

Valutazione della specificità di un metodo HPLC nella determinazione della transferrina carboidrato-carente

Vincenza Bianchi, Annalisa Roveta, Carlo Arfini

Laboratorio di Tossicologia, Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

ABSTRACT

Evaluation of the specificity of a HPLC method for determination of the carbohydrate-deficient transferrin.

Carbohydrate-deficient transferrin (CDT), and more specifically its disialo isoform, is considered the most reliable marker for detection of chronic alcohol abuse and it is widely used both in clinical monitoring of the alcoholic patient treatment and in forensic toxicology, mainly when legal aspects of driving license reapplication are considered. In clinical laboratories, CDT is quantified by different techniques, some of which are known to be subjected to inaccuracy due to either inefficient isoform separation or high concentrations of interfering serum proteins. The aim of this work is to evaluate a commercial HPLC method by verifying the efficiency in the disialo isoform separation even in presence of high amount of trisialotransferrin and to investigate HPLC specificity in serum samples containing potentially interfering proteins by comparison to the transferrin immunosubtraction technique.

INTRODUZIONE

Nel 1976, Stibler et al. (1,2) evidenziarono la presenza di isoforme della transferrina con $pI > 5,7$, più elevato rispetto all'isoforma maggiore tetrasialotransferrina (TetraST), nel liquido cefalorachidiano e nel siero di soggetti alcolisti, isoforme che scomparivano dopo un adeguato periodo di astinenza. Queste isoforme si caratterizzano per un contenuto ridotto di residui sialici e costituiscono la transferrina carboidrato-carente (CDT) e fra queste è la disialotransferrina (DiST) la principale molecola correlata all'abuso alcolico cronico. Oggi la CDT è ormai considerata da tutta la comunità scientifica il marcatore più efficace di abuso alcolico cronico (3,4). Molte sono le tecniche utilizzate per il suo dosaggio, alcune allestite nei laboratori che eseguono l'esame, altre disponibili commercialmente, prevalentemente immunometriche, elettroforetiche e cromatografiche (5). Considerato l'impiego in ambito forense della CDT, è importante utilizzare metodi sensibili ma altrettanto specifici, in grado di evidenziare esclusivamente la molecola di interesse. Tra questi si vanno affermando metodi in elettroforesi capillare (CZE) e in HPLC. In letteratura è stato riportato che la tecnica in CZE potrebbe soffrire di alcune interferenze sia nella separazione delle isoforme disialo e trisialotransferrina (TriST), sia per la presenza di elevate concentrazioni di alcune proteine come la proteina C-reattiva e le immunoglobuline, in quanto la lettura avviene a 200-210 nm, lunghezza d'onda a cui assorbono i legami peptidici (6).

Recentemente è stato commercializzato un kit in HPLC, derivato dal metodo proposto da Jeppson e modificato da Helander (7,8). Scopo di questo lavoro è verificare l'efficacia del metodo nel separare correttamente la frazione DiST dalla TriST e confermare, applicando la tecnica di immunosottrazione, la specificità del kit anche

in presenza di concentrazioni elevate di alcune proteine, note in letteratura per essere potenzialmente interferenti quando si utilizzano altre tecniche analitiche (9).

MATERIALI E METODI

Reagenti

La determinazione quantitativa della CDT è stata effettuata con il kit %CDT by HPLC (BioRad). Per la tecnica di immunosottrazione è stato utilizzato un antisiero policlonale di coniglio anti-transferrina umana prodotto da Dako (codice prodotto Q0327).

Strumentazione

È stato utilizzato un sistema HPLC Agilent 1100, fornito di pompa quaternaria, degassatore, autocampionatore e portacolonna termostata, rivelatore UV - Diode Array e software ChemStation per la gestione del sistema HPLC, l'integrazione, il calcolo e la quantificazione della percentuale di CDT (%CDT). La separazione delle glicofornie della transferrina è stata ottenuta utilizzando una colonna a scambio anionico 30 x 4 mm ID (BioRad), termostata a 35 °C, con eluizione a gradiente secondo il profilo indicato in Tabella 1. Ogni seduta analitica prevedeva l'iniezione di un campione come bianco e di due sieri di controllo (preparati secondo la stessa procedura dei campioni), rispettivamente con concentrazione di %CDT normale ed alta, materiale disponibile nel kit. La %CDT è stata calcolata come rapporto percentuale fra le isoforme desialate DiST e asialotransferrina (aST) quando presente ed il totale delle isoforme identificate dall'analisi HPLC (aST + DiST + TriST + TetraST + PentaST).

