

Valutazione dei metodi per la determinazione della transferrina carboidrato-carente

Immacolata Amoroso, Daniela Giardiello, Rita Fiore, Agnese Morani, Patrizia Padulano, Luigi Vrenna

Polo Tossicologico di Riferimento Territoriale per le Farmacodipendenze e le Patologie Correlate "S.M. Loreto Crispi",
ASL Napoli 1

ABSTRACT

Comparison among analytical methods for carbohydrate-deficient transferrin determination. The diffusion of alcohol consumption has been associated to abuse and dependence, leading to relevant socioeconomic problems and the need for forensic medicine to produce clear clinical and therapeutic identifications. Although alcohol is a legal substance of common and free use, it is classified as addiction substance and its increasing use causes public health problems, making mandatory prevention and improvement of therapeutic politics against alcohol dependence and related problems. Alcohol abuse is both a general and individual risk factor, because it is dangerous for the abuser as well as for the community, (*e.g. job and Saturday night traffic accidents*). The phenomenon is complex and accurate biological markers are needed in order to distinguish between acute use, dependence and chronic abuse of alcohol. Currently, the preferred biomarker is carbohydrate-deficient transferrin, (CDT) because of its particular biochemical characteristics allowing both rapid diagnosis and prevention actions of all alcohol-related problems. Today, to determine carbohydrate-deficient transferrin, several reliable methods, characterized by high analytical and diagnostic performances in terms of specificity and sensibility, are available. At the "Laboratory of centre of drug addiction" of the S.M. Loreto Crispi hospital, A.S.L. Napoli 1, different techniques for carbohydrate deficient transferrin determination such as turbidimetric and nephelometric immunoassays, capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography have been checked to evaluate analytical performances, calculate the best cutoff and define accuracy for diagnosis and follow-up of chronic alcohol abuse, as well as for checking continuous abstinence, considering that carbohydrate deficient transferrin isoforms are related to the ingested alcohol amount.

INTRODUZIONE

La transferrina è una glicoproteina, più precisamente una β_1 -globulina, sintetizzata principalmente dal fegato ed in minima quantità anche dal sistema reticolo endoteliale e da alcune ghiandole endocrine (cellule di Sertoli) con un'emivita di 7 giorni.

E' costituita da una singola catena di 679 amminoacidi con due domini globulari, N-terminale (1-336) e C-terminale (337-679), e da due catene N-glicaniche legate a residui di asparagina nel dominio C-terminale. Ciascun dominio è capace di legare un anione (bicarbonato in genere) e due cationi (soprattutto Fe^{+++}) con elevata affinità, tanto che la transferrina rappresenta il principale trasportatore di ferro nel sangue. La transferrina mostra una elevata eterogeneità imputabile al diverso contenuto di ferro e alla presenza e alla composizione delle due catene glicaniche. Per quanto riguarda il contenuto di ferro, sono state identificate quattro forme di transferrina con diversi valori di pl: l'apotransferrina (Fe_0 con pl = 6,1), due transferrine monoferriche (Fe_{1N} con pl = 5,8 e Fe_{1C} con pl = 5,7), ed infine la transferrina diferrica (Fe_2 con pl = 5,4). Inoltre le due catene N-glicaniche, costituite da N-acetilglucosamina, mannosio e galattosio, differiscono per il loro grado di ramificazione, e possono assumere struttura bi-, tri- e tetra-antennaria ciascuna terminante con un residuo di acido sialico a carica negativa (figura 1). La CDT è una proteina costituita dal-

l'insieme delle isoforme della transferrina con pl >5.7 e diverso numero di residui di acido sialico quali la asialo (*isoforma priva di residuo di acido sialico*), la monosialo (*isoforma con un residuo di acido sialico*) e la disialotransferrina (*isoforma con due residui di acido sialico*) identificate nel siero e nel liquido cefalorachidiano¹. Accanto alla eterogeneità dovuta al differente carico di ferro e alla composizione delle catene glicaniche, esistono almeno 38 varianti genetiche² causate dalla sostituzione di uno o più amminoacidi nella struttura primaria della proteina. Sono state individuate tre forme identificate come tipo C, di cui si conoscono sedici sottotipi (C1-C16), tra i quali il sottotipo C1 è il più frequente nella popolazione caucasica (prevalenza >95%), tipo B, a migrazione anodica, e tipo D, a migrazione catodica.

