

Determinazione delle isoforme della transferrina mediante elettroforesi capillare

Simona Martello

Università Cattolica del Sacro Cuore - Istituto di Medicina Legale - Roma

ABSTRACT

Determination of carbohydrate deficient transferrin isoforms by capillary electrophoresis

Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) is the most specific marker of chronic or sustained alcohol abuse. This marker is commonly used as a diagnostic tool in many areas: employment, traffic safety and forensic medicine. For this reason in the last years the development of specific method for CDT determination has been a target. Capillary electrophoresis (CE) has been confirmed a convenient tool for rapid and accurate CDT analysis. Commercial kits have been simplified the CDT determination by capillary electrophoresis and now they are used for routine diagnostic. In this work it is reported the experience of CDT analysis using CE. It was also reported the limit of CDT determination in serum for forensic purposes and the comparison with immunoassays.

INTRODUZIONE

Il termine CDT è un parametro ormai accettato internazionalmente come marker di somministrazione cronica o eccessiva di alcol.

Per la diagnosi di abuso alcolico, i marker cronici tradizionali comprendono: la γ -glutamyl transferasi (GGT), il volume corpuscolare medio degli eritrociti (MCV), l'aspartato e l'alanina aminotransferasi (AST e ALT). Inoltre negli ultimi anni sono stati studiati e proposti, come marker cronici di abuso alcolico, gli esteri etilici degli acidi grassi e l'etilglucuronide, entrambi determinati nei capelli [1-6].

In genere l'associazione della GGT con la macrocitosi è considerato un marker idoneo di dipendenza da alcol, ma disordini epatici di tipo non alcolico o l'utilizzo di alcuni farmaci, come ad esempio gli antiepilettici, possono alterare entrambi i parametri.

In accordo con la letteratura e l'ampia esperienza clinica, la CDT (carbohydrate-deficient transferrin) si pone come marker di prima scelta per la diagnosi di uso/abuso cronico di alcol [7-10]. Il termine CDT è utilizzato per indicare un gruppo di isoforme della transferrina presenti in piccole quantità.

La transferrina (Tf) è un' importante proteina che trasporta il ferro ed è costituita da 269 aminoacidi con due potenziali siti di glicosilazione (Asn-413 e Asn-611), in genere legati a catene glicosidiche di composizione variabile contenenti quattro diversi residui carboidratici terminali (N-acetilglucosamina, mannosio, galattosio e acido sialico). Nelle catene glicosidiche l'acido sialico è l'unico residuo aminoacidico carico e, quando presente, dà una carica negativa alla molecola della transferrina.

La maggior glicofoma della transferrina costituisce

circa l'80% di tutte le isoforme e contiene quattro residui di acido sialico (tetrasialo-Tf, pI 5,4) ma sono state identificate isoforme minori contenenti due residui (disialo-Tf, pI 5,7), tre residui (trisialo-Tf, pI 5,6) e cinque (pentasialo-Tf, pI 5,2), inoltre sono state trovate tracce di asialo-Tf e di monosialo-Tf (pI > 5,7). Le isoforme asialo, monosialo e disialo sono note con il nome di CDT.

In conseguenza di abuso di alcol si ha un aumento della disialo-Tf e della asialo-Tf senza enormi cambiamenti della forma maggiore, la tetrasialo. Il meccanismo responsabile dell'aumento dei livelli di CDT nel siero non è ancora stato stabilito con certezza. Si ipotizza che l'etanolo ingerito porti ad una inibizione dell'attività degli enzimi responsabili dell'aggiunta dei residui di acido sialico (sialiltransferasi, galattosiltransferasi e N-acetilglucosamina transferasi), presenti nei complessi epatici del Golgi. Un altro meccanismo ipotizzato è un aumento dell'attività degli enzimi quali le sialidasi che sono coinvolti nella rimozione di residui carboidratici dalla transferrina, in seguito sempre all'azione dell'etanolo [10].

Sulla base di studi clinici-epidemiologici ed esperimenti si è ormai certi che una assunzione giornaliera di etanolo maggiore di 50-80 g per una o due settimane aumenta la CDT nel siero nell'80% dei soggetti. L'emivita di questo marker è circa 15 giorni e la sua specificità è alta (circa 90-100%) [11].