Tabella 1

Profilo del gradiente di eluizione utilizzato nelle separazioni in HPLC

Step	tempo (min)	% fase mobile 1	% fase mobile 2	% fase mobile 3
1	0,00	90	10	0
2	2,10	70	30	0
3	3,80	45	55	0
4	4,80	35	65	0
5	5,20	30	70	0
6	5,50	0	0	100
7	5,80	0	0	100
8	6,20	100	0	0
9	10,00	100	0	0

Campioni

Sono stati utilizzati campioni residui, resi opportunamente anonimi, di siero di pazienti afferenti all'ambulatorio prelievi dell'Ospedale di Alessandria. Il prelievo è stato effettuato con sistema Vacutainer (Becton Dickinson) in provette senza alcun additivo; il campione è stato centrifugato ed il siero conservato a 4 °C, se analizzato il giorno successivo, altrimenti a -20 °C (10). Sono stati analizzati 40 campioni caratterizzati rispettivamente da: concentrazioni elevate di proteina C-reattiva (3 campioni), componenti monoclonali di tipo IgA, IgG e IgM montanti catene leggere sia λ che κ (26 campioni), varianti genetiche della transferrina (5 campioni) e concentrazioni elevate di TriST (6 campioni). Allo scopo di valutare possibili interferenze imputabili all'anticoagulante o alla fase preparativa di immunosottrazione sono stati inoltre analizzati l'antisiero anti-transferrina ed un campione di plasma ottenuto da EDTA con una percentuale di CDT pari a 1,0%.

Analisi in HPLC

I campioni sono stati analizzati secondo il protocollo sotto indicato sia non modificati, sia dopo trattamento con anticorpo anti-transferrina umana.

Per ogni campione al momento dell'analisi è stata preparata una miscela di reazione composta da quantità uguali (10 μ L) di reagente 1 (soluzione di FeCl₃), reagente 2 (soluzione di NaHCO₃), reagente 3 (soluzione di destransolfato) e reagente 4 (soluzione di MgCl₂), più 500 μ L di reagente 5 (tampone Bis-Tris) da prepararsi di volta in volta nel quantitativo necessario. A 100 μ L di siero sono stati aggiunti 500 μ L di miscela di reazione e, dopo una vigorosa agitazione, i campioni così trattati sono stati posti in incubazione per 30 min a temperatura ambiente. In questo modo la transferrina viene completamente saturata di ferro, mentre le lipoproteine sono precipitate dal destransolfato. I campioni così preparati sono stati infine centrifugati a 10.000 x g per 10 min ed il surnatante raccolto nelle cuvette dedicate per l'auto-campionatore del sistema analitico in HPLC.

Un volume di 100 μ L di campione è stato iniettato nel sistema HPLC, ad un flusso di 1,3 mL/min, con rivelazione della transferrina mediante lettura del segnale di

assorbimento del Fe coordinato a 460 nm.

Preparazione del campione per l'immunosottrazione

A 100 μ L di siero si sono aggiunti 200 μ L di anticorpo anti-transferrina umana. Precedenti prove sperimentali da noi condotte hanno evidenziato che questo è il rapporto corretto per precipitare concentrazioni di transferrina fino a 5 g/L. I campioni sono stati in seguito incubati per 30 min a temperatura ambiente e centrifugati per 20 min a 8000 x g a 4 °C. Il surnatante è stato quindi utilizzato per l'analisi in HPLC come sopra descritto.

