicoproteina (β_1 -globulina) con la funzione di trasportare il ferro nel plasma, è costituita da una sola catena di 679 aminoacidi (peso molecolare da 75.37 a 79.61 kDa) separata in due domini globulari (N-terminale aminoacidi 1-336 e C-terminale aminoacidi 337-679) ciascuno dei quali può legare uno ione Fe^{3+} , indipendentemente uno dall'altro. Il dominio C-terminale porta due catene glucidiche legati all'N delle asparagine 413 e 611.

La transferrina lega reversibilmente numerosi cationi come ferro, rame, zinco, cobalto e calcio, ma solo il legame con il ferro ed il rame sembra avere significato fisiologico. Ciascuna molecola di transferrina ha la capacità

di legare al massimo due ioni ferro e associare un'anione (per bilanciare la carica dei cationi) che in vivo principalmente è bicarbonato, processo questo pH dipendente.

Il complesso Fe-Transferrina ha un'assorbanza massima a 470 nm e questo è importante per la sua rilevazione nell'analisi quantitativa.

La transferrina è sintetizzata dal fegato e in piccola quantità dal sistema reticolo endoteliale e dalle ghiandole endocrine come testicoli ed ovaie, con un'emivita di 7 giorni.

I livelli plasmatici sono regolati principalmente dalla disponibilità di ferro, in condizioni ferro carenti le concentrazioni plasmatiche di transferrina aumentano e dopo successiva somministrazione di ferro ritornano nella norma.

Prima della loro secrezione le glicoproteine subiscono complessi processi postranzionali. Infatti dopo l'incorporazione dell'oligosaccaride ricco di mannosio al polipeptide nel reticolo endoplasmatico ruvido e da un successivo riassetto, la glicosazione finale avviene nell'apparato del Golgi. Questo processo include l'aggiunta di N-acetilglucosamina, galattosio e acido sialico alle due unità glucidiche della proteina e coinvolge almeno cinque differenti enzimi glicosiltransferasici: N-acetilglucosamiltransferasi, I, II, IV, la galattosio e la sialil transferasi.

Le unità glucidiche sono aggiunte con un processo ranzionale dal precursore dolico-oligosaccaride attraverso l'azione di sistema multiglicosiltransferasico³.

La sialidasi di membrana plasmatica epatica rimuove gli intermedi glucidici dalla molecola di transferrina, che dopo glicosazione è escretata per esocitosi.

La transferrina presenta un'elevata eterogeneità, infatti mentre l'analisi elettroforetica su acetato di cellulosa rileva un'unica banda in zona β , l'utilizzo di tecniche a più elevata prestazione come l'isoelettrofocusing, evidenzia un elevato numero di bande.

Il primo livello di eterogeneità è dovuto al carico di ferro. Possono essere identificate quattro forme di transferrina: l'apotransferrina ($pI_{Fe_0} = 6.1$), le transferrine monoferriche dove il ferro è legato nei domini N- e C-terminali ($pI_{Fe_{1N}} = 5.8$ e $pI_{Fe_{1C}} = 5.7$) e la transferrina diferrica ($pI_{Fe_2} = 5.4$). Negli individui normali il livello di saturazione del ferro è circa il 30%.

Il secondo livello di eterogeneità è determinato dalla presenza e dalla composizione delle catene glicaniche. Queste sono costituite da residui di N acetilglucosamina, mannosio e galattosio e possono essere bi-, tri- e tetrantennate. Ciascuna antenna termina con una molecola di acido sialico che crea una carica negativa sulla sommità della catena. In linea teorica sono possibili transferrine con residui di acido sialico da 0 ad 8. Le forme asialo, monosialo, ottasialo non sono normalmente presenti nel siero.

La tetrasialo-Fe₁N-transferrina (due catene biantennate) con $pI = 5.4$ è la forma più abbondante (65-80%).

Il terzo livello di eterogeneità è situato a livello della struttura primaria. Si conoscono almeno 38 varianti genetiche che differiscono per uno o più aminoacidi.

Tre tipi di transferrina si possono trovare con prevalenza >1%. La transferrina C è la più comune nella popolazione caucasica, di questa si conoscono almeno 16 sottotipi (C1-C16) di cui quella chiamata C1 ha la più alta prevalenza (95%) il cui gene può avere due aplotipi che generano la C2 (la prolina in posizione 570 è sostituita da una serina) e la C3.