In situazioni di certa non assunzione di alcol sono stati riportati aumenti dei valori della CDT, in particolare nel caso di gravidanza e in alcune condizioni patologiche come galattossemia, fibrosi cistica, grave insufficienza epatica dovuta ad una cirrosi biliare primaria, cirrosi epatica virale, carcinoma epatocellulare e in rari difetti del metabolismo glicoproteico, noti con il nome di sindromi da deficienza glicoproteica [12].

Molti lavori hanno confermato la validità della CDT come marker di abuso alcolico in termini di specificità e di sensibilità in confronto con i markers convenzionali [7-9, 12, 13]. L'entità della specificità e della sensibilità è strettamente legata al tipo di tecnica analitica utilizzata: più la tecnica riesce a distinguere le isoforme CDT da quelle non-CDT più la specificità è alta [14].

La prima tecnica applicata all'analisi della CDT è stata l'Isoelettrofocusing insieme a l'immunofissazione o il western blotting. Questa tecnica risulta poco riproducibile per poter fare un'analisi quantitativa. L'HPLC accoppiata all'UV permette la separazione su scambio anionico ma il tipo di analisi risulta essere complesso e costoso [15-17].

Inoltre sono stati sviluppati kit commerciali per test immunochimici che si basano sulla iniziale separazione attraverso microcolonne a scambio ionico e sulla determinazione immunochimica delle isoforme eluite (le isoforme CDT) [18-21]. Il problema di queste ultime tecniche è che la frazione CDT che viene raccolta può contenere quantità eluite delle isoforme non-CDT (trisialo e tetrasialo) portando così ad interferenza con conseguenti risultati falsi positivi. Inoltre le tecniche immunochimiche non distinguono l'eventuale presenza di varianti genetiche le quali possono dare risultati falsi positivi o negativi, a seconda del tipo di variante.

Causa di questi limiti, i test immunochimici non sono applicabili da soli in campo forense. In questo campo l'Elettroforesi Capillare è una tecnica che ha avuto ampio sviluppo in quanto permette un'ottima separazione elettroferogramma delle varie isoforme, potendo così distinguere sia i picchi relativi ad ogni isoforma sia un elettroferogramma nel caso di variante genetica [22-25].

Il metodo qui presentato si basa sulla tecnica CZE utilizzando un kit da poco in commercio, CEofix-CDT, realizzato dall'Analisis (Namur, Belgio).

MATERIALI E METODI

Reagenti e Strumentazione

Le analisi sono state eseguite utilizzando il kit reagente CEofix prodotto dall'Analisis (Namur, Belgio) e lo strumento il P/ACE System 2200 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) equipaggiato con un detector UV. I capillari di silice fusa utilizzati per l'analisi sono stati forniti dall'Analisis.

Metodo analitico

Le analisi sono state eseguite con il kit CEofix seguendo le procedure consigliate. Nel capillare è stato fatto passare inizialmente la soluzione di policationi e di arginina dissolta in 33 g/L di acido malico a pH 4,8. A

questo è stato fatto seguire un lavaggio con tampone tris-borato a pH 8,5 avente proprietà di tipo polianionico. L'iniezione del campione è stata eseguita per pressione a 0,5 psi per 15 secondi. La separazione delle varie isoforme si è ottenuta in 7 minuti alla lunghezza d'onda di 200 nm, applicando un voltaggio di 28 kV a 40° C. Il valore in CDT si è calcolato mediante rapporto in percentuale tra l'area della disialo e l'area della tetrasialo.

Raccolta Campioni

I campioni di sangue sono stati raccolti effettuando un prelievo da 46 volontari sani, scelti come gruppo di controllo, e 52 persone con problemi di alcolismo di diversa entità. Dal sangue raccolto si è ottenuto il siero in seguito a formazione di coagulo in provetta di vetro e conseguente centrifugazione a 3000 giri per 5 minuti. I campioni di siero sono stati conservati a -20° C e analizzati dopo diluizione 1:2 con una soluzione acquosa di FeCl₃ allo 0.1 %.