RISULTATI

Per verificare la presenza all'analisi cromatografica di eventuali contributi dovuti al preparato dell'anticorpo è stata preventivamente effettuata l'analisi in HPLC dell'anticorpo puro: tale analisi non evidenziava la presenza di picchi in corrispondenza del tempo di ritenzione della DiST e della TriST, mentre è evidenziabile solo un picco di bassa intensità al tempo di ritenzione della frazione penta (PentaST) e/o esiasialotransferrina, associabile a transferrina di coniglio verosimilmente presente come residuo di purificazione. Poiché tale anticorpo lega selettivamente solo la transferrina, il cromatogramma ottenuto è stato considerato come il tracciato teoricamente atteso nel caso in cui tutta la transferrina di un qualsiasi campione sia effettivamente immunosottratta e non siano presenti altre molecole interferenti. Si è poi valutato l'effetto dell'EDTA nell'analisi effettuata su plasma, dove era visibile un picco a tempi di ritenzione brevi, probabilmente attribuibile al complesso Fe-EDTA, picco che non si annullava quando il plasma era trattato con anticorpo antitransferrina. Il prelievo con EDTA è quindi da evitare perché produce nell'analisi un'interferenza rappresentata dal complesso Fe-EDTA che, sebbene sia localizzato a tempi di ritenzioni lontani dalla DiST e dalle altre glicoforme principali, potrebbe alterare i rapporti di saturazione delle diverse isoforme della transferrina, punto critico per il dosaggio quantitativo.

