

Valutazione di un metodo nefelometrico applicato su BNII della Dade Behring per la determinazione della transferrina carboidrato carente

Gianluigi Devoto, Giorgio Albalustri, Rinaldo Arsenio, Franca Deiana, Marco Musso
Laboratorio Analisi, Ospedale di Lavagna, Genova

ABSTRACT

We compared a Dade Behring N Latex CDT assay with Bio-rad %CDT TIA assay and with Bio-rad % CDT HPLC used in our laboratory such as screening and confirm test respectively. Serum samples of Normal patients (N°120), well-defined alcoholics in pharmacological treatment (N°12), patients affected by Hepatic conditions not alcohol related (N°30), Patients undergoing mandatory control for legal situation (N° 84), were assayed with these three methods. The results show a good correlation between HPLC e N LATEX CDT ($r=0,96$; $p<0,001$), a good concordance in terms of positive-negative samples with a reduce need for confirmation tests, with a reduce of costs and an improvement of laboratory organization.

INTRODUZIONE

L'alcol è la più frequente droga d'abuso che determina non soltanto problemi clinici e sociali ma anche notevoli costi per la società(1). I test convenzionali utilizzati sino ad alcuni anni orsono quali la determinazione della λ -glutamyltransferase (GGT) e del Volume corpuscolare medio (MCV) si caratterizzano per una insufficiente sensibilità nel diagnosticare una situazione di abuso alcolico e bassa specificità in fase di diagnostica differenziale(2).

La Transferrina carboidrato carente (CDT) è il più recente marker biochimico per identificare una condizione di abuso alcolico cronico, e per monitorare lo stato di astinenza e i trattamenti farmacologici specifici nei pazienti ambulatoriali

(3). Infatti un consumo regolare di alcol superiore ai 50-60 g etanolo al giorno, per almeno due settimane, si associa a modificazione del grado di glicosilazione della molecola della Transferrina circolante, per azione dell'acetaldeide a livello dell'apparato del Golgi, con la formazione di isoforme mancanti di una o due catene carboidratiche definite CDT (4). Numerosi metodi analitici sono stati sviluppati in questi ultimi anni. Originariamente venne usata l'Isoelettrofocalizzazione (IEF) con quantificazione densitometrica al laser dopo Immunoblotting (5). Attualmente è considerata il metodo di riferimento per la sua ottimale selettività, ma non può trovare applicazione nella pratica quotidiana per l'elevata complessità. Nell'anno 2001 la Food and Drug Administration ha approvato per uso clinico il metodo turbidimetrico %CDT TIA (Axis Shield Plc) per la diagnosi di abuso alcolico(6). Nel 1993 Jeppson ha sviluppato un metodo basato sul principio della cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) con performance superiori al metodo TIA in ter-

mini di accuratezza, selettività e precisione. (7). In questi ultimi anni è stata validata la metodica in elettroforesi capillare (CE) per la determinazione della CDT. Le prime applicazioni su campioni umani sono state effettuate da Landres (8), utilizzando un metodo di separazione zonale con tampone borato e rilevazione per assorbimento UV a 200 nm. Per superare le complessità di questo metodo, che prevedeva un pre trattamento del campione per immunoestrazione, recentemente Tagliaro(9) ha sviluppato un metodo semplificato che prevede la separazione delle isoforme della transferrina in elettroforesi zonale con tampone borato e rilevazione UV a 200nm. In particolare l'utilizzo di capillari di ridotto diametro interno ha consentito di ottenere un'eccellente capacità risolutiva senza necessità di pre trattamento del campione ad esclusione della saturazione ferrica. Di tale metodo è stata recentemente proposta un'ulteriore modifica che, tramite l'aggiunta al tampone di una amina organica (putrescina), ha permesso di ottenere un significativo miglioramento della capacità risolutiva. Recentemente Dade Behring Marburg GmbH (Germany) ha sviluppato una nuova metodica immunonefelometrica per la determinazione della CDT nel siero applicata sui sistemi Dade Behring BNII e ProSpec (N LATEX CDT). Il test è in grado di determinare in completa automazione, direttamente la concentrazione di CDT sfruttando l'elevata specificità di anticorpi monoclonali contro le isoforme Asialo e Disialo della transferrina. I risultati vengono espressi sia come concentrazione della CDT (mg/L) sia come %CDT misurando simultaneamente la CDT e la Transferrina totale.

