

Transferrina carboidrato carente: dalla fase preanalitica a quella postanalitica

Vincenza Bianchi^{1,2}, Annalisa Roveta¹

¹Laboratorio Analisi Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C Arrigo, Alessandria

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

ABSTRACT

Carbohydrate deficient transferrin: from pre-analytical to post-analytical phase. Serum carbohydrate deficient transferrin (CDT) is a marker of chronic alcohol abuse, whose measurement is requested with increasing frequency for legal purposes, like the issue of driving or shooting licences. The structural complexity of CDT, the low concentration of its relevant fractions and the marked differences in the analytical methodologies and experimental design of the huge number of published clinical studies, raise some problems concerning analytical and interpretative aspects. This review aims at discussing and evaluating the overall process of CDT measurement, from sample drawing to reporting, in view of adopting a common behaviour, to be shared at least among the different laboratories.

INTRODUZIONE

E' ormai consolidato dalla letteratura scientifica l'utilizzo della transferrina quale marcatore di abuso alcolico, tanto da essere un elemento importante del giudizio di idoneità alla guida, scopo per il quale per la maggior parte dei casi viene richiesta l'analisi.

La determinazione della CDT pone alcuni problemi analitici legati alla microeterogeneità della transferrina: ci sono infatti tre livelli di eterogeneità: la catena proteica, cioè la sequenza primaria, il contenuto di ferro, le catene glicaniche.

Viene considerata CDT la somma delle frazioni asialo più monosialo più disialo transferrina. La trisialotransferrina anche se è carente di zuccheri (acido sialico) rispetto alla forma più comune (tetrasialotransferrina), non rappresenta una frazione importante per valutare l'abuso alcolico.

Un altro problema legato alla determinazione della CDT è rappresentato dalla bassa concentrazione delle isoforme da valutare.

Scopo di questa rassegna è discutere il processo globale d'analisi della CDT dal prelievo alla refertazione tenuto conto che tale determinazione assume valenza medico legale per il rilascio di permessi amministrativi quali la patente di guida e come tale il dato deve essere di indubbia validità.

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE: LA FASE PREANALITICA

La Transferrina carboidrato carente (CDT) viene misurata nel siero del paziente, a digiuno. Sono state identificate diverse interferenze nel dosaggio della CDT legate alla tecnica utilizzata, ad esempio la presenza di EDTA, citrato ed eparina competono con la transferrina per la saturazione con il ferro; le microcolonne a scambio anionico non riescono a separare selettivamente la frazione CDT da quella non CDT; l'emolisi dà risultati falsamente positivi; le frazioni monoclonali proteiche possono assorbire alla stessa lunghezza d'onda delle frazioni di transferrina desialata.

La conservazione per tre giorni a temperatura ambiente aumenta la frazione CDT anche del 25% e con sieri lipemici la determinazione in turbidimetria è fortemente critica.

Al contrario la CDT non è influenzata dal ciclo circadiano, da provette contenenti caolino come acceleratore di coagulazione o separatori di gel acrilammide, da una conservazione fino a 5 gg a 15°C, molte settimane a 4°C o mesi a -20°C¹.

Neppure il congelamento e lo scongelamento ripetuti influenzano la determinazione della CDT, né la dieta o i più comuni farmaci, disulfiram compreso.

Se la determinazione ha scopi medico legali si consiglia sempre, prima di effettuare il prelievo, di identificare chiaramente il Cittadino attraverso un documento di identità, la cui copia è bene conservare per un tempo prestabilito.

FASE ANALITICA

L'analisi della CDT ha bisogno di metodi selettivi, sensibili e specifici per almeno quattro ragioni:

- la microeterogeneità della transferrina è rilevante
- la struttura delle isoforme CDT è molto simile a quella delle isoforme non CDT
- le isoforme CDT sono a bassa concentrazione (> 2.0 -2.3% in forti bevitori), e hanno caratteristiche chimico fisiche simili alle isoforme non CDT che sono invece ad alte concentrazioni
- i risultati hanno una forte implicazione medico legale, la cui determinazione può portare alla restrizione della libertà personale (art.13 Costituzione della Repubblica Italiana).