Ci sono poi la Transferrina B con migrazione più anodica e la Transferrina D con migrazione più catodica. Anche di queste si conoscono numerose varianti.

A tutte queste si aggiungono le associazioni eterozigote tra le varie C, D e B, nonché tra le C e le B e tra le C e le D.

Anche in condizioni normali sono presenti contemporaneamente le variazioni dovute alle sottostrutture della Transferrina. Se l'analisi viene fatta mediante isoelettrofocusing e la separazione avviene attraverso il pI , è possibile evidenziare 36 isoforme differenti per l'omozigosi e 72 per le eterozigoti. Di queste solo 3 (omozigosi) e 6 (eterozigoti) sono attribuibili a isoforme CDT.

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE UMANA: DEFINIZIONE E STRUTTURA

Stibler e Kjellin in Svezia per la prima volta evidenziarono isoforme della transferrina con $pI > 5.7$ nel liquido cefalorachidiano e nel siero di soggetti alcolisti. Queste isoforme che spariscono dopo astinenza erano costituite da asialo-transferrina, monosialo-transferrina e disialo-transferrina e più tardi insieme vennero identificate come CDT (transferrina carboidrato carente, carboidrato depleta o desialata).

Nel siero degli alcolisti si ha un decremento del contenuto di acido sialico e un assetto delle isoforme della transferrina uguale a quello trovato nel siero di individui non alcolisti quando entrambi vengono trattati con neuroamidasi (che rimuove completamente i residui di acido sialico dalle catene N glicaniche della transferrina). Dunque il difetto nella struttura glucidica nei soggetti che abusano di alcol è sicuramente a carico dell'acido sialico.

Ulteriori indagini hanno evidenziato che nel caso di uso elevato di alcol non solo mancano i residui di acido sialico, ma si ha anche una perdita delle ramificazioni più profonde nella catena di N glicani (galattosio, mannosio e N-acetilglucosamina) e una errata sequenza di mannosio, N-acetilglucosamina, N-acetilglucosamina, quest'ultima legata direttamente alla catena proteica.

E' stato inoltre dimostrato che le principali isoforme CDT – la disialo-Fe₂-transferrina e la asialo-Fe₂-transferrina perdono una delle due catene glicaniche com-

plete. La disialo-Fe₂-transferrina ha la forma di una catena biantennata con due residui di acido sialico, mentre l'asialo-Fe₂-transferrina non ha alcuna catena di carboidrati. Alcuni autori con studi di spettrometria di massa⁴ hanno evidenziato che la disialotransferrina può coesistere in due varianti anche se in quantità differenti, una con due residui di acido sialico sulla stessa catena glucidica, quantitativamente più importante e un'altra con due catene glucidiche ciascuna con un residuo di acido sialico. Queste due varianti della stessa isoforma hanno reattività immunologica differente se l'anticorpo riconosce sulla catena aminoacidica i siti liberi da zuccheri.

La trisialo-Fe₂-transferrina contiene due catene di N-glicani a forma biantennata (4 rami), una di queste termina alle due estremità entrambe con due residui di acido sialico, mentre l'altra termina con acido sialico su una estremità e con galattoso sull'altra.

Per questo motivo appare impossibile che la trisialo-Fe₂-transferrina si possa formare dalla pentasialo-Fe₂-transferrina che contiene una catena biantennata con due acidi salici e una catena triantennata con tre acidi sialici, per perdita di una catena N-glicanica biantennata.

D'altra parte, rimane ancora da chiarire come si possa formare la monosialo-Fe₂-transferrina, che fa parte della frazione CDT.

Attraverso studi di spettrometria di massa alcuni autori⁵ individuano una frazione "Ib" con massa molecolare tra la "Ia" (asialo-Fe₂-transferrina) e "IV" (tetrasialo-Fe₂-transferrina), a basso contenuto di acido sialico e con galattoso come residuo terminale. Inoltre essi ipotizzano che questa frazione sia una miscela "di transferrine con due catene N-glicaniche con antenna accorciata" e che questa "probabilmente contiene piccoli quantitativi di transferrina con una catena N-glicanica"¹⁰, da qui si potrebbe allora supporre che questa frazione contenga monosialo-Fe₂-transferrina e che la presenza di catene biantennate, trisialo-Fe₂-transferrina e monosialo-Fe₂-transferrina, nel siero dopo abuso cronico di alcol non possa essere spiegata soltanto con la perdita di una delle due catene glicaniche.

