

Applicazione in ambito medico legale della carbohydrate deficient transferrin (CDT): un nuovo marker biochimico di abuso cronico di alcool. Sua determinazione mediante elettroforesi capillare.*

Franco Tagliaro¹, Giulia Manetto², Federica Bortolotti², Monica Zulian², Francesca Cittadini¹, Ernesto D'Aloia¹, Vincenzo L. Pascali¹

parole chiave: alcool, abuso cronico, carbohydrate deficient transferrin, CDT, elettroforesi capillare

key words: alcohol, chronic abuse, carbohydrate deficient transferrin, CDT, capillary electrophoresis

L'abuso di bevande alcoliche e le sue conseguenze mediche, familiari e sociali rappresentano notoriamente uno dei più gravi e radicati problemi delle società occidentali e di molti paesi in via di sviluppo.

Per quanto riguarda l'Italia, la tradizionale integrazione del consumo di alcool nella dieta della popolazione ha condotto ad un notevole grado di sottovalutazione del problema, sia a livello sanitario che legislativo. Prova ne sia la persistente e preoccupante "moderazione" con cui vengono applicati nel nostro paese i controlli dei livelli alcoolemici per la verifica dell'idoneità alla guida (art.186 NCS) sui conducenti di autoveicoli e la sostanziale mancanza di verifiche per escludere l'abuso alcolico nei lavoratori, anche se impegnati in attività potenzialmente pericolose o comunque impicanti particolari responsabilità nei confronti della collettività.

Peraltro, il pesante impatto che il consumo di alcool determina sia acutamente che cronicamente sul sistema nervoso centrale e più in generale su tutto l'organismo ha da sempre indotto una specifica attenzione legislativa e giuridica. E' del resto ben noto come le condizioni di intossicazione alcolica acuta e cronica siano specificamente previste dai Codici Penale e Civile. Sono tuttavia problemi di ordine amministrativo [idoneità a specifici impieghi, idoneità al porto d'armi, idoneità alla guida e al conseguimento o rinnovo della patente di guida] quelli nei quali più frequentemente l'aspetto medico-legale della diagnosi di abuso alcolico acquista una peculiare valenza.

Mentre la diagnosi di intossicazione alcolica acuta si basa su elementi oggettivi ormai standardizzati, fondati sulla determinazione delle concentrazioni ematiche di alcool (1) o direttamente o indirettamente mediante "breath analysis", la metodologia diagnostica delle condizioni di abuso ripetuto o cronico rimane essenzialmente fondata su criteri clinici, per lo più dotati di scarsa sensibilità e specificità diagnostiche. Questo è particolarmente rilevante dato che la censura sociale del consumo eccessivo di alcool conduce l'interessato a negare o quantomeno riferire tale abitudine in maniera non fedele.

Essendo l'alcool una sostanza attiva sul sistema nervoso centrale lecitamente assumibile, la definizione dei limiti di consumo cronico e/o ripetuto oltre i quali si colloca l'abuso non sono uniformi in tutte le culture. E' tuttavia largamente accettato definire come condizione ad "alto rischio" l'assunzione regolare di almeno 60 g di alcool al giorno nel maschio e di 40 g nella femmina. Con "dipendenza alcolica" si identifica invece l'associazione di un consumo elevato di alcool con le dannose conseguenze, fisiche e psichiche, provocate dallo stesso (2).

¹Istituto di Medicina Legale, Università Cattolica del Sacro Cuore, Largo F. Vito, 00168 Roma

²Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale, Università di Verona, Policlinico, 37134 Verona

* Presentato al XXXIII Congresso Nazionale S.I.M.L.A., Brescia, 25-28 Ottobre, 2000. Atti, in press.

La carenza di affidabili parametri oggettivi di diagnosi di abuso cronico alcolico risulta particolarmente grave nei casi in cui tale diagnosi si debba formulare con finalità medico-legali.

In tale ambito è particolarmente importante ridurre al minimo la soggettività di giudizio dell'operatore, giudizio che deve essere invece, ancorato a dimostrabili e in ogni ambito sostenibili criteri di oggettività e scientificità.

A questo riguardo, sono di uso comune in ambito clinico ed epidemiologico definizioni relative all'affidabilità degli indicatori di patologia che possono essere ancora poco chiare per i medici legali, pur avendo una rilevante importanza anche per la nostra disciplina.