RISULTATI

L'utilizzo del kit CEofix-CDT ha permesso rispetto ad altri metodi sviluppati in elettroforesi capillare di diminuire il tempo di analisi e migliorare la riproducibilità grazie alla formazione del doppio strato formato dalle soluzioni policationiche e polianioniche [22]. Infatti la più alta carica negativa presente sulle pareti del capillare porta alla formazione di un flusso elettrosmotico più forte con conseguente miglioramento dell'efficienza analitica.

Il metodo utilizzato permette di distinguere, in base alla diversa migrazione elettroforetica, le varie isoforme della transferrina e in particolare, come mostrato in figura 1 si distinguono la disialo (tempo migrazione 4,74 minuti) la trisialo, tetrasialo, pentasialo, esasialo. Come mostrato in figura 1 nei soggetti controllo la disialo è rappresentata da un picco con un'altezza molto bassa ed è la componente principale tra le isoforme CDT, infatti la monosialo e l'asialo non sono presenti. Per questo la disialo è l'isoforma presa in considerazione per il calcolo in percentuale della CDT, in accordo con dati presenti in letteratura [22-24].

Nel caso di abuso o consumo eccessivo di alcol il picco della disialo aumenta come riportato in figura 2 (elettroferogramma di abusatore alcolico)

I risultati in percentuale di CDT sono riportati in tabella 1 per il gruppo di controllo e in tabella 2 per gli abusatori alcolici.

DISCUSSIONE

I risultati dei campioni sani, provenienti dalla popolazione del Lazio, hanno permesso di calcolare il cut-off della tecnica analitica. La deviazione standard (DS) otte-

nuta con i risultati dei campioni sani è di 0,19 con un valore medio (m) di 0,84. Per poter classificare i risultati ottenuti come positivi o negativi è stato calcolato il cut-off ($m + 2 DS$) sui campioni di persone sane, ottenendo un valore limite di 1,22 %.

Considerando questo valore di cut-off, i campioni di abusatori alcolici, dei quali si conosceva lo stato di abuso, risultano effettivamente positivi tranne tre campioni (campione 0,59 %, campione 1,28 %, campione 1,24 %) i cui valori risultano al di sotto o al limite in quanto provenienti da abusatori in fase non attiva da più di 15 giorni.

Un limite che bisogna considerare per l'utilizzo dell'analisi della CDT in campo forense è la stabilità del siero nel tempo. Sono state studiate le condizioni di stoccaggio a diverse temperature (+ 20° C, + 4°C, - 20° C) con l'eventuale aggiunta di sodio azide come conservante.

Lo studio è stato condotto in un periodo di sei mesi e si è visto che, fino a tre settimane, alle temperature considerate, i campioni sia con aggiunta sia senza sodio azide non subiscono variazioni.

A distanza di sei mesi i campioni con o senza conservante stoccati a + 20° C sono degradati e quindi il loro valore in CDT non è calcolabile; i campioni conservati a + 4° C presentano una diminuzione netta in percentuale della CDT soprattutto nel campione in cui non è presente la sodio azide; mentre nel caso dei campioni conservati a - 20° C il valore in CDT si è dimezzato nell'aliquota senza sodio azide ed è diminuito di poco in quella avente il conservante.

In conclusione il metodo utilizzato in questo studio permette di separare le varie isoforme della transferrina in

un tempo breve senza avere falsi positivi e/o negativi come nel caso dei test immunochimici. Il risultato ottenuto può essere quindi utilizzato in campo forense, pur essendo opportuno confermare il risultato con una tecnica di conferma altrettanto attendibile come l'HPLC-UV.

Nel caso sia necessario conservare il campione, la conservazione deve avvenire ad una temperatura di - 20° C, aggiungendo possibilmente un conservante. A differenza dei saggi immunochimici, nell'elettroforesi capillare l'aggiunta del conservante non interferisce con il risultato analitico. Studiando la stabilità nel corso di sei mesi, si è appurato che il campione di siero può non essere utilizzabile a distanza di anni, in quanto, pur aggiungendo il conservante, il valore in CDT subisce comunque delle variazioni. Uno studio ulteriore andrebbe fatto in modo da valutare le concentrazioni ideali di conservante da aggiungere al campione.