E' 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 risultati "presumibilmente" positivi².

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. Essa 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 è 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 punto Isoelettrico (pI) delle diverse frazioni, naturalmente dopo saturazione con ferro. La frazione CDT separata viene poi fatta reagire con un anticorpo specifico antitransferrina 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 tourn 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 presentata³ 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.

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 con metodi di screening va confermato con un metodo che utilizzi un principio chimico-fisico differente per la separazione e quantificazione degli analiti di interesse⁴.

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 isoforme 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. L'alta selettività di questa tecnica elettroforetica permette invece di evidenziare le varianti genetiche della transferrina.

Altra tecnica elettroforetica di conferma è l'elettroforesi capillare, da alcuni chiamata anche capillare zonale,¹ la cui possibilità di automazione la rende di più facile approccio, almeno teoricamente, nei laboratori clinici.

Il più grosso problema legato a 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 volte⁵.

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 riferimento⁶ 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 a scambio anionico 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 variazioni 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.

STANDARD E METODO DI RIFERIMENTO

Ad oggi, almeno in forma ufficiale, non è ancora disponibile uno standard internazionale e del materiale per il controllo qualità analitico, sebbene sia possibile produrre CDT enzimaticamente^{7,8} 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 del 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 esiste⁶, 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.

FASE POSTANALITICA

Al fine di rendere più rigorosa la refertazione del CDT, che nella maggior parte dei casi ha implicazione medico legale, e nel considerare che il referto è l'atto scritto col quale il professionista dichiara conformi a verità i risultati ottenuti dagli esami diagnostici, unitamente all'interpretazione dei risultati stessi, in relazione al quadro e all'anamnesi del paziente, nel referto occorre indicare chiaramente tutte le informazioni necessarie a chi il referto lo deve utilizzare.

Qui di seguito vengono suggerite alcune raccomandazioni di minima.

Il referto deve chiaramente indicare se il metodo utilizzato è un metodo immunometrico di screening o un metodo di conferma.

Il referto deve chiaramente indicare che cosa è stato misurato, il risultato numerico e l'unità di misura.

Non tutti i laboratori si comportano nello stesso modo e ciò dipende dalla tecnica utilizzata: alcuni preferiscono riferirsi alla definizione originale della Stibler ed esprimere il risultato come percentuale rispetto alla transferrina totale, altri preferiscono riferire solo il rapporto percentuale della disialotransferrina rispetto alla transferrina totale, altri ancora utilizzano il cosiddetto CDT Index cioè il rapporto percentuale tra disialotransferrina e tetrasialotransferrina.

Il referto deve riportare il valore decisionale che non può prescindere dal metodo utilizzato e dall'imprecisione del Laboratorio.

In caso di CDT varianti è necessaria la loro identificazione, anche con riserva (es "trattasi verosimilmente di variante...") e in condizioni di tracciati difficilmente interpretabili è d'uopo indicare la difficoltà incontrata nel dosaggio.

Gli autori ritengono che, nell'ambito del consenso informato al cittadino che si sottopone all'analisi, è necessario dare spiegazioni utili sia nella fase precedente il prelievo che nella fase di consegna del referto e assicurarsi che tali indicazioni siano recepite e pienamente comprese. Durante il colloquio l'interessato dovrebbe essere messo in condizioni di comprendere il significato del test, la metodologia analitica, il risultato probabile e l'eventuale giudizio che ne potrebbe essere tratto. Va comunque sempre ricordato che il CDT pur essendo il marcatore più specifico di uso alcolico, da solo non è sufficiente a formulare la diagnosi, che resta una prerogativa della Commissione Medica Locale.