Tali termini sono:

sensibilità diagnostica: $[\text{veri positivi}/(\text{veri positivi} + \text{falsi negativi}) \times 100]$ indica la capacità del test di identificare come "positivi" tutti i soggetti portatori della patologia escludendo dunque i "falsi negativi" (indipendentemente dal numero di falsi positivi);

specificità diagnostica: $[\text{veri negativi}/(\text{veri negativi} + \text{falsi positivi}) \times 100]$ indica la capacità del test di identificare come "negativi" tutti i soggetti non portatori della patologia escludendo dunque i "falsi positivi" (indipendentemente dal numero di falsi negativi);

valore predittivo: il valore predittivo di un test positivo, applicato in una popolazione reale che include casi normali e patologici, indica la percentuale di veri positivi sui veri positivi + falsi positivi; il valore predittivo di un test negativo indica la percentuale di veri negativi sui veri negativi + falsi negativi;

efficienza: corrisponde alla percentuale di tutti i risultati corretti (veri positivi + veri negativi) sulla totalità delle analisi.

Lo scopo del presente lavoro è di presentare una breve sintesi dei parametri chimici e biochimici di diagnosi di abuso alcolico cronico attualmente impiegati (per una review vedi rif. 3). Particolare attenzione sarà dedicata ad un nuovo marker, noto come carbohydrate deficient transferrin (CDT), che è stato recentemente introdotto sia in ambito clinico che in ambito medico-legale per la sua elevata affidabilità diagnostica.

Non saranno invece approfonditi gli indicatori di abuso alcolico recente (noti anche come marker di ricaduta), quali acetaldeide, metanolo, 5-idrossitriptofolo ecc., in quanto riguardano generalmente una problematica clinica e solo occasionalmente di rilievo medico legale.

Parametri tradizionali di abuso alcolico cronico

Le transaminasi epatiche (ALT e AST) rappresentano forse il più tradizionale indicatore di abuso cronico di alcool, anche se una loro alterazione è essenzialmente basata sul danno epatico in questo caso alcool-correlato e quindi, intuitivamente, poco specifica. In particolare, un aumento della frazione mitocondriale della AST è considerata indice di abuso, soprattutto se coesistente con bassi valori di ALT. Un rapporto AST/ALT >2 è stato proposto come fattore discriminante tra danno epatico alcool correlato ed altre patologie del fegato. In realtà, tali considerazioni trovano limiti pratici nella modesta sensibilità delle transaminasi come marker di abuso alcolico (~15% nel consumo ad alto rischio; ~50% nella dipendenza). Anche la specificità, pur buona secondo alcuni studi (~70-90%), può essere facilmente resa inconsistente dal frequente sovrapporsi nello stesso soggetto di epatopatie alcool e non-alcool correlate, che possono confondere il pattern enzimatico tipico dell'abuso alcolico.

In realtà, dagli anni '70 il parametro enzimatico epatico tradizionalmente più impiegato per questo scopo è la γ -glutamilttransferasi (GGT), il cui aumento nelle concentrazioni sieriche può essere dovuto a induzione epatica e/o a una latente colestasi. Essendo routinariamente eseguita nei comuni pannelli di esami chimico clinici di funzionalità epatica ed avendo una sensibilità piuttosto buona, pari a ~50% nel consumo ad alto rischio e ~75% nella dipendenza alcolica, la GGT è forse il marker più impiegato in ambito clinico. In realtà, la sua specificità è modesta (~70%) ed il tempo di normalizzazione, dall'inizio dell'astinenza, elevato (1-2 mesi) e spesso

imprevedibile. Questo rende il suo impiego in ambito medico legale, e nelle altre situazioni in cui il rischio di falsi positivi deve essere assolutamente evitato, poco affidabile.

Per ovviare questi problemi, tradizionalmente, la GGT è associata ad un parametro ematologico quale la macrocitosi, espressa dall'MCV (mean corpuscular volume), la cui origine si basa sulla cronica carenza di acido folico che ricorre negli abusatori di alcool. Questo parametro presenta una minore sensibilità rispetto alla GGT, essendo pari al 30-40% nel consumo ad alto rischio e al 60-70% nella dipendenza, ma apparentemente una maggiore specificità, pari al 60-90%. Inoltre, la persistenza della macrocitosi dall'inizio dell'astinenza si prolunga per 1-3 mesi con ampia variabilità individuale.

L'associazione di GGT e MCV è riferita come valido strumento diagnostico. In realtà, come è noto, l'associazione di due parametri (di seguito indicati come a, b) singolarmente poco affidabili presenta evidenti limiti:

- nel caso di impiego secondo la logica "a and b", si accentuerà la specificità, ma si penalizzerà la sensibilità, già bassa soprattutto per l'MCV;
- nel caso di impiego secondo la logica "a or b", si migliorerà la sensibilità, ma la specificità crollerà a valori inferiori a quelli della GGT presa singolarmente.

Di fronte a questi limiti delle strategie diagnostiche più tradizionali si sono ricercati nuovi indicatori di abuso alcolico di cui verrà presentata una breve sintesi nel paragrafo successivo.