Queste considerazioni sono poco importanti per la definizione di CDT in quanto la monosialo-Fe₂-transferrina è quantitativamente bassa e la trisialo-Fe₂-transferrina non dovrebbe essere computata, mentre hanno rilevanza per lo studio degli effetti dell'alcol sull'incremento della frazione CDT la forma disialata.

Circa poi il ruolo della trisialo-Fe₂-transferrina c'è stato molto dibattito non del tutto chiarito⁶. Se da una parte è vero che avendo solo tre residui di acido sialico è una forma più povera in carboidrati rispetto alla isoforma più comune che è la tetrasialo-transferrina, dall'altra è stato anche chiarito⁸ che tale isoforma non è influenzata dall'assunzione di alcol per cui il suo inserimento

nella frazione CDT ha poco valore diagnostico e come tale poco interesse.

Recentemente alcuni autori^{7,8} hanno dimostrato che tra le isoforme CDT solo la asialotransferrina possiede una sensibilità ed una specificità >92%. Di contro autori svizzeri⁹ che hanno sperimentato l'utilizzo dell'asialo transferrina per il monitoraggio delle abitudini di giovani all'alcol hanno evidenziato che il suo uso è ottimale solo negli alcolisti conclamati.

EFFETTO DELL'ALCOL SUL METABOLISMO DELLA CDT

Anche se il meccanismo patogenomico dell'incremento della frazione CDT in presenza di abuso alcolico non è stata ancora completamente spiegata, un eccesso di alcol non sembra modificare la sintesi della catena polipeptidica, ma piuttosto la glicosazione. Studi in vitro nell'uomo e nel topo suggeriscono che l'etanolo e/o il suo metabolita acetaldeide diminuiscano l'attività degli enzimi responsabili della glicosazione, infatti sia a livello sierico che epatico le attività della mannosiltransferasi, galattosiltransferasi, N-acetil-glucosaminiltransferasi e sialiltransferasi sono diminuite.

Ancora, a livello della membrana degli epatociti, la presenza di alcol provoca un aumento dell'attività della sialidasi che potrebbe dare origine ad una desializzazione parziale della transferrina nel momento in cui avviene la secrezione: ciò potrebbe spiegare le isoforme monosialo-Fe₂-transferrina e trisialo-Fe₂-transferrina.

La prima tappa del catabolismo è l'idrolisi dei residui di acido sialico terminali della transferrina. L'alcol gioca un ruolo in questo processo poiché aumenta l'attività delle sialidasi di membrane e plasmatiche,

Al catabolismo della transferrina partecipano due tipi di recettori, quello della transferrina e quello delle asialoglicoproteine.

Il recettore della transferrina ha una forte affinità per le catene biantennate che terminano con un residuo di acido sialico (forte affinità per una transferrina con almeno due acidi salici sulla stessa catena) e partecipa al riciclaggio della transferrina. I recettori delle asialoglicoproteine riconoscono il galattosio, la N-acetilglucosamina o il mannosio come residui terminali. Essi riconoscono per esempio una catena biantennata in cui una delle antenne termina con un residuo diverso dall'acido sialico. Inoltre l'eliminazione della CDT è favorita dai lisosomi. La composizione nel sangue delle isoforme della transferrina è il risultato della competizione tra questi due tipi di recettore. Questa competizione spiega perché la disialo-Fe₂-transferrina che porta una catena glicanica biantennata è l'isoforma più abbondante. Dal momento che le isoforme dovrebbero essere degradate in seguito al legame con i recettori delle asialoglicoproteine, la presenza nel sangue degli alcolisti delle isoforme asialo e

monosialiche dimostra che l'alcol modifica il catabolismo della CDT inibendo l'attività dei recettori delle asialoglicoproteine.

Le modificazioni delle catene glicaniche aumentano l'emivita della proteina che è di 14 giorni per la CDT, mentre la transferrina non modificata ha un'emivita di 7 giorni.