BIBLIOGRAFIA

1. Yegles M, Labarthe A, Auwarter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetallers. *Forensic Sci Int* 2004;145:167-173.
2. Wurst FM, Kempter C, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide – a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcohol* 1999;34(1):71-77.
3. Skopp G, Schmitt G, Potsch L, Dronner P, Aderjan R, Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol Alcohol* 2000;35(3):283-285.
4. Alt A, Ianda I, Seidl S, Wurst FM. Determination of ethyl glucuronide in hair sample. *Alcohol Alcohol* 2000;35(3):313-314.

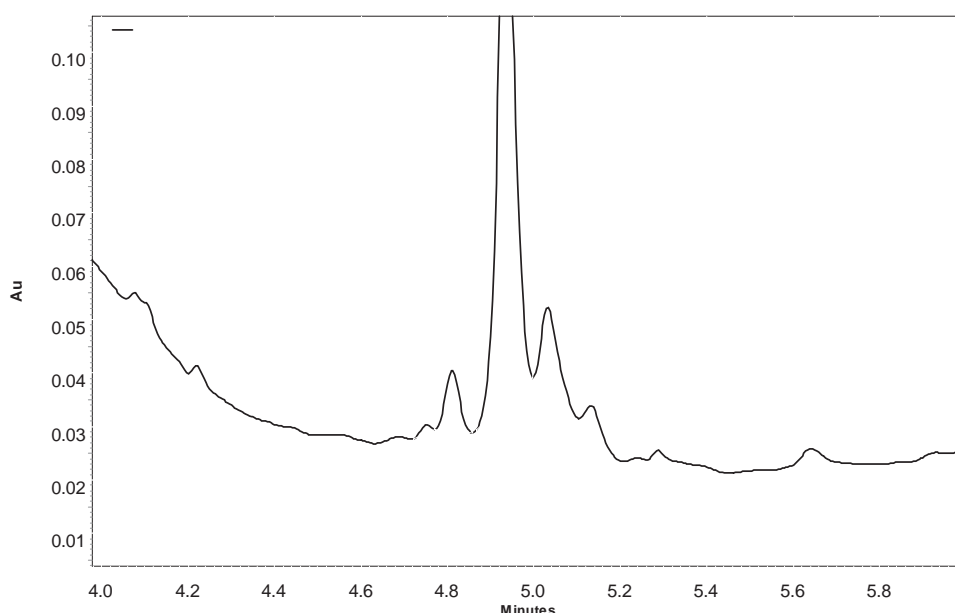
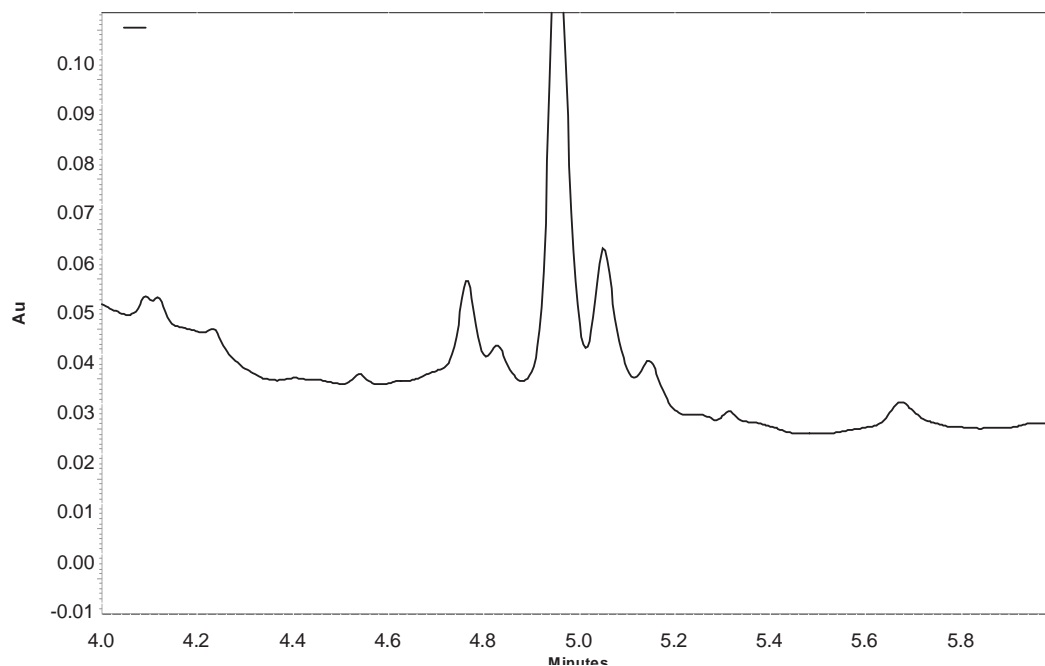