Nella Figura 1 sono mostrati i risultati ottenuti per

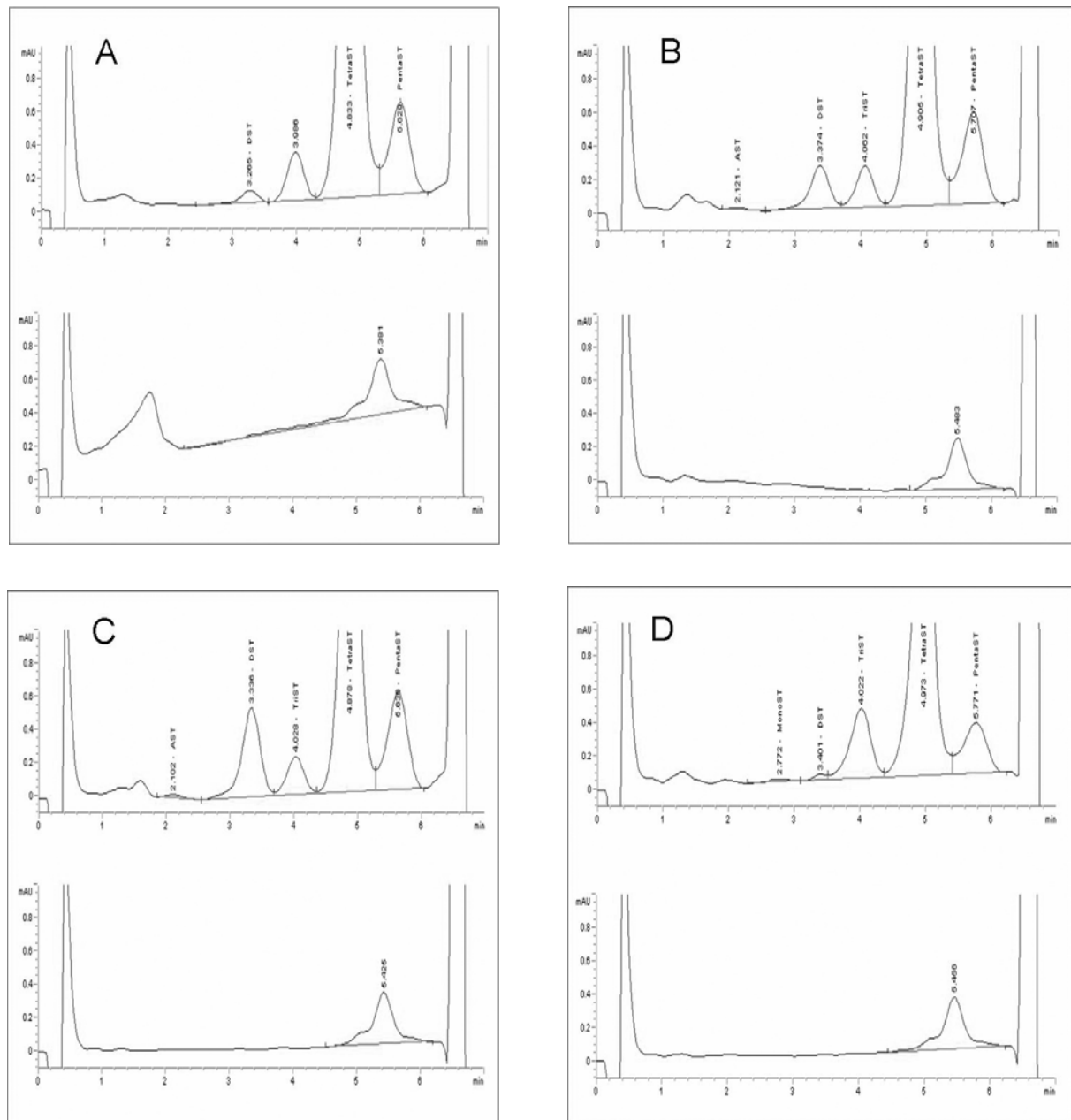


Figura 1

Tracciati cromatografici di campioni con diversi livelli di disialo e trisialo transferrina.

In ogni pannello sono rappresentati i cromatogrammi prima (grafico superiore) e dopo (grafico inferiore) immunosottrazione della transferrina. A) CDT = 1,5%; B) CDT = 5,6%; C) CDT = 13,6%; D) campione con elevata trisialotransferrina (14,5%).

campioni contenenti diversi livelli di DiST e TriST. Sia nei pazienti con concentrazioni fisiologiche di %CDT (Figura 1A), sia in quelli con concentrazioni elevate o fortemente elevate (Figura 1B e 1C), la separazione cromatografica delle isoforme della transferrina, in particolare della DiST, e la relativa quantificazione, sono effettuate in modo ottimale (tempi di ritenzione: DiST ~3,34 min, TriST ~4,03 min, TetraST ~4,91 min, PentaST ~5,71 min). Nei campioni con DiST elevata si nota la comparsa di un picco ulteriore relativo alla aST (tempo di ritenzione ~2,11 min), segnalato da altri Autori (8). Nella

Figura 1D è mostrato un cromatogramma relativo ad un campione contenente concentrazioni molto elevate (14,5%) di TriST: la DiST appare adeguatamente separata e quantificabile. Si evidenzia, inoltre, la presenza di monosialotransferrina (MonoST) a tempo di ritenzione di ~2,77 min, come già riportato in letteratura (11), anch'essa separata dalla DiST e perciò non interferente con la determinazione della %CDT. L'immunosottrazione della transferrina in tali campioni porta ad un cromatogramma del tutto identico a quello ottenuto dall'analisi HPLC del solo anticorpo e ciò indica che con questa