Scopi del nostro lavoro sono stati quelli di valutare:

- 1) le performance analitiche del test immunonefelometrico, in comparazione al metodo Bio-rad %CDT TIA

- e al metodo Bio-rad % CDT HPLC, nel diagnosticare la condizione clinica di abuso alcolico cronico
- 2) la stima dei benefici, in termini di costi e di organizzazione, derivanti dall'introduzione in routine del metodo oggetto di studio.

MATERIALI E METODI

Casistica Clinica

La popolazione di riferimento era composta da 120 soggetti sani (70 maschi, età 38 ± 22 ; 50 femmine, età 39 ± 20) che non mostravano un quadro clinico e parametri biochimici compatibili con una condizione di abuso alcolico cronico, per la determinazione dei valori di cutoff. La CDT è stata misurata inoltre su una popolazione di 138 pazienti suddivisa in tre gruppi:

- 1) pazienti in trattamento per abuso alcolico precedentemente diagnosticato e monitorati dal Centro di Alcolologia della nostra ASL (N°12).
- 2) pazienti affetti da Cirrosi Epatica e Epatite Cronica non alcol correlate (N°30).
- 3) pazienti che, per motivazioni medico legali diverse (sospensione patente di guida, affidi...), eseguivano il dosaggio della CDT (N° 84).

Metodi Analitici

Il test Bio-Rad %CDT TIA è un'analisi immunochimica eterogenea con separazione su colonna seguita da una misurazione turbidimetrica. In sintesi la transferrina sierica viene saturata con ioni Fe^{3+} , successivamente la miscela campione reagente viene fatta passare su colonna a scambio ionico. Le isoforme a basso contenuto in acido sialico (Asialo, Monosialo e Disialo) vengono separate e dosate successivamente con metodica turbidimetrica applicata, secondo le istruzioni del produttore, su analizzatore BNII (Dade Behring). Sia le isoforme che la transferrina totale sono dosate utilizzando il medesimo anticorpo anti transferrina. Il risultato viene espresso come %CDT.

Per l'analisi dei campioni in HPLC abbiamo utilizzato il sistema cromatografico Agilent 1100 serie (Agilent Technology). 100 uL di siero sono miscelati, a temperatura ambiente, con 500 uL di Reagente Mix (500 uL di Bis-Tris Buffer, 10 uL di $FeCl_3$, 10 uL di $NaHCO_3$, 10uL di Dextran Sulfate, 10 uL di $MgCl_2$). Dopo incubazione a temperatura ambiente per 30-60 min e successiva centrifugazione a 10.000 g per 10 min, 100 uL di sovrantante vengono iniettati in colonna. La separazione delle isoforme della transferrina si ottiene per gradiente di eluzione a 35°C, con una velocità di flusso di 1,3 mL/min, mentre la lettura viene effettuata a 460 nm UV/VIS.

Un registratore/integratore è in grado di monitorare il segnale in uscita dal rivelatore UV/VIS. L'integrazione

viene effettuata sulla linea di base e l'area di ogni isoforma rapportata alla percentuale dell'area totale della transferrina.

N LATEX CDT è un metodo competitivo. La CDT presente nel siero del paziente compete, per il legame con anticorpi monoclonali anti CDT adesi a particelle di polistirene, con la CDT adsorbita sulla superficie di altre particelle di polistirene miscelate con il campione in esame. In presenza di CDT nel campione si avrà una ridotta o assente aggregazione delle particelle di polistirene secondo il principio della competizione, mentre in assenza di CDT nel campione si avrà un'aggregazione delle particelle di polistirene. Ne consegue che ad elevate concentrazioni sieriche di CDT si avrà un basso segnale della luce di scattering e viceversa. Il KIT è composto da: N CDT Reagent 1 (particelle di polistirene coattate con CDT $< 0,017$ g/L), N CDT Reagent 2 (particelle di polistirene coattate con anticorpo monoclonale anti CDT $< 0,009$ g/L), N CDT Reagente Supplementare (sospensione salina tamponata con fosfato con aggiunta di polyethylene glycol sorbitan monolaureate 5g/L) ed EDTA ($< 0,2$ mol/L), Standard SL N CDT (ad una matrice sierica umana è stata aggiunta CDT). La concentrazione di CDT è stata calibrata rispetto a CDT purificata. N CDT Human Control SL/1 e N CDT Human Control SL/2 (matrice sierica umana stabilizzata con aggiunta di CDT purificata). La concentrazione di CDT è stata calibrata rispetto allo Standard SL N CDT.