E' noto che quantità elevate di alcool non modificano la catena polipeptidica della transferrina, ma diminuiscono l'attività di alcuni enzimi responsabili della sintesi delle catene N-glicaniche, per cui la CDT aumenta nel siero ed è degradata molto più lentamente delle altre isoforme della transferrina tanto che la sua emivita è di 14 giorni contro 7 delle transferrine normali³. La CDT rappresenta meno del 10% della transferrina totale, e la sua eterogeneità pone rilevanti problemi analitici, sia dal punto di vista della separazione delle isoforme che della sua determinazione quantitativa della CDT⁴⁻⁶. La CDT in medicina forense è stata proposta come biomarcatore

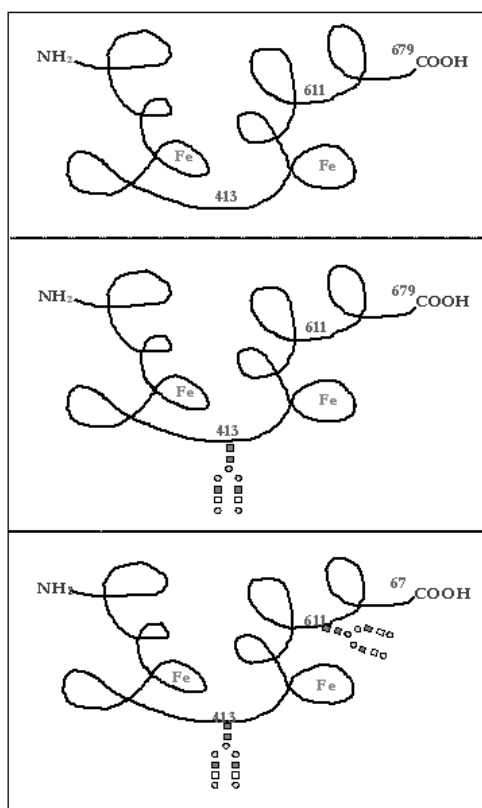


Figura 1

Alcune isoforme della transferrina. In alto: asialotransferrina caratterizzata dall'assenza di catene N-glicaniche e di residui di acido sialico (isoforma CDT); al centro: disialotransferrina caratterizzata dalla presenza di una catena N-glicanica a forma di biantenna in posizione amminoacidica 413 terminante con due residui di acido sialico (isoforma CDT); in basso: tetrasialotransferrina che è l'isoforma maggiormente rappresentata nel siero umano, caratterizzata dalla presenza di due catene N-glicaniche a forma di biantenna in posizione amminoacidica rispettivamente 413 e 611 terminanti con quattro residui di acido sialico (isoforma non CDT)

idoneo al *follow-up*, al controllo del mantenimento dell'astinenza e alla identificazione dello stato di abuso cronico di alcool^{7,8}.

Pur essendo attualmente considerata il marcatore biochimico più sensibile e specifico di abuso alcolico⁹, la CDT è comunque oggetto di un'intenacosa discussione scientifica su diversi aspetti critici ancora aperti:

1. definizione dell'analita;
2. meccanismi biochimici e genetici correlati all'entità d'alcool ingerito;
3. differenti sensibilità e specificità in relazione al sesso;
4. differenti tecniche adottate per il dosaggio;
5. differenti unità di misura e modalità di espressione dei risultati;
6. assenza di materiali di riferimento per la standardizzazione della sua misura.

Allo stato attuale la CDT è l'unico marcatore biochimico indiretto utilizzabile per la diagnosi d'abuso e/o

dipendenza da alcool^{10,11} sia in ambito clinico che nella diagnostica tossicologica, efficace nel rilevare l'abitudine al consumo giornaliero (60-80 g/die) e prolungato di alcool, senza fornire, invece, alcuna informazione sulla presenza di etanolo in circolo o sul suo metabolismo.

Il nostro studio si propone di confrontare diverse tecniche analitiche allo scopo di valutarne l'efficacia diagnostica in termini di sensibilità, specificità e accuratezza, caratteristiche fondamentali di un metodo analitico attendibile.

MATERIALI E METODI

Presso il polo di tossicologia del P.S.I. "S.M. Loreto Crispi" di Napoli (A.S.L. Napoli 1) sono stati analizzati 213 sieri residui provenienti da campioni resi anonimi di soggetti sottoposti a prelievo obbligatorio ai sensi dell'art.186 del Codice della Strada, e di soggetti afferenti alle U.U.O.O. Ser.T. provenienti dai servizi di pronto soccorso metropolitani e dalle case circondariali. Alle tecniche di immunoturbidimetria (TIA) e elettroforesi capillare (CE), già in uso presso il nostro laboratorio, si sono aggiunte immunonefelometria (NIA) e cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC), allo scopo di ridurre le difficoltà interpretative relative alla microeterogeneità della transferrina, alla sovrapposizione delle isoforme CDT e non-CDT, alle basse concentrazioni delle isoforme CDT e alla separazione delle isoforme CDT da quelle non-CDT e dagli altri costituenti del siero.