Figura 1

Elettroferogramma delle isoforme della transferrina di un soggetto controllo. Legenda: disialo (4,74 min), trisialo (4,81 min), tetrasialo (4,93), pentasialo (5,03 min), estasialo (5,13 min).

**Figura 2**

Eletriferogramma delle isoforme della transferrina di un alcolista con un valore di disialo del 14,6 % e asialo 1,46 %. Legenda: asialo (4,54 min), disialo (4,76 min), trisialo (4,83 min), tetrasialo (4,95), pentasialo (5,05 min), estasialo (5,15 min).

Tabella 1

Valori in percentuale di CDT del gruppo controllo (popolazione del Lazio).

Campione	CDT (%)	Campione	CDT (%)
1	0.82	24	0.72
2	0.90	25	0.94
3	0.77	26	0.81
4	0.43	27	0.74
5	0.60	28	1.05
6	0.85	29	1.13
7	0.48	30	0.71
8	0.65	31	0.78
9	1.09	32	0.88
10	0.90	33	0.97
11	0.93	34	1.15
12	1.05	35	0.94
13	1.07	36	1.05
14	0.70	37	1.09
15	0.56	38	0.83
16	0.78	39	0.79
17	0.81	40	0.87
18	0.80	41	0.61
19	0.58	42	1.08
20	0.78	43	0.61
21	0.38	44	0.81
22	1.07	45	0.78
23	0.92	46	0.78

5. Laposata M, Hasaba A, Best CA, Yoerger DM, McQuillan BM, Salem RO, Refaai MA, Soderberg BL. Fatty acid ethyl esters: recent observations. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2002 Aug-Sep;67(2-3):193-6. Review

6. Laposata M. Fatty acid ethyl esters: short-term and long-term serum markers of ethanol intake. Clin Chem. 1997;43(8 Pt 2):1527-34. Review
7. Anton R. F. Carbohydrate-deficient transferrin for detection and monitoring of sustained heavy drinking What have we learned? Where do we go from here?, Alcohol 2001, 25:185-188.
8. Malcolm R., Raymond F. A., Conradi S. E., Sutherland S. Carbohydrate-deficient transferrin and Alcohol use in medical examiner cases, Alcohol 1999, 17(1):7-11.
9. Salaspuro M. Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review, Alcohol 1999, 19(3):261-271.
10. Lieber C. S. Carbohydrate-deficient transferrin in alcoholic liver disease: mechanisms and clinical implications, Alcohol 1999, 19(3):249-254.
11. Rosalky S. B. Biomedical identification of alcohol abuse, Int J Clin Pract 1999, 53:138.
12. 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 Rev 2000, 12:133.
13. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. Clin Chemistry 2001;47(1):13-27.
14. Arndt T., Kropf J. Alcohol abuse and carbohydrate-deficient transferrin analysis: are screening and confirmatory analysis required?, Clin Chemistry 2002, 48(11):2072-2074.
15. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. Clin Chemistry 2003;49(11):1881-1890.
16. Lipkowski M., Dibbelt L., Seyfarth M. Is there an analytical or diagnostic advantage from including trisialo transferrin

Tabella 2

Valori CDT in percentuale di 52 persone assuntori o alcolisti con indicazione, quando noto, se il paziente era in fase attiva o non attiva.