Nei soggetti affetti da un disordine ereditario della sintesi di glicoproteine, la sindrome da glicoproteine carboidrato carenti (CDGS) è stato osservato un forte incremento della frazione CDT, anche in condizioni di consumo alcolico normale.

Infatti sono state evidenziate similitudini strutturali tra le glicoproteine del siero (transferrina, α 1-antitripsina e catena α dell'aptoglobina) di pazienti con abuso alcolico e pazienti che soffrono della CDGS (10). Queste evidenze suggeriscono che l'incremento di CDT indotto dall'alcol potrebbe anche essere attribuibile ad una inibizione del passaggio iniziale, mannosio-dipendente della sintesi della catena N-glicanica della transferrina. Poiché alcuni tipi di sindromi CDGS sono attribuibili a carenze di fosfomannosio mutasi (EC 5.4.2.8) e di fosfomannosioisomerasi (EC 5.3.1.8), potrebbe essere interessante misurare le corrispondenti attività enzimatiche anche nei bevitori.

Studi effettuati su soggetti trapiantati non bevitori hanno evidenziato che nel trapianto di solo fegato il livello della CDT è sempre normale, mentre nel trapianto associato di fegato e pancreas si possono trovare valori di CDT aumentato. Infatti il trapianto di pancreas causa iperinsulinemia, bicarbonato deficienza e acidemia metabolica. Poiché l'acidosi metabolica è comune dopo abuso alcolico e persiste dopo abuso alcolico cronico, sarebbe interessante valutare parallelamente il bilancio acido base e il livello di CDT negli alcolisti.

DETERMINAZIONE DELLA CDT: METODI ANALITICI

Anche se il dosaggio della CDT potrebbe essere utile da un punto di vista clinico per valutare la compliance di un determinato soggetto nei confronti dell'astinenza da alcol nei programmi riabilitativi, in Italia la CDT viene principalmente utilizzato per scopi medico legali al fine di valutare la idoneità al rilascio della patente di guida o di altri permessi quali il porto d'armi in soggetti valutati a rischio.

Poiché il dosaggio della CDT ha valore medico legale, il risultato derivato dalla sua determinazione può portare alla restrizione della libertà personale (art. 13 Costituzione della Repubblica Italiana), è per questo che il ruolo del Laboratorio diventa ancora più importante in quanto deve fornire un dato certo oltre ogni ragionevole dubbio.

E' allora necessario utilizzare sempre un metodo di conferma, quando il metodo di screening ha fornito risul-

tati "presumibilmente" positivi¹¹.

La microeterogeneità della transferrina, la somiglianza delle isoforme CDT a quelle non CDT e la loro relativamente bassa concentrazione fanno sì che il dosaggio della CDT sia abbastanza difficile soprattutto nella fase di separazione. La separazione viene effettuata, dopo aver uniformato il contenuto di ferro della transferrina saturandone il campione di siero. Questo ha lo scopo di eliminare la variabilità della transferrina dovuta al suo diverso carico di ioni ferrici. Questa reazione, necessaria per qualsiasi metodo di analisi sia di screening che di conferma, è una tappa cruciale per la determinazione della CDT in quanto la saturazione deve essere completa ed il legame ferro transferrina deve essere il più stabile possibile per evitare eventuali riarrangiamenti e quindi coeluzioni di frazione CDT e non CDT, con sovrastima della prima, specialmente se la separazione si basa sul pI delle molecole.

METODI DI SCREENING

Sono considerati metodi di screening quelli in cui la separazione delle isoforme CDT da quelle non CDT avviene attraverso una colonnina a scambio anionico sulla base del pI delle diverse frazioni, naturalmente dopo saturazione con ferro. La frazione CDT separata viene poi fatta reagire con un anticorpo specifico anti-transferrina e la determinazione è effettuata con tecniche di turbidimetria, nefelometria, con tracciante radioattivo o con metodi immunoenzimatici.