Le determinazioni in TIA (%CDT-TIA, *BioRad Laboratories*) su siero si eseguono, dopo separazione delle isoforme CDT da quelle non CDT su colonnine a scambio ionico^{12,13}, utilizzando il sistema CODA Analyzer (*BioRad Laboratories*). La variazione dell'assorbanza a 405 nm, prima e dopo aggiunta di un anticorpo anti-transferrina, è funzione della concentrazione della proteina. Le concentrazioni di transferrina nell'eluato, corrispondente alla CDT, e nel siero sono derivate da una curva di calibrazione a quattro punti con calibratori a concentrazioni rispettivamente di 1,5; 6; 12 e 24 mg/L. Il valore della percentuale di CDT (%CDT) è calcolato mediante la seguente equazione:

$$\%CDT = 7,4 \times (\text{transferrina nell'eluato/transferrina nel siero}) - 0,1.$$

La determinazione mediante NIA è stata effettuata in completa automazione con il kit N-Latex CDT (*Dade-Behring*) su sistema BN-II. Il principio del metodo è basato su una competizione tra la CDT presente nei campioni e le particelle di polistirene ricoperte di CDT per il legame ad anticorpi monoclonali specifici anti-CDT umana anch'essi adesi a particelle di polistirene. In assenza di CDT nel campione le particelle di polistirene si aggregano provocando una dispersione della luce incidente. Più basso è il contenuto di CDT in esame, più alto è il segnale luminoso deviato. La valutazione, in mg/L o in %CDT, viene eseguita per confronto contro uno standard di CDT a matrice sierica umana e a concentrazione nota.

Per la CE abbiamo utilizzato un kit (*P/ACE CDT, GeneDIA*) che consente la separazione elettroforetica

delle isoforme della transferrina e la loro rivelazione diretta in UV a 200 nm, dopo saturazione ferrica. A questo proposito, 100 µL di siero vengono incubati per almeno 30 min a temperatura ambiente nel tubo di preparazione. Successivamente il campione di siero, diluito 1:5 con acqua distillata, viene introdotto nel capillare di silice fusa con un diametro interno pari a 25 µm ed una lunghezza totale di 57 cm. La separazione delle isoforme sieriche della transferrina si ottiene in circa 15 min, utilizzando un tampone Tris Borato 200 mM a pH 8,3 ed applicando una differenza di potenziale pari a 28 kV. L'analisi è eseguita su strumento *P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman Coulter)*¹⁴⁻¹⁶. Il calcolo della CDT si ottiene esprimendo la percentuale relativa della CDT rispetto alla tetrasialotransferrina con la seguente formula:

$$\%CDT = (\text{area CDT} / \text{area tetrasialotransferrina}) * 100.$$

Come metodo analitico di riferimento, abbiamo utilizzato il kit *BioRad %CDT su HPLC Agilent 1100 series (Agilent Technologies)* (17), costituito da degasser, pompa quaternaria, campionatore automatico, termostato colonne e detector UV/VIS. L'eluizione a gradiente ternario usa i seguenti solventi: eluente A, tampone bis-tris 20 mM; eluente B, tampone bis-tris 20 mM + NaCl 0,35 M; eluente C, NaCl 0,50 M. Le proporzioni sono prefissate in un programmatore di gradiente, in modo da ottenere l'omogeneità della fase mobile che giunge alla colonna. Quest'ultima è una colonna di silice a scambio anionico forte che lavora a una temperatura di 35 °C. La lettura avviene a 460 nm con lampada al Deuterio. Il campione (100µL siero) viene saturato con una miscela contenente 500µL di FeCl₃ ed incubato per 30-60 min a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione il surnatante recuperato viene trasferito in una cuvetta ed iniettato (200µL) con autocampionatore. L'analisi cromatografica non richiede standard interno in quanto il valore di CDT è espresso in percentuale e ciascuna isoforma della transferrina viene identificata in base al tempo di ritenzione (t_R) riportato dalla casa produttrice del kit ma suscettibile di variazioni dovute alle condizioni sperimentali. L'analisi ha una durata di circa 8 min.

La saturazione ferrica è il passaggio fondamentale per i metodi TIA, CE e HPLC. Viene eseguita con lo scopo di saturare tutta la transferrina sierica presente ed avere un carico uniforme di ferro (due ioni ferrici) in tutto il campione. In tal modo viene ridotto il numero di isoforme native, che hanno un uguale punto isoelettrico (pI). E' bene ricordare che EDTA o eparina possono influenzare la saturazione ferrica e, quindi, la separazione delle isoforme di CDT. Lipemia, emolisi, fibrinogeno e immunoglobuline monoclonali possono, invece, produrre risultati di CDT falsamente positivi.