ANALISI DELL'IMPATTO ORGANIZZATIVO

Abbiamo stimato i seguenti parametri:

1. Personale dedicato all'esecuzione del test CD
2. Analizzatore dedicato all'esecuzione del test CDT
3. Costi riferiti all'impiego di Personale, Analizzatore dedicati o al solo Reagente
4. Tempo di esecuzione riferito al nostro carico di lavoro medio (25 test per seduta)
5. Numero di sedute settimanali effettuabili
6. Conservazione del campione
7. Grado di automazione dei metodi
8. Controllo delle fasi analitiche
9. Qualità del dato
10. Ricorso al test di conferma espresso in percentuale considerando l'HPLC quale metodo di riferimento.

RISULTATI

I risultati ottenuti sulle popolazioni oggetto di studio sono riportate in Tabella 1. Nella popolazione di riferimento (120 pazienti) il valore medio ottenuto con %CDT TIA era di $1,8 \pm 0,5$, con l'N LATEX CDT era di $1,56 \pm 0,35$ e con l'HPLC di $1,4 \pm 0,3$. Il test di Wilcoxon ha evidenziato una differenza statisticamente significativa ($p < 0,001$) tra i valori medi così ottenuti. Il valore di cutoff

Tabella 1
Risultati ottenuti nelle popolazioni oggetto di studio

CDT %	% CDT TIA	HPLC	N LATEX CDT
Valori Medi Popolazione Normale	1,8 ± 0,5 *	1,4 ± 0,3 *	1,56 ± 0,35 *
Valori Medi Pazienti	2,95 ± 1,76*	2,4 ± 1,65	2,45 ± 1,3
Differenza media vs N LATEX CDT	0,56%*	0,06%	0
Limite di sensibilità	0.9 %	0,3%	0.8%
Cutoff	2,6%	1,8%	2,0%
*p<0,001			

ottenuto applicando il 97.5 percentile era di 2,6 con il %CDT TIA, 2,0 con l'N LATEX CDT e 1,8 con HPLC. I valori medi di CDT ottenuti nei 138 pazienti erano: 2,95 ± 1,76 con % CDT TIA (p<0,001 vs HPLC e N LATEX CDT), 2,45 ± 1,3 con l'N LATEX CDT e 2,4 ± 1,65 con l'HPLC. Le differenze medie tra i risultati ottenuti con N LATEX CDT, valutate utilizzando il test di Wilcoxon, erano altamente significative (0,56 %; p<0,001) vs % CDT TIA, e non statisticamente significative vs HPLC (0,06%). L'imprecisione del metodo N LATEX CDT espressa come Coefficiente di variazione tra giorni era: 2,6% per N LATEX CDT, 3,9% per % CDT TIA e 3,0% per HPLC, per campioni con concentrazioni vicine ai rispettivi cutoff. Del 2,0% per N LATEX CDT, 3,4% per % CDT TIA e 1,7% per HPLC, per campioni con concentrazioni elevate di CDT. Il limite di quantificazione, definito come la più bassa concentrazione di CDT determinabile

con una Deviazione Standard (DS) <20%, era 0.9 % con il %CDT TIA, 0,8% con l'N LATEX CDT e 0.3% con l'HPLC. Il metodo HPLC è dotato di un eccellente grado di separazione delle diverse isoforme della transferrina (fattore di risoluzione tra disialo e trisialo transferrina di 1,6). Un cromatogramma tipo è riportato in Figura 1.