Nuovi parametri di abuso alcolico cronico

Gli addotti proteici dell'acetaldeide prodotti dalla reazione non enzimatica tra l'aldeide acetica, prodotto del metabolismo dell'etanolo, e le proteine sieriche, sono considerati markers diretti di abuso cronico (sensibilità 55% nel consumo ad alto rischio, 40-97% nella dipendenza; specificità 75-99 %), non essendo la loro produzione collegata a danni d'organo prodotti dall'alcool. I limiti di questo indicatore sono rappresentati dalla complessità analitica e da una importante sensibilità ad assunzioni di alcool in notevole quantità anche se del tutto occasionali (binge drinking). Per tale motivo non sono mai entrati nella pratica routinaria.

I prodotti di reazione dell'acetaldeide e del piruvato con le indoloalchilammine e catecolammine, conosciuti con il nome di tetraisoquinoline, sono stati proposti come markers di abuso. In particolare il derivato della reazione con la dopamina è stato identificato nei tessuti e nei liquidi biologici degli alcoolisti, presentando peraltro un'ampia variabilità interindividuale. La sua relazione con lo stato dopaminergico ha indotto la formulazione dell'ipotesi di un suo ruolo nella dipendenza alcolica.

La ridotta attività dell'aldeide deidrogenasi eritrocitaria, enzima coinvolto nel metabolismo alcolico, evidenziata negli alcoolisti è stata proposta come indicatore di abuso, peraltro il suo impiego ha dimostrato modesta sensibilità e specificità.

Anche l'aumento della concentrazione dei trigliceridi e dell'HDL colesterolo, per quanto sicuramente correlato al consumo di alcool, non si è dimostrato adatto ad un uso in questo ambito, considerandone la nota, modesta specificità.

Gli esteri etilici e metilici degli acidi grassi (FAEE e FAME) e il fosfatidiletanolo, prodotti di reazione tra alcoli e lipidi, pur essendo specificamente correlati con l'assunzione di alcool, non sono stati sufficientemente studiati in termini di markers di abuso per un loro impiego nella diagnostica.

In conclusione nessuno dei markers sopra discussi soddisfa pienamente i requisiti di minima per una loro piena accettabilità nella diagnostica medico-legale.

Un nuovo marker di abuso alcolico cronico: carbohydrate deficient transferrin

La carbohydrate deficient transferrin (CDT) è il nome comune di un gruppo di isoforme minori della transferrina. Questa glicoproteina può presentare infatti diversi stati di glicosilazione a livello dei due residui di asparagina nelle posizioni 413 e 611. In tali sedi sono infatti presenti

catene oligosaccaridiche di differente composizione che possono contenere ciascuna da 0 a 4 residui di acido sialico (v.di fig.1) con formazione di 9 diverse glicoforme (dall'asialo all'octasialo transferrina).

Tra queste, le isoforme maggiormente rappresentate nel siero umano sono la tetrasialo-Tf, la pentasialo-Tf e la trisialo-Tf. La CDT identifica le isoforme a minore grado di glicosilazione includendo la disialo-Tf, la monosialo-Tf e l'asialo-Tf, che complessivamente ammontano a circa il 2 % della transferrina totale.

Alla fine degli anni '70 venne evidenziata da Stibler *et al.* (4), una correlazione tra consumo alcolico e CDT, consistente in un aumento della sua concentrazione sierica a seguito di abuso cronico. Questo fenomeno è stato spiegato con inibizione dell'attività delle glicosiltransferasi da parte dell'etanolo o dell'acetaldeide e/o con aumento dell'attività della sialidasi epatica (5). Negli anni successivi vari autori (6, 7) hanno dimostrato che l'assunzione continua per circa 1-2 settimane di almeno 50-80 g di alcool determina un incremento significativo dei livelli sierici di CDT. La cinetica di normalizzazione a seguito di sospensione dell'uso di alcool presenta un $t_{1/2}$ di circa 15 giorni.

La sensibilità di questo parametro come marker di abuso alcolico è compresa tra l'80 e il 90%. La specificità è riportata tra il 90 e il 100% nella maggior parte dei lavori.

In realtà, incrementi nelle concentrazioni di CDT non correlati all'abuso alcolico sono stati riportati solo in una limitata serie di condizioni, la maggior parte delle quali clinicamente evidenti, e che pertanto non costituiscono occasione di risultati falsamente positivi. Tra queste segnaliamo la gravidanza, la cirrosi biliare primitiva, la cirrosi post-epatitica di grado avanzato, il carcinoma epatocellulare e un raro disordine metabolico che si estrinseca in un gruppo di sindromi note come CDGS (carbohydrate deficient glycoprotein syndromes) (7).