Le metodiche utilizzate esprimono i valori della CDT in percentuale: i metodi TIA, NIA e HPLC calcolano la %CDT come rapporto tra le isoforme CDT, per la maggior parte disialotransferrina, e la transferrina totale, mentre il metodo CE utilizza il rapporto tra le isoforme CDT e la tetrasialotransferrina, che è quella maggiormente rappresentata nel siero.

Per ciascun metodo è stata calcolata l'imprecisione

nella serie e tra le serie utilizzando per i metodi TIA e NIA i controlli forniti dai kit, e per i metodi CE e HPLC due pool di sieri (normale e patologico), preparati in casa.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita con il programma dedicato MedCalc for Windows (MedCalc Software, Mariakerke, Belgio). L'analisi della regressione è stata eseguita secondo Passing e Bablock, modello particolarmente adatto al confronto tra due metodi, indipendentemente dal metodo posto in ascissa.

Per valutare l'efficacia diagnostica dei metodi sono stati calcolati i parametri di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo e costruite le curve ROC (Receiver Operating Characteristic). Il programma impiegato ci ha consentito di ottenere anche il diagramma di interazione a punti per valutare l'accuratezza del test diagnostico in esame. In questo diagramma i dati positivi e negativi sono riportati separatamente su due linee verticali. La linea orizzontale, invece, individua la migliore separazione tra i due gruppi mentre a lato sono riportati i valori di sensibilità e specificità relativi al miglior cutoff individuato.

RISULTATI

Per lo studio sono stati analizzati 213 campioni sierici di cui 32 positivi al test HPLC (cutoff >2%), impiegato come metodo di riferimento. In un campione positivo è stata rilevata la presenza di asialotransferrina associata ad un valore elevato di disialotransferrina (figura 2). Nella maggior parte dei casi il valore di CDT è limitato

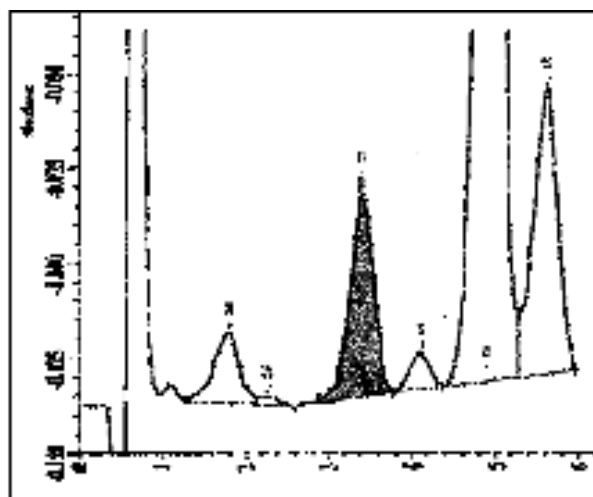


Figura 2

Cromatogramma di un campione positivo. In nero è evidenziato il picco dell'isoforma disialo-transferrina mentre il picco che la precede (visibile alla sua sinistra) è l'isoforma asialo. Quest'ultima è osservabile solo nei casi in cui la percentuale della disialo è molto alta. In tal caso la %CDT sarà così calcolata: (asialo+disialo)/transferrina totale

alla sola percentuale di disialotransferrina, mentre le altre componenti della frazione CDT, in particolare l'asialotransferrina, si possono osservare nei tracciati di CE e nei cromatogrammi di HPLC solo nei casi in cui la percentuale di disialotransferrina sia molto elevata.

L'imprecisione analitica dei metodi nella serie e tra le serie, espressi come calcolata su 20 replicati ed espressa come coefficiente di variazione (CV%), sia nella serie che tra le serie è riportata in tabella 1. La CE e l'HPLC mostrano tutti i CV $\leq 10\%$, il metodo TIA mostra una migliore imprecisione tra le serie alla concentrazione elevata (CV= 9.13%) e il metodo nefelometrico un CV $< 9\%$ alla concentrazione elevata sia nelle prove nella serie che tra le serie. I grafici delle correlazioni ottenute confrontando i vari metodi con HPLC sono illustrati in figura 3. Nella correlazione tra TIA e HPLC, dal quale i risultati ottenuti con le due tecniche sono statisticamente differenti ($p < 0,05$). In questo caso la scarsa correlazione può essere imputabile all'incompleta separazione delle isoforme CDT da quelle non-CDT e quindi ad una coeluzione delle stesse nelle colonnine monouso a scambio ionico. La correlazione tra CE e HPLC e tra NIA e HPLC non mostrano risultati statisticamente differenti. Il valore di r^2 calcolato per il metodo CE (0,85) indica una buona associazione con il metodo HPLC. Per la determinazione dei valori di riferimento sono stati analizzati 125 sieri di pazienti astemi mediante le tecniche HPLC, CE, NIA e TIA e sono stati calcolati i valori di %CDT con media e deviazione standard (SD). L'intervallo di riferimento con