Poiché i valori decisionali dipendono dai metodi, ogni laboratorio dovrebbe costruire i suoi valori decisionali su una popolazione con normali abitudini all'alcol, non su una popolazione astemia, poiché è il moderato bevitore poi ad essere valutato. Nel definire tali valori bisogna tenere conto anche dell'imprecisione del laboratorio.

I valori della CDT nel siero di popolazioni sane è pressoché costante. La nostra esperienza ha portato a definire come livello decisionale di positività un valore >1.8%, con metodica in HPLC espresso come somma percentuale delle tre frazioni carboidrato carenti, rispetto alla transferrina totale (calcolata dall'area totale del cromatogramma). La nostra esperienza ha evidenziato che nei soggetti oggi non più bevitori, con cirrosi alcool correlate diagnosticata dalla SOC Gastroenterologia, non si sono evidenziati significativi aumenti della CDT.

Per quel che riguarda le variazioni fisiologiche non esiste alcuna correlazione tra concentrazione della CDT ed età nell'uomo⁹, in generale si osserva una diminuzione della CDT nelle donne dopo i 45 anni, le femmine esprimono generalmente valori assoluti della CDT più alti dei maschi. Questa differenza si spiega in parte con il fatto che le femmine soffrono più frequentemente di carenza di ferro che costituisce uno stimolo alla sintesi di transferrina.

Se la CDT viene espressa come percentuale della transferrina totale non si osservano differenze tra maschi e femmine.

Per quel che riguarda l'efficienza diagnostica della CDT, numerosi studi clinici sono stati pubblicati nei riguardi della specificità e sensibilità del CDT come marcatore di abuso alcolico: per calcolare i parametri dell'efficienza diagnostica, il prerequisito richiesto è che i dati indichino chiaramente il consumo di alcol e siano attendibili; al fine di poter classificare i falsi positivi e i falsi negativi c'è bisogno di un "effettivo gold standard" che permetta di misurare il consumo individuale di alcol senza alcun errore. I falsi positivi o i falsi negativi sono favoriti da presenza di transferrine varianti, comunque abbastanza rare (0.2-0.7% nella popolazione). Falsi positivi possono essere individuati in presenza di trisialotransferrina alta. Naturalmente queste situazioni si verificano in prevalenza con l'utilizzo di metodi immunometrici. Nell'interpretare i parametri di efficienza diagnostica va ricordato che è abbastanza comune sottostimare il consumo di alcol per cui si identifica come falso un vero positivo e come vero un falso negativo, inoltre è dimostrato⁸ che sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo hanno variazioni anche del 12% quando si utilizzano metodi diversi.

Per quel che riguarda la sensibilità diagnostica della CDT, come indicatore di consumo di alcol, è legata ad alcuni fattori come l'età, la massa corporea, l'ipertensione e il tabagismo, il sesso e le abitudini verso l'alcol¹⁰.

In assenza di altre patologie, il modo con cui si esprime il risultato non modifica i livelli di sensibilità. In generale quando si confrontano popolazioni costituite una da alcolisti all'inizio del trattamento e l'altra da bevitori occasionali, i cosiddetti bevitori sociali, la sensibilità varia dal 70 al 90%. Quando invece si paragonano bevitori occasionali con pazienti che si rivolgono al medico di medicina generale o a specialisti la sensibilità varia da 40 al 60%¹¹.

I protocolli sperimentali dovrebbero tenere conto dell'emivita della CDT (circa due settimane) della quantità di alcol assunto e per quale arco temporale poiché è dimostrato che se l'assunzione è quantitativamente bassa ma lunga nel tempo (almeno 3 settimane) la CDT viene influenzata, mentre se l'assunzione è alta ma per poco tempo

la CDT non varia significativamente.

Per quel che riguarda la specificità diagnostica sono state evidenziate alcune cause di falsi positivi (sindrome CDG, varianti genetiche, cirrosi biliare primaria, epatiti croniche, carcinoma epatico, carenza marziale e anemia, trapianto di fegato e pancreas, ipertensione, fibrosi cistica) cause alcune delle quali abbastanza contenute come prevalenza e per alcune delle quali il problema ormai appare risolto con l'utilizzo di analisi di conferma, specialmente cromatografiche, che permettono di identificare solo le isoforme legate all'abuso alcolico.