Abbiamo studiato il grado di correlazione fra i differenti metodi ottenendo una correlazione statisticamente significativa tra HPLC e N LATEX CDT (r=0,96; p<0,001; Fig. 2), tra N LATEX CDT and % CDT TIA (r=0,93; p<0,001; Fig. 3) e tra HPLC and % CDT TIA (r=0,90; p<0,001; Fig. 4).

Utilizzando i valori di cutoff precedentemente descritti abbiamo classificato i campioni come positivi e/o negativi ottenendo i seguenti risultati: HPLC, 38 positivi e 100 negativi; N LATEX CDT, 47 positivi e 91 negativi, % CDT TIA, 51 positivi e 87 negativi. Considerando l'HPLC

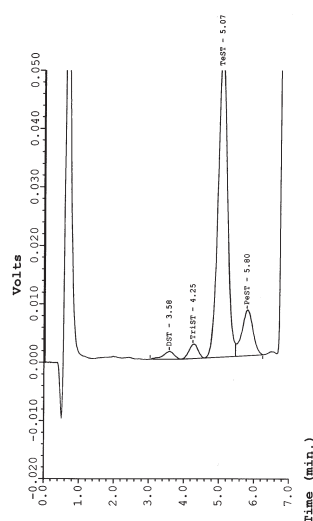


Figura 1
esempio di cromatogramma HPLC (CDT% 2.4)