E' da considerarsi metodo di screening anche un recentissimo test diretto in fase omogenea in cui avviene una reazione specifica con anticorpi anti-CDT che riconoscono le glicofornie della transferrina prive di uno o due glicani, messo in commercio nell'estate 2005. Tale metodo misura la CDT sia in mg/dl che in percentuale rispetto alla transferrina totale. E' un metodo totalmente automatizzato, con un turn around time di circa 20 minuti che non sembra risentire delle varianti genetiche della transferrina agendo specificatamente nei siti di legame degli N-glicani sulla catena proteica. Riguardo a tale metodo è stata recentemente presentata una relazione della Scuola di Medicina Legale dell'Università di Padova da cui emerge che pur essendoci una buona correlazione quantitativa con il dosaggio in elettroforesi capillare il kit ha individuato 10% di falsi positivi e 3% di falsi negativi rispetto alla tecnica di conferma.

Nel 1999 autori giapponesi¹² pubblicarono un metodo quantitativo, che almeno in Italia non è mai stato utilizzato, in cromatografia per affinità alla lectina usando una colonnina di Sepharose legata a lectine provenienti da *Allomyrina dichotoma* (Allo A) o *Trichosanthes Japonica* (TJA). Con questo metodo dal siero si possono separare la CDT-Allo A (corrispondente alla disialo-transferrina) e la CDT-TJA (corrispondente alla asialo-

transferrina).

Generalmente la CDT viene espressa come percentuale della transferrina totale, evitando così tutte le problematiche legate a concentrazioni non fisiologiche di transferrina (es. anemia).

METODI DI CONFERMA

Così come avviene per le sostanze d'abuso, un dosaggio positivo (in realtà solo "presumibilmente positivo") con metodi di screening va rianalizzato con metodo di conferma cioè con un metodo che utilizzi un principio chimico-fisico differente per la separazione e quantificazione degli analiti di interesse¹³.

TECNICHE ELETTROFORETICHE

L'isoelettrofocusing per la sua alta selettività è stato sempre usato come metodo di riferimento qualitativo piuttosto che quantitativo per le isoforme della transferrina. Queste sono separate in un gel contenente un gradiente di pH adatto ai pI delle forme da separare. Dopo un primo passaggio di saturazione con ioni ferrici, viene effettuata l'elettroforesi e in seguito le bande sono visualizzate con immunofissazione e colorazione dei complessi CDT-antitransferrina. Infine le diverse bande possono essere quantificate con un densitometro. Va però tenuto conto che per evidenziare bene le isoforme CDT occorre una quantità di siero tale da sovraccaricare il gel di tetrasialotransferrina e rendere pertanto le misure quantitative piuttosto grossolane. Tutte le metodiche in isoelettrofocusing pubblicate sono abbastanza incomplete per quel che riguarda gli aspetti quantitativi dell'analisi.

L'alta selettività di questa tecnica elettroforetica permette invece di evidenziare le varianti genetiche della transferrina dopo trattamento in vitro con neuroamidasi, che rimuove tutti i residui di acido sialico e porta alla formazione di solo asialo-transferrina. Infatti, se si assume che tutta la transferrina sia saturata completamente dal ferro e che tutti i residui di acido sialico siano stati rimossi, si dovrebbe vedere solo una banda di asialo-Fe₂-transferrina nel caso di un soggetto omozigote per quel tipo di transferrina (ad esempio Transferrina C1) e due bande nel caso di un soggetto eterozigote (ad esempio transferrina CB).

Altra tecnica elettroforetica di conferma è l'elettroforesi capillare, da alcuni chiamata anche capillare zonale^{14,15} la cui possibilità di automazione la rende di più facile approccio, almeno teoricamente, nei laboratori clinici.

Il più grosso problema di questa tecnica è trovare un rivestimento della superficie del capillare per prevenire l'adsorbimento delle proteine e un tampone altamente trasparente nell'ultravioletto (200-210 nm). Ad oggi è

possibile solo un compromesso e comunque per analisi quantitative la sensibilità rispetto all'isoelettrofocusing è minore di anche 2,5 volte¹⁶.

TECNICHE CROMATOGRAFICHE

Per la conferma della CDT "presumibilmente positiva" viene utilizzata la tecnica di cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC).

Esiste un metodo candidato ad essere di riferimento di cui si parlerà nella discussione, ma che ad oggi non è stato ancora riconosciuto ufficialmente.

Il campione, dopo saturazione del ferro, viene iniettato in una colonna scambio anionica a temperatura controllata (25°C) eluito attraverso una fase mobile a gradiente lineare ottenuto con quattro soluzioni tampone Bis-Tris a pH differenti. La rilevazione avviene attraverso un rivelatore UV Vis a 460 nm. Vengono eluite le diverse frazioni e la quantificazione avviene attraverso il rapporto tra l'area della frazione di interesse e l'area totale che corrisponde alla transferrina totale.