La CDT non viene influenzata dall'utilizzo di farmaci¹⁰, a differenza della GGT, anche perché sono diverse i meccanismi biochimici che li influenzano.

La specificità diagnostica è stata ottenuta attraverso numerosi studi pubblicati. Da questi appare che è 83.6 e 94.2% nell'uomo e 96.9 e 91.9% nella donna rispettivamente con e senza danno epatico. Di contro si osserva che per la GGT le specificità diagnostiche sono nell'uomo 36.1% e 24%, nella donna 36.6% e 50% rispettivamente con e senza danno epatico.

Da qui è palese che la CDT appare essere il marcatore più specifico dell'abuso alcolico, anche se confrontata con la GGT da sempre considerata un buon marker.

CONCLUSIONI

La transferrina carboidrato carente è un buon marcatore di abuso alcolico, tuttavia occorre considerare che alla luce della valenza medico legale del referto il campione deve essere prelevato e conservato in modo idoneo, inoltre i risultati "presumibilmente positivi" con metodi di screening devono avere sempre confermati.

I cromatogrammi o gli elettroferogrammi vanno analizzati da professionisti esperti pertanto va privilegiata la competenza piuttosto che la produttività o i TAT contenuti, come invece deve avvenire per i comuni esami ematochimici specie con carattere di urgenza.

Una attenzione particolare deve essere fatta nei riguardi della valutazione della soglia di positività (valore decisionale) che deve essere propria di ogni laboratorio.

Si raccomanda la compilazione di un referto chiaro per chi deve interpretare il risultato, così come si raccomanda l'utilizzo del consenso informato. Questi sono i valori aggiunti che il professionista di laboratorio può mettere a disposizione dei colleghi delle diverse Commissioni medico locali.

Una raccomandazione alle ditte produttrici di materiale diagnostico: dovrebbe essere quello di mettere in atto tutte quelle strategie per arrivare alla commercializzazione di kit riferibili a tecniche e standard condivisi e come tali accettati dalla comunità scientifica internazionale, al fine di dare risultati il più possibile univoci.

BIBLIOGRAFIA

1. Appenzeller BMR, Wenning R «Altered distribution of transferrin isoforms according serum storage condition» Clin.Chem. (2005), 51:2159-2162
2. Daepfen JB, Anex F, Favrat B, Bissery A, Leutwyler J, Gammeter R, Mangin P, Augburger M. "Carbohydrate deficient transferrin measured by capillary Zone Electrophoresis and By Turbidimetric Immunoassay for Identification of young heavy drinkers" Clin.Chem. (2005), 51:1046-1048
3. Atti del Convegno Sibioc "L'abuso alcolico cronico: aspetti clinici, giuridici ed aggiornamenti analitici" Torino 28 aprile 2006
4. Berthol E, Mari F "La certificazione in ambito tossicologico forense" in Professione, Cultura e Pratica a del medico d'oggi. (2003) II, X, 23-27
5. Arnt T "Valid carbohydrate-deficient transferrin Testing" Chim Clin Acta (2006) 364 (1-2):367-368
6. Helander A, Husa A, Jeppsson JO "Improved HPLC method for Carbohydrate-deficient transferrin in serum" Clin.Chem. (2003), 49:11,1881-1890
7. 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

8. Simonsson P, Lindberg S, Alling C "Carbohydrate-deficient transferrin measured by high-performance liquid chromatography and CDTect immunoassay" *Alcohol Alcohol* 1996;31:397-402
9. 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 :3033-9
10. 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
11. Robitaille R "La Transferrine déficiente en hydrates de carbon (CDT): une brève revue" *Ann. Biol Clin Què* 2003; 40(3):3-10