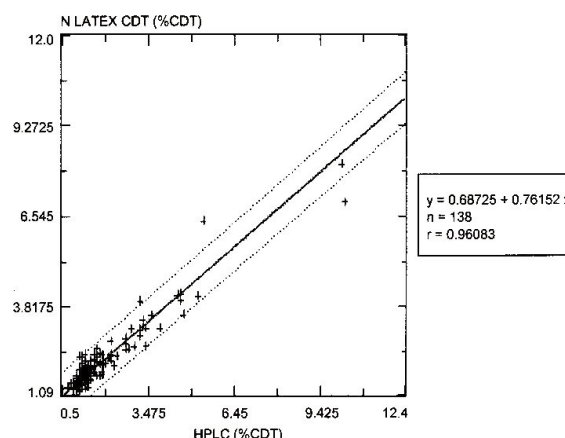


Figura 2
correlazione tra HPLC vs N LATEX CDT

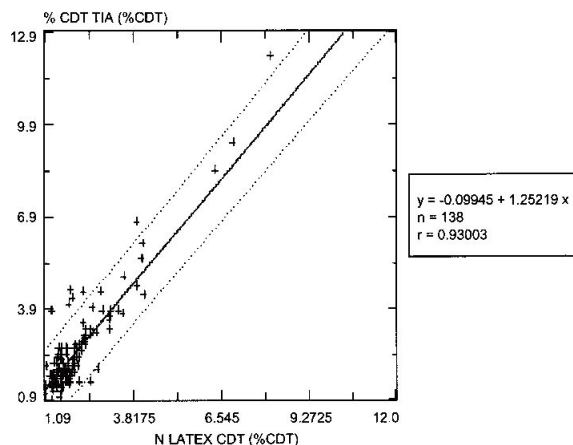


Figura 3
correlazione tra N LATEX CDT vs % CDT TIA

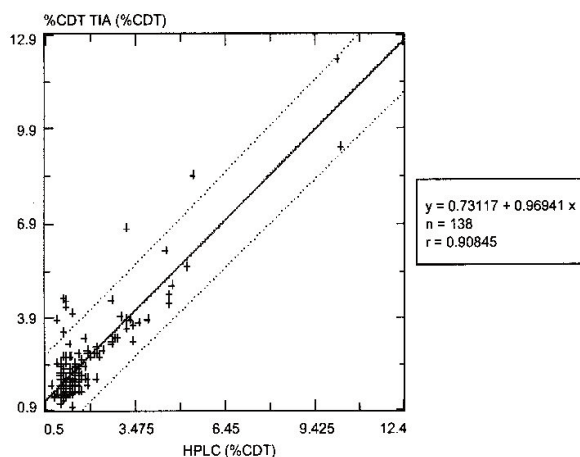


Figura 4
correlazione tra HPLC vs % CDT TIA

Tabella 2
Analisi dell'impatto organizzativo

Parametro	% CDT TIA	HPLC	N LATEX CDT
Personale dedicato	Sì	Sì	No
Strumento dedicato	Sì	Sì	No
Costi Complessivi	Personale, Reagente	Personale, Reagente	Reagente
Tempo di esecuzione (25 test per seduta)	290 minuti	380 minuti	140 minuti
N° sedute settimanali	2	2	6
Conservazione del campione	Sì	Sì	No
Automazione	Solo Fase di lettura	Solo Fase di lettura	Totale
Controllo di tutte le fasi analitiche	No	Sì	Sì
Qualità del Dato analitico	Quantitativo	Quantitativo, Qualitativo	Quantitativo
Percentuale di Test di conferma	13%	0	7,8%

quale metodo di riferimento abbiamo ottenuto: 9 Falsi Positivi e 2 Falsi Negativi con N LATEX CDT e 13 Falsi Positivi e 5 Falsi Negativi con % CDT TIA.

I risultati della valutazione dell'impatto sull'organizzazione del laboratorio sono riportati in tabella 2.

DISCUSSIONE

La determinazione della CDT è attualmente il marker biologico più utilizzato per la diagnosi di abuso alcolico cronico. La sensibilità e specificità del test, in popolazioni ben selezionate sono superiori all' 80% e al 90% rispettivamente(10). Tali performance diagnostiche non si confermano se utilizziamo il test CDT nella popolazione generale o in alcuni sottogruppi particolari. Ad esempio poiché la Transferrina, e di conseguenza la CDT, è sintetizzata, glicosilata e secreta dagli epatociti(11), le performance diagnostiche della CDT sono sicuramente inferiori se applicate nei pazienti affetti da epatopatie e/o cirrosi.

Le metodiche per la determinazione della CDT richiedono tutte una separazione delle differenti isoforme della transferrina utilizzando tecniche cromatografiche e/o elettroforetiche.

Recentemente la Dade Behring ha sviluppato anticorpi specifici contro la CDT utilizzando transferrina ricombinante non – glicosilata o enzimaticamente deglicosilata, come immunogeno. BALB/c topi sono stati immunizzati con queste isoforme di transferrina e sono state preparate e clonate cellule ibride. La specificità anticorpale è stata dimostrata valutando la loro reazione con la CDT e altre isoforme della Transferrina tramite: Western Blotting dopo SDS-PAGE, Isoelectric focusing (IEF) utilizzando Phast System™ seguito da immunofissazione o Western Blotting and IEF/immunofissazione dell'eluato dopo cromatografia. Gli autori (12) hanno dimostrato la specificità degli anticorpi anti CDT e quindi la possibilità del loro utilizzo per la quantificazione immu-

nochimica diretta della CDT sierica.

Scopi del nostro lavoro sono stati quelli di valutare:

1. le performance analitiche del test immunonefelometrico, in comparazione al metodo Bio-rad %CDT TIA e al metodo Bio-rad % CDT HPLC, nel diagnosticare la condizione clinica di abuso alcolico cronico
2. la stima dei benefici, in termini di costi e di organizzazione, derivanti dall'introduzione in routine del metodo oggetto di studio.

I risultati ottenuti, in riferimento al punto 1 dimostrano che:

1. esiste una differenza statisticamente significati va tra i valori medi delle popolazioni di pazienti studiati, ottenuti con i tre metodi che, trovando una giustificazione nei diversi limiti di sensibilità degli stessi, si riflettono ovviamente anche sui valori di cutoff calcolati.
2. con il metodo %CDT TIA si ottengono delle concentrazioni medie più elevate, significative statisticamente, rispetto agli altri due metodi
3. il grado di correlazione tra i metodi, considerando l'HPLC quale metodo di riferimento, pur essendo statisticamente significativo per entrambi i metodi di screening è ottimale per N LATEX CDT
4. il grado di concordanza dei risultati, in termini di campioni classificati come positivi e/o negativi evidenza delle performance migliori per l' N LATEX CDT; in particolare solamente la presenza di soli N° 2 campioni falsamente negativi. Campioni, risultati negativi anche con il metodo % CDT TIA, che presentavano concentrazioni di CDT vicine al valore di cutoff del metodo HPLC.