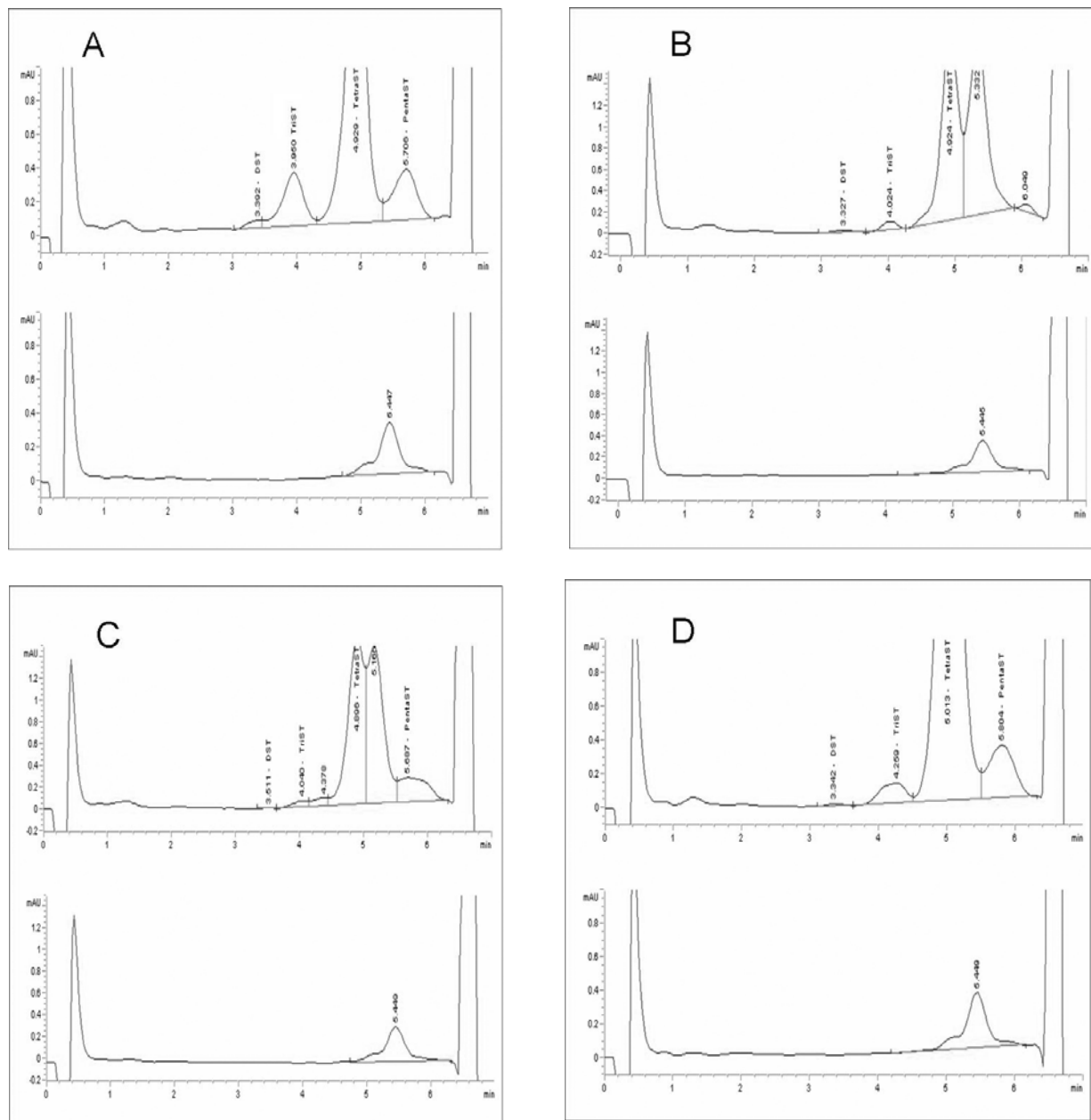


Figura 2

Traccati cromatografici di campioni anomali.

In ogni pannello sono rappresentati i cromatogrammi prima (grafico superiore) e dopo (grafico inferiore) immunosottrazione della transferrina. A) campione con elevata trisialotransferrina (12,8%) (sospetta variante della transferrina C2C3); B) campione con variante BC; C) campione con variante CD; D) campione con variante scarsamente risolta (picchi allargati).

metodica sono rilevati solo contributi relativi a molecole di transferrina.

La Figura 2 mostra l'analisi di campioni contenenti varianti genetiche della transferrina individuate sulla base di confronti con il metodo HPLC di riferimento (8). Nella Figura 2A è mostrato un cromatogramma con elevato livello di TriST (12,8%) e scarsa separazione dell'isoforma DiST: per similarità con campioni noti questo campione può essere verosimilmente associato ad una variante di transferrina C2C3 (8). Le più note e comuni varianti della transferrina con più alto (variante B) o più

basso (variante D) pI (a parità di saturazione in ferro e identica catena di glicani legati) rispetto alla transferrina C, sono mostrate, in stato eterozigote, nelle Figure 2B e 2C. I picchi principali (TetraST) della variante B e della variante D seguono o precedono, rispettivamente, il picco TetraST della transferrina C, e così accade per i rispettivi picchi delle altre isoforme. Nella Figura 2D è mostrato un cromatogramma di una variante non identificata, in stato eterozigote con la transferrina C, che causa un allargamento/parziale sdoppiamento dei picchi cromatografici, probabilmente dovuto ad una leggera

variazione del pI della variante stessa. Anche in questo caso, gli stessi campioni immunosottratti non hanno evidenziato alcun contributo anomalo al cromatogramma, indicando che le varianti genetiche non hanno influenza alcuna, se non puramente separativa, sulla metodica in esame.