Campione	CDT (%)	Tipo di Abuso	Campione	CDT (%)	Tipo di Abuso
1	1.41	Benzodiazepine e Alcol	27	1.12	Non noto
2	1.55	Fase non attiva da 12 gg	28	0.75	Non noto
3	0.59	Non fase attiva da 25 gg	29	0.44	Non noto
4	4.32	Fase attiva	30	0.79	Non noto
5	4.75	Fase attiva	31	1.40	Non noto
6	5.28	Fase attiva	32	1.50	Non noto
7	1.42	Fase attiva	33	1.59	Non noto
8	1.82	Fase non attiva da 10 gg	34	1.25	Non noto
9	1.50	Fase attiva	35	2.71	Non noto
10	1.28	Fase non attiva	36	1.68	Non noto
11	3.68	Fase attiva	37	4.52	Non noto
12	0.78	Fase non attiva da 1 mese	38	3.18	Non noto
13	1.24	Fase non attiva da 17 gg	39	3.47	Non noto
14	1.47	Fase non attiva da 9 gg	40	3.28	Non noto
15	1.74	Fase attiva	41	2.96	Non noto
16	1.44	Ex- alcolista	42	Variante genetica	Non noto
17	1.75	Fase attiva	43	2.86	Non noto
18	2.53	Fase attiva	44	8.10	Non noto
19	1.42	Fase attiva	45	2.99	Non noto
20	5.47	Fase attiva	46	2.86	Non noto
21	3.00	Fase attiva	47	4.76	Non noto
22	4.85	Fase attiva	48	4.81	Non noto
23	3.04	Non noto	49	2.01	Non noto
24	1.90	Fase attiva	50	13.34	Non noto
25	4.57	Fase attiva	51	3.39	Non noto
26	6.47	Fase attiva	52	1.84	Non noto

- into the fraction of carbohydrate-deficient transferrin? Lessons from a comparison of two commercial turbidimetric immunoassays with the carbohydrate-deficient transferrin determination by High-Performance Liquid Chromatography, *Clin Biochemistry* 2000, 33(8):635-641.
17. Turpeinen U, Methuen T, Alfthan H, Laitinen K, Salaspuro M, Stenman UH. Comparison of HPLC and small column (CDTect) methods for disialotransferrin. *Clin Chemistry* 2001;47(10):1782-1787.
 18. Viitala K, Lahdesmaki K, Niemela O. Comparison of the Axis %CDT TIA and the CDTect method as laboratory tests of alcohol abuse. *Clin Chemistry* 1998; 44 (6): 1209-1215.
 19. Anton RF, Dominick C, Bigelow M, westby C, in collaboration with the CDTect research group. Comparison of Bio-Rad %CDT TIA and CDTect as laboratory markers of heavy alcohol use and their relationships with g-glutamyltransferase.
 20. Keating J, Cheung C, Peters TJ, Sherwood RA. Carbohydrate deficient transferrin in the assessment of alcohol misuse: absolute or relative measurements? A comparison of two methods with regard to total transferrin concentration. *Clin Chimica Acta* 1998;272:159-169.
 21. Walter H, Hertling I, Benda N, Konig B, Ramskogler K, Riegler A, Semler B, Zoghiami A, Lesh OM. Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin in drinking experiments and different patients. *Alcohol* 2001;25:189-194.
 22. Crivellente F., Fracasso G., Valentini R., Manetto G., Riviera A. P., Tagliaro F. Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis, *J Chromatography A* 2000, 739:81-93.
 23. Legros F. J., Nuyens V., Minet E. et al., carbohydrate-deficient transferrin isoforms measured by capillary electrophoresis for detection of alcohol abuse, *Clin Chemistry* 2002, 48(12):2177-2186.
 24. 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, 19:3033-3039.
 25. F.J. Legros, V. Nuyens, M. Baudoux, K. Z. Boudjelta, J.L. Ruelle, J. Colicis, F. Contrain, J.P. Henry, Use of capillary zone electrophoresis for differentiating excessive from moderate alcohol consumption, *Clin Chem* 49 (2003) 440-449