un limite superiore corrispondente quindi al 97,5esimo° percentile della popolazione di riferimento è riportato in tabella 2. I limiti superiori di riferimento sperimentali, calcolati per tutti i metodi sia come 97.5° che come 99° percentile, sono stati quindi confrontati con i livelli decisionali consigliati dalle rispettive ditte produttrici dei kit (tabella 3).

Dai dati si osserva che per il metodo TIA il limite sperimentale corrispondente al 97,5esimo percentile della popolazione di riferimento è poco più alto di quello consigliato; per le restanti metodiche, invece, vale il contrario.

Un ulteriore importante confronto tra le prestazioni dei metodi è stato eseguito mediante l'analisi delle curve ROC. E' stata valutata la capacità dei metodi di distinguere i bevitori moderati dagli abusatori. Dal confronto dei metodi TIA, NIA e CE con il metodo HPLC utilizzato come riferimento, le aree comprese sotto le curve sono risultate di 0,74 (95% CI: 0,64-0,82) per il dosaggio TIA con errore standard (SE) di 0,08, di 0,98 (95% CI: 0,92-0,99) per la CE con SE= 0,03 e di 0,95 (95% CI: 0,91-0,98) per la NIA con SE= 0,03. Le metodiche CE e NIA, quando comparate all'HPLC sono risultate dunque molto più efficaci del metodo TIA.

Nei diagrammi di interazione a punti si evidenzia il valore con la migliore accuratezza diagnostica, intesa come somma di sensibilità e specificità, che per il metodo TIA è pari a 2,8%, contro il 2,6% consigliato dalla casa produttrice, a cui corrisponde una sensibilità del

Tabella 1

Imprecisione analitica dei metodi. Ciascun controllo o pool di siero è stato analizzato 20 volte nella stessa serie analitica (ripetibilità) e in 20 serie diverse (riproducibilità) per ogni metodo

IMMUNOTURBIDIMETRIA						
CONTROLLO	NELLA SERIE			TRA LE SERIE		
	MEDIA (%)	SD	CV %	MEDIA (%)	SD	CV %
PATOLOGICO	4,85	0,58	12,00	4,71	0,43	9,13
NORMALE	1,77	0,19	10,73	1,38	0,24	17,40
ELETTROFORESI CAPILLARE						
POOL DI SIERO	NELLA SERIE			TRA LE SERIE		
	MEDIA (%)	SD	CV %	MEDIA (%)	SD	CV %
PATOLOGICO	4,88	0,26	5,33	4,15	0,33	7,95
NORMALE	1,42	0,12	8,45	1,38	0,14	10,14
NEFELOMETRIA						
CONTROLLO	NELLA SERIE			TRA LE SERIE		
	MEDIA (%)	SD	CV %	MEDIA (%)	SD	CV %
PATOLOGICO	4,90	0,32	6,53	4,53	0,40	8,83
NORMALE	2,23	0,25	11,2	2,71	0,30	11,00
CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA PRESSIONE						
POOL DI SIERO	NELLA SERIE			TRA LE SERIE		
	MEDIA (%)	SD	CV %	MEDIA (%)	SD	CV %
PATOLOGICO	4,69	0,09	1,92	4,7	0,16	3,40
NORMALE	1,59	0,08	5,04	1,31	0,10	7,63