I tempi di analisi, nel metodo originale si aggirano sui 20 minuti, ma kit oggi in commercio, che hanno in parte migliorato il metodo originale permettono di analizzare un campione ogni 8-10 minuti con coefficienti di variazione esternamente contenuti (<5%) delle frazioni di interesse.

La rilevazione avviene a 460 nm, poiché questa è la lunghezza d'onda di massimo assorbimento del ferro. Questo implica che situazioni patologiche che influiscono sulla lettura a 200-210 nm dell'elettroforesi capillare come gammopatie monoclonali non danno interferenze. Le separazioni delle frazioni normali o varianti, presentano una risoluzione che permette di individuare senza alcun dubbio la presenza di assetti "diversi", anche se in alcuni casi una accurata quantificazione non è possibile.

In casi di frazioni "sospette" è bene completare l'analisi utilizzando la tecnica dell'immunosottrazione che differenzia le frazioni transferriniche.

DISCUSSIONE DELLO STATO DELL'ARTE

Lo sviluppo di numerosi metodi per il dosaggio della CDT, che la rende di più facile utilizzo e diffusione, sta favorendo l'accettazione anche da parte della medicina legale, che per sua tradizione e compito si fonda su principi rigorosi, quale marcatore di cattivo uso alcolico. Ad oggi forse più di 1000 sono le pubblicazioni su questo argomento apparse su riviste di indubbio valore scientifico.

Da queste pubblicazioni emerge che con il tempo la definizione di CDT della Stibler e collaboratori ha nel tempo imboccato strade diverse e non sempre chiare. Non essendoci oggi un unanime consenso sulle isoforme CDT, si osserva una sperequazione non sempre su

basi scientifiche di che cosa effettivamente ritenere marcatore alcolico.

Si vede allora che, nei diversi studi anche clinici, si utilizzano come CDT e quindi "prova" di abuso alcolico isoforme diverse, soglie di positività diverse, che esacerbano ulteriormente il confronto dei valori di CDT, intesi come sensibilità e specificità diagnostica e valori predittivi. Inoltre le sperimentazioni cliniche hanno disegni sperimentali differenti come differenti sono le popolazioni studiate e differenti i metodi analitici utilizzati, con tutte le problematiche analitiche ricordate, inoltre l'espressione dei risultati anche in termini di unità di misura è diversa.

Ad oggi, almeno in forma ufficiale, non è ancora disponibile uno standard internazionale e materiale per il controllo qualità analitico, sebbene sia possibile produrre CDT enzimaticamente^{17,18} come dimostrano lavori vecchi di una decina d'anni.

Per superare il problema in primo luogo è necessaria una definizione chiara e condivisa del marcatore alcolico, valutare se è ancora valida nella forma originale o vada invece rivisitata. Qualora si evidenzino quest'ultima necessità è indispensabile che la revisione abbia un consenso generale.

Già nel maggio del 2000 si tenne un Convegno a Berlino sulla standardizzazione del CDT il cui scopo era quello di sviluppare un metodo altamente sensibile e specifico in HPLC che fosse metodo di riferimento per l'analisi della CDT e come tale da utilizzare per la sua calibrazione nelle applicazioni su analizzatori di test clinici e di scoraggiare l'utilizzo dei metodi che dosavano anche la trisialo transferrina.

I risultati a distanza di un lustro sono parziali: il metodo esiste²⁰, è stato messo a punto dalla scuola svedese del Karolinska Institut con a capo il prof A Helander, peraltro insieme al dott Jeppsson entrambi ricercatori e membri del Gruppo di Lavoro 8.3.36 "Standardizzazione della CDT" della International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Questi hanno dimostrato che tale tecnica analitica permette la separazione e il dosaggio delle diverse isoforme anche quando sono nella loro forma variante sia rispetto agli aminoacidi della catena proteica che alla ramificazione dei residui glicanici. Anche se non ufficializzato, oggi questo è il metodo di riferimento o come è scritto "candidato ad essere di riferimento" e non esiste kit commerciale che non sia stato valutato e studiato anche nei confronti di questo metodo.