I risultati delle analisi HPLC su alcuni campioni contenenti proteine potenzialmente interferenti (proteina C-reattiva e componenti monoclonali) sono mostrati nella Figura 3. Nessuna di queste proteine interferiva con l'analisi HPLC, come confermano i risultati ottenuti dopo

aver sottoposto i campioni ad immunosottrazione: nei rispettivi tracciati cromatografici non appare alcun picco ad esse attribuibile.

DISCUSSIONE

Le valutazioni effettuate sui campioni di siero con differenti valori di DiST e TriST dimostrano che il metodo HPLC utilizzato è in grado di separare correttamente la DiST, isoforma della CDT più strettamente correlata con l'abuso cronico di alcool, dalle altre isoforme (MonoST,

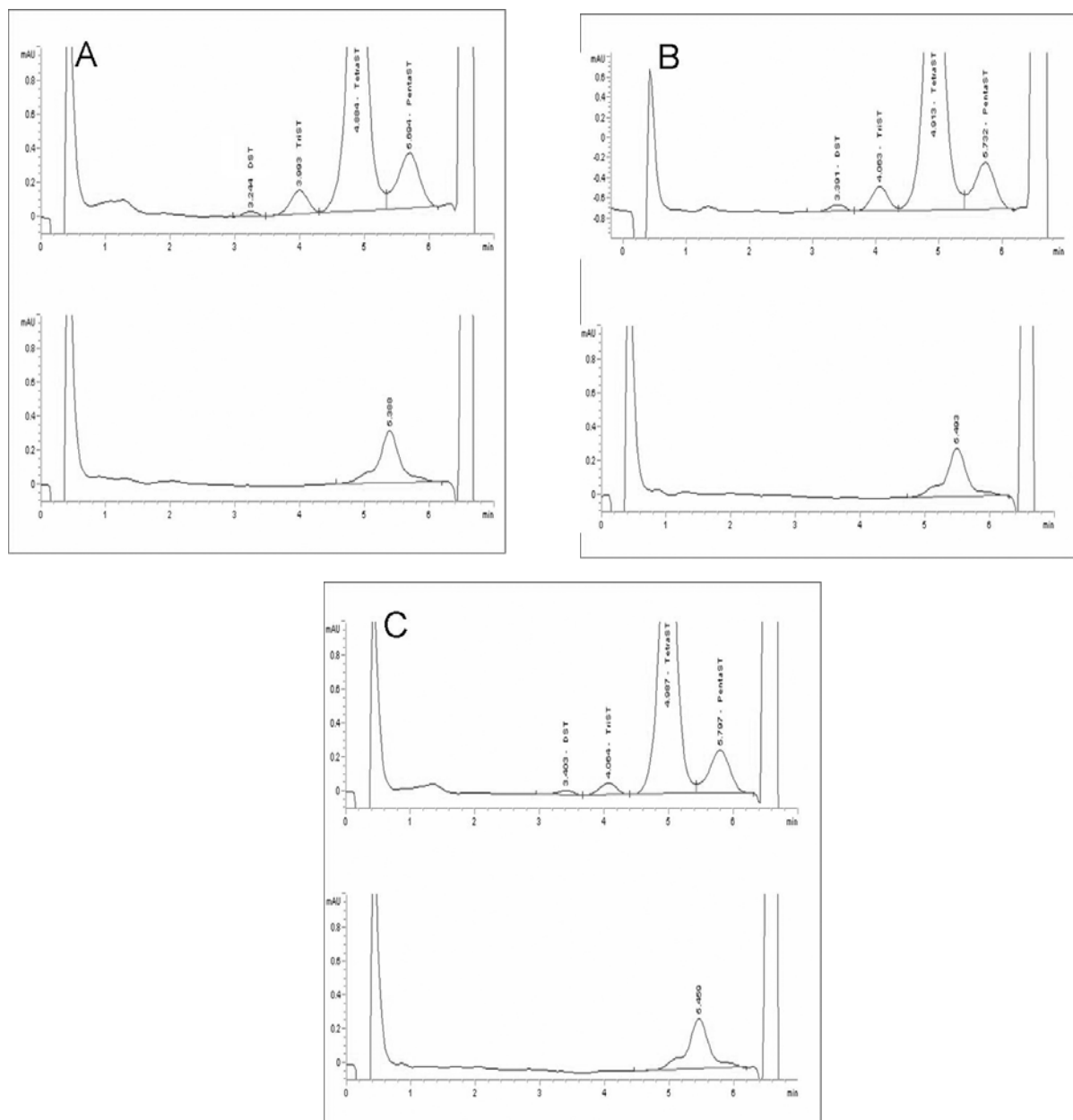


Figura 3

Tracciati cromatografici di campioni contenenti sieroproteine potenzialmente interferenti.

In ogni pannello sono rappresentati i cromatogrammi prima (grafico superiore) e dopo (grafico inferiore) immunosottrazione della transferrina. A) campione con proteina C-reattiva di 248 mg/L; B) campione con componente monoclonale IgG λ di 28,2 g/L; C) campione con componente monoclonale IgAk di 24,7 g/L.

TriST) che invece possono interferire con altre metodiche analitiche (5). Il metodo, inoltre, è in grado di evidenziare anche la presenza di frazioni minori (aST), presenti in campioni con valori anomali di DiST e di permettere una migliore quantificazione della %CDT stessa. L'analisi ha anche mostrato come il metodo HPLC in esame sia in grado di evidenziare varianti genetiche della transferrina. Sebbene la metodica non risolve completamente le singole isoforme delle varianti e, quindi, non renda possibile in questi casi una precisa quantificazione della %CDT, tuttavia il profilo di eluizione permette la corretta identificazione sia dei picchi a maggior contributo percentuale (TetraST), sia delle frazioni minori. La verifica della specificità dell'analisi in HPLC è stata comprovata dall'analisi di campioni contenenti proteine sieriche note per interferire con altre metodiche analitiche (ad es. CZE): nessuna