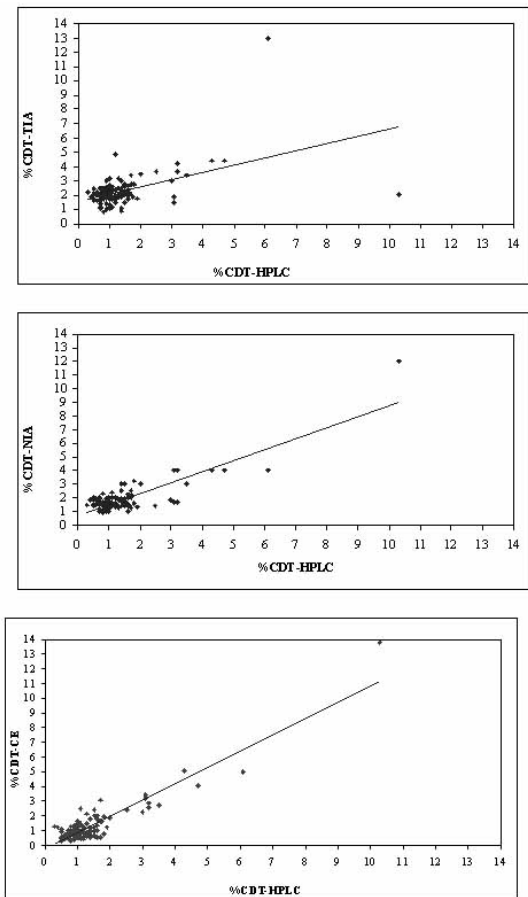


Figura 3
 Comparazione tra i metodi HPLC e: TIA (in alto), NIA (in mezzo) e CE (in basso). Le equazioni delle rette sono: $y=0,503x+1,5929$ con $r^2 = 0,23$; $y=0,8072x+0,7312$ con $r^2 = 0,73$; $y=1,1016x+0,2292$ con $r^2 = 0,85$

Tabella 2
 Intervalli di riferimento ottenuti per i 4 metodi valutati

LIMITI	CDT (%)			
	HPLC	TIA	CE	NIA
SUPERIORE	1,7	2,8	1,9	2,2
INFERIORE	0,4	1,1	0,2	1,1

Tabella 3
 Confronto tra i valori soglia (cutoff) consigliati dalle ditte produttrici e i limiti superiori di riferimento ottenuti

METODI	DITTA	CDT (%)	
		SPERIMENTALI (97.5°)	SPERIMENTALI (99°)
TIA	2,6	2,8	3,0
NIA	2,4	2,2	2,5
CE	2,3	1,9	2,4
HPLC	1,7 (97.5°) 2,0 (99°)	1,7	2,0

64% (95% CI: 41,4-88,9) ed una specificità del 92% (95% CI: 86,6-96,9) (figura 4); per la CE la migliore prestazione in termini di sensibilità e specificità si ottiene al valore di 1,5%, a cui corrisponde una sensibilità del 100% (95% CI: 76,7-100) ed una specificità del 90% (95% CI: 83,9-95,9) (figura 5). Infine per il metodo NIA si ha una sensibilità del 90% (95% CI: 74,2-97,8) con una specificità del 97% (95% CI: 94,1-99,6) al livello soglia di 2,0% (figura 6). La CE consente una migliore separazione tra bevitori moderati e abusatori con una sensibilità

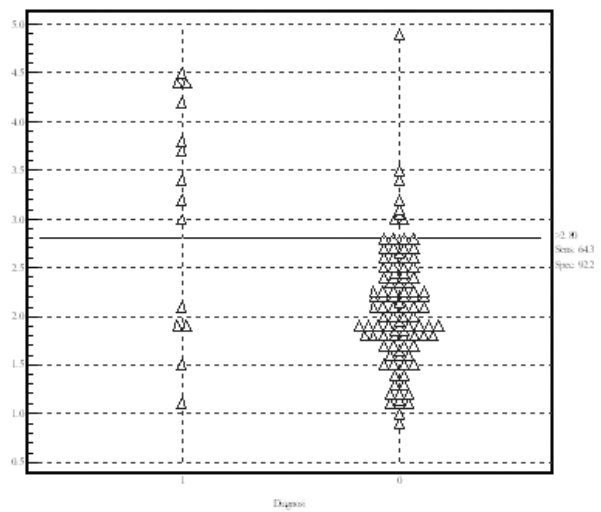


Figura 4
 Diagramma di interazione a punti ottenuto con il metodo TIA. In questo diagramma vengono riportate due linee verticali indicate rispettivamente con 1 e 0. La prima indica i valori positivi e la seconda quelli negativi secondo il metodo di riferimento HPLC. La migliore prestazione in termini di sensibilità (64,3%) e specificità (92,2%) si ricava ad un valore di cutoff pari a 2,8% contro il 2,6% indicato dalla casa produttrice

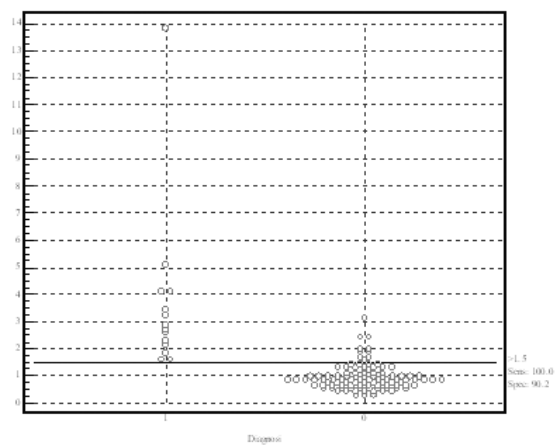


Figura 5
 Diagramma di interazione a punti ottenuto con il metodo CE. La migliore prestazione in termini di sensibilità (100%) e specificità (90,2%) si ottiene ad un valore di cutoff pari a 1,5% contro il 2,3% indicato dalla casa produttrice