CONCLUSIONI

La transferrina carboidrato carente è un buon marcatore di abuso alcolico, tuttavia va considerato che la grande eterogeneità della proteina, unita alla piccola quantità presente rende critica la determinazione. Dati presumibilmente positivi ai metodi immunometrici vanno

sempre e comunque rideterminati con tecniche separative di conferma. E' auspicabile, di concerto con le aziende produttrici, la realizzazione di un metodo standardizzato a cui i diversi sistemi analitici possano riferirsi, anche per la delicatezza dell'uso che se ne deve fare.

Importante è anche il ruolo delle Commissioni Mediche locali, che dovrebbero collaborare, così come già si sta osservando in alcune province italiane, con i laboratori per la condivisione e l'accettazione di risultati derivanti solo da metodi accurati e sicuri.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Wurst F, Alling C, Aradottir S, Litten R et al. Emergine Biomarkers: New Directions and Clinical Applications Alcohol Clin. Exp. Res. 2005; 29: 465-473
- 2 Atti convegno "Alcool e Guida" Verona 25 ottobre 2005
- 3 Schachter H Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides Cell. Biol. 1986; 64: 163-181
- 4 Flahaut C, Michalski JC, Danel T, Humbert MH, Klein A The effects of ethanol on the glycosylation of human transferrin Glycobiology 2003; 13:191-198
- 5 Peter J, Unverzagt C, Engel WD, Renauer D, Seidel C, Hösel V Identification of carbohydrate deficient transferrin forms by MALDI-TOF mass spectrometry and lectin ELISA Biochim Biophys Acta 1998; 1380:93-101
- 6 Tagliaro F, Bortolotti F, Dorizzi R, Marigo M Caveat in Carbohydrate-deficient transferrin determination" Clin Chem 2002;48:208-209
- 7 Legros FJ, Nuyen V, Baudoux M, Zouaoui Boudjeltia K, Ruelle JL et al Use of capillary zone electrophoresis for differentiating excessive from moderate alcohol consumption Clin Chem 2003; 49: 440-9
- 8 Arnt T Asialotransferrin – An alternative to carbohydrate deficient transferrin? Clin Chem 2003; 49: 1022-1023
- 9 Daepfen JB, Anex F, Favrat B, Bissery A, Leutwyler J et al. Carbohydrate deficient transferrin measured by capillary Zone Electrophoresis and By Turbidimetric Immunoassay for Identification of young heavy drinkers Clin Chem 2005; 51: 1046-1048
- 10 Henry H, Froehlich F, Perret R, Tissot JD, Eilers-Messerli B, et al. Microheterogeneity of serum glycoproteins in patients with chronic alcohol abuse compared with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I Clin Chem 1999; 45: 1408-13
- 11 Berthol E, Mari F La certificazione in ambito tossicologico forense in :Professione Cultura e Pratica a del medico d'oggi. 2003; 23-27
- 12 Yochisawa K, Umetsu K, Shinzawa H, Yuasa I, Maruyama K et al. Determination of carbohydrate-deficient transferrin by lectin affinity chromatography for detecting chronic alcohol abuse FEBS Lett 1999; 458:485-90
- 13 Arnt T Valid carbohydrate-deficient transferrin Testing Chim Clin Acta 2006; 364: 367-368
- 14 Crivellente F, Fracasso G, Valentini R, Manetto G, Riviera AP et al. Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis J Chromatogr B 2000; 739: 81-93
- 15 Tagliaro F, Crivellente F, Manetto G, Puppi I, Deyl Z et al. Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis Electrophoresis 1998; 19: 3033-9
- 16 Arndt T Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, ana-

- 17 lisis and interpretation Clin Chem 2001; 47: 13-27
Renner F, Kanitz RD Quantification of carbohydrate-deficient transferrin quantified by ion-exchange chromatography with an enzymatically prepared calibrator Clin Chem 1997; 43: 485-90
- 18 Simonsson P, Lindberg S, Alling C Carbohydrate-deficient transferring measured by high-performance liquid chromatography and CDtect immunoassay Alcohol Alcohol 1996; 31: 397-402
- 19 Helander A, Husa A, Jeppsson JO Improved HPLC method for Carbohydrate-deficient transferrin in serum Clin Chem 2003; 49:1881-1890