di queste proteine dà origine a picchi interferenti e, di conseguenza, nessuna di esse compromette la quantificazione della %CDT in HPLC. L'uso della tecnica di immunosottrazione su tutti i campioni presi in considerazione nella valutazione del metodo ha fornito cromatogrammi praticamente identici a quello ottenuto dall'analisi dell'anticorpo puro.

L'indicazione ottenuta è che questa metodica HPLC effettua, da un lato, una corretta separazione delle isoforme della transferrina, consentendone una accurata quantificazione e, dall'altro, evidenzia (facendo uso della rivelazione a 460 nm) picchi ascrivibili unicamente alla transferrina stessa non essendo influenzata dalla presenza di componenti proteiche, che invece potrebbero interferire con la determinazione della CDT mediante altre tecniche analitiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Stibler H, Kjellin KG. Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. *J Neurol Sci* 1976;30:269-85.
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. 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.
4. Flahaut C, Michalski JC, Danel T, et al. The effects of ethanol on the glycosylation of human transferrin. *Glycobiology* 2003;13:191-8.
5. 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* 2006;841:96-109.
6. Lanz C, Marti U, Thorman W. CZE with a dynamic double coating for analysis of carbohydrate-deficient transferrin in human serum. Precision performance and pattern recognition. *J Chromatogr A* 2003;1013:131-47.
7. Jeppson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 1993;39:2115-20.
8. Helander A, Husa A, Jeppson JO. Improved HPLC method for carbohydrate deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881-90.
9. Lanz C, Kuhn M, Deiss V, et al. Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. *Electrophoresis* 2004;25:2309-18.
10. Martensson O, Schink E, Brandt R. Diurnal variability and in vitro stability of CDT. *Clin Chem* 1998;44:2226-7.
11. Helander A, Eriksson G, Stibler H, et al. Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 2001;47:1225-33.