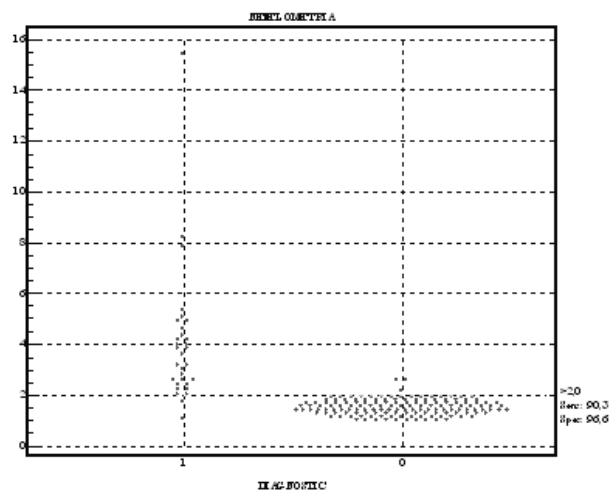


Figura 6

Diagramma di interazione a punti ottenuto con il metodo NIA. La migliore prestazione in termini di sensibilità (90%) e specificità (97%) si ottiene ad un valore di cutoff pari a 2% contro il 2,4% indicato dalla casa produttrice

più alta rispetto ai metodi immunochimici. Per quanto riguarda, invece, la specificità i tre metodi sembrano equivalere.

DISCUSSIONE

In medicina forense la CDT è attualmente ritenuto il migliore marcatore biochimico per accertare l'abuso cronico alcolico, seppur non esistano ancora le condizioni analitiche adeguate per il suo utilizzo in ambito medico-legale¹⁸. In campo alcoologico la CDT è importante per monitorare la quantità di alcool assunta, le eventuali ricadute o il mantenimento dell'astinenza¹⁹. Per tali motivi è consigliabile affiancare ad un test di screening una tecnica analitica di elezione per la conferma²⁰.

In questo studio abbiamo utilizzato l'HPLC come metodo di riferimento per il confronto con TIA, CE e NIA nella determinazione della %CDT²¹.

Il dosaggio TIA presenta alcuni svantaggi:

- bassa risoluzione delle frazioni desialate che pregiudicano in parte la precisione analitica;
- necessità di operazioni manuali, che incidono sulla riproducibilità analitica;
- interferenza della trisialotransferrina;
- impossibilità di individuare la presenza di varianti genetiche della transferrina.

Per quanto riguarda, invece, il metodo NIA di nuova generazione, impiegato su analizzatore BN-II, i vantaggi rispetto al TIA, sono:

- impiego di un sistema completamente automatico dotato di buona cadenza analitica;
- tempo di analisi inferiore a 20 min.;
- possibilità di utilizzare provette primarie;
- migliore sensibilità clinica.

L'insieme di tali caratteristiche consente di utilizzare, in un laboratorio ad alta produttività, il metodo NIA come test di screening. Entrambi i test sopra indicati dosano contemporaneamente sia la CDT che la transferrina totale e presentano un limite di rivelazione pari a 1% di CDT.

La CE appare, invece, più sensibile e riproducibile sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. Il suo limite è rappresentato dall'interpretazione del profilo delle isoforme, in quanto l'integrazione dei picchi è effettuata manualmente. La determinazione della %CDT mediante CE, effettuata ad una λ di 200 nm, può, inoltre, subire interferenze di altre proteine che assorbono alla stessa lunghezza d'onda. Questo inconveniente viene superato dall'HPLC, che utilizza una λ di 460 nm altamente specifica. Esiste, comunque, sia per la CE che per l'HPLC, l'impossibilità di quantificare le isoforme CDT nei casi di alcune varianti genetiche della transferrina.

I risultati dello studio condotto ci portano a suggerire l'impiego della NIA rispetto alla TIA per eseguire le analisi di screening, la CE come metodica di secondo livello e l'HPLC come metodo di riferimento, essendo quest'ultima la tecnica attualmente più affidabile per la determinazione della CDT in presenza di isoforme della transferrina²². Tale metodo, infatti, consente la separazione tra le isoforme e l'elaborazione automatica dei tracciati che si traduce nella individuazione delle varianti genetiche ed in una buona rapidità di indagine.