I risultati ottenuti, in riferimento al punto 2 dimostrano che l'utilizzo in routine del metodo N LATEX CDT può portare, riferito ovviamente alla nostra realtà organizzativa dove in particolare utilizziamo il nefelometro per la determinazione delle proteine specifiche, ai seguenti vantaggi

1. la possibilità di non avere del personale dedicato alla sola esecuzione della CDT. Ovviamente questo non è applicabile nei confronti dell'HPLC ove questo metodo, al pari della nostra realtà organizzativa, venga utilizzato come solo test di conferma. Ne consegue un'ottimizzazione dei costi riferiti al personale
2. cadenza analitica significativamente superiore, che è legata ad un'automazione totale e ad un controllo di tutte le fasi analitiche evidenzia ulteriori vantaggi rispetto al metodo % CDT TIA
3. la possibilità di processare i campioni a cadenza giornaliera, è sicuramente un vantaggio sia in termini di problematiche legate alla corretta conservazione del campione sia in termini di tempi di consegna del risultato al paziente
4. si ottiene una riduzione del 40% dei test di conferma all'HPLC con un'ulteriore ottimizzazione sia dei costi

che del tempo di refertazione

5. N LATEX CDT fornisce un dato esclusivamente quantitativo a differenza della HPLC dove otteniamo un cromatogramma, dato essenziale nei pazienti portatori di varianti genetiche, anche se non riusciamo ad ottenere la concentrazione della CDT. A tale proposito i primi dati della letteratura (13) sembrano dimostrare l'attendibilità del dato CDT ottenuto con il metodo N LATEX CDT anche nei portatori delle diverse varianti genetiche

Sulla base dei risultati ottenuti abbiamo ritenuto di introdurre il test N LATEX CDT quale metodo di screening per la determinazione della CDT, affiancato all'HPLC quale metodo di conferma.

BIBLIOGRAFIA

1. Wallace P, Cutler S, Haines A. Randomized controlled trial of general practitioner intervention in patients with excessive alcohol consumption. *BMJ* 1988;267:663-8.
2. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991;37:2029-37
4. Landberg E, Pahlsson P, Lundblad A, Arnetorp A, Jepsson J-O. Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;210:267-74
5. Stibler H, Kjellin KG. Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. *J Neurol Sci* 1976;30:26-85
6. Helander A, Fors M, Zakrisson B. Study of Axis-Shield new %CDT immunoassay for quantification of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum. *Alcohol Alcohol* 2001;36:406-12.
7. Jepsen J-O, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 1993;39:2115-20.
8. Oda R.P., Prasad R., Llanders J.P., Stout R.L., Coffin D. et al. Capillary electrophoresis based separation of transferrin sialoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Electrophoresis* 1997;18:1819-26.
9. Tagliaro F., Bortolotti F., Crivellante F., Cittadini F.. Objective diagnosis of chronic alcohol abuse – determination of carbohydrate deficient transferrin (CDT) with capillary electrophoresis. *Forensic Sci* 2000;12:133
10. Allen JP., Litten RZ., Anton RF., Cross GM. Carbohydrate-deficient transferrin as a measure of moderate drinking: remaining issues. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:799-812.
11. de Jong G., van Dijk JP., van Eijk HG.. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 1990;190:1-46.
12. Althaus H., Hacler R., Fischer B., Schaefer JR. et al. A new carbohydrate-deficient transferrin (CDT)-specific monoclonal antibody for direct immunochemical determination of CDT. Poster al 15th IFCC-FESCC EUROPEAN Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine June 2003, Barcelona
- 13) Helander A., Dahl H., Swanson I., Bergstrom J. Evaluation of Dade Behring N LATEX CDT: a novel homogeneous immunoassay for carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Research* 2004; 28: Supplement 34A.