Per quanto concerne l'interpretazione dei dati ottenuti, è bene sottolineare che in tutti i campioni analizzati, tranne in uno, non sono state individuate (sia negli elettroferogrammi che nei cromatogrammi) le frazioni minori della CDT, ovvero asialo e monosialotransferrina. Tali isoforme si individuano in particolari condizioni: il picco dell'asialotransferrina compare quando la percentuale di disialotransferrina è elevata (figura 2); il picco relativo alla monosialotransferrina compare, invece, quando è elevata la percentuale di trisialotransferrina.

Di particolare interesse è stato, infine, il calcolo dei limiti superiori di riferimento per ogni metodo considerato. Dall'analisi statistica è risultato che per il metodo HPLC il limite superiore di riferimento calcolato coincide con il livello decisionale consigliato dalla ditta, sia come 97.5° che come 99° percentile della distribuzione dei valori; per il metodo TIA il limite superiore di riferimento è risultato più alto rispetto al cutoff consigliato (2,8% vs 2,6%) mentre sia per il metodo NIA (2,2% vs 2,4%) che per la CE (1,9% vs 2,3%), i limiti superiori di riferimento calcolati sono risultati inferiori a quelli consigliati.

BIBLIOGRAFIA

1. Stibler H, Allgulander C, Borg S, Kjellin KG. Abnormal micro-heterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Med Scand* 1978;204:49-56.
2. Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO. Interference of transferrin isoform types with carbohydrate deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 2001;47:1225-33.

3. Sillanaukee P, Strid N, Allen JP, Litten RZ. Possible reasons why heavy drinking increases carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:34-40.
4. Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, Kropf J, Steinmetz A et al. Investigation by isoelectric focusing of the initial carbohydrate deficient transferrin (CDT) and non-CDT transferrin isoform fractionation step involved in determination of CDT by the ChronAlcol.D. assay. *Clin Chem* 2000;46:483-92.
5. 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.
6. Legros FJ, Nuyens 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.
7. Bean P, Harasymiw J, Peterson CM, Javors M. Innovative technologies for the diagnosis of alcohol abuse and monitoring abstinence. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:309-16.
8. Sharpe PC. Biochemical detection and monitoring of alcohol abuse and abstinence. *Ann Clin Biochem* 2001;38:652-64.
9. Walter H, Hertling I, Benda N, Konig B, Ramskogler K et al. Sensitivity and specificity of carbohydrate deficient transferrin in drinking experiments and different patients. *Alcohol* 2001;25:189-94.
10. Anton RF. Carbohydrate-deficient transferrin for detection and monitoring of sustained heavy drinking. What have we learned? Where do we go from here? *Alcohol* 2001;25:185-8.
11. Whitfield JB. Transferrin isoform analysis for the diagnosis and management of hazardous or dependent drinking. *Clin Chem* 2002;48:2095-6.
12. Bon C, Zahir A, Mailliavin A, Roubille M, Biguet-Vernier B et al. Le dosage de la transferrine déficiente en acide sialique avec le test immunoturbidimétrique Axis %CDT. *Immunoanal Biol Spec* 2001;162:71-80.
13. Stibler H, Borg S, Joustra M. Micro anion exchange chromatography of carbohydrate-deficient transferrin in serum as a marker of high alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10:534-44.
14. Giordano BC, Muza M, Trout A, Landers JP. Dynamically-coated capillaries allow for capillary electrophoretic resolution of transferrin sialoforms via direct analysis of human serum. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;742:79-89.
15. Martello S, Trattene M, Cittadini F, Bortolotti F, De Giorgio F et al. Determination of carbohydrate deficient transferrin (CDT) with capillary electrophoresis: an inter laboratory comparison. *Forensic Sci Int* 2004;141:153-7.
16. Wuyts B, Delanghe JR, Kaskove I, Wauters A, Neels H et al. Determination of carbohydrate deficient transferrin using capillary electrophoresis. *Clin Chem* 2001;47:247-55.
17. Anders H, Asgeir H, Olof J. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881-90.
18. Tagliaro F, Bortolotti F, Dorizzi RM, Marigo M. Caveats in carbohydrate-deficient transferrin determination. *Clin Chem* 2002;48:208-9.
19. 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.
20. Arndt T, Kropf J. Alcohol abuse and carbohydrate deficient transferrin analysis: are screening and confirmatory analysis required? *Clin Chem* 2002;48:2072-4.
21. Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Trevisan MT, Floreani M et al. Analysis of carbohydrate-deficient transferrin: comparative evaluation of turbidimetric immunoassay, capillary zone electrophoresis, and HPLC. *Clin Chem* 2005;51:2368-71.
22. Helander A, Wielders JP, Te Stroet R, Bergstrom JP. Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 2005;51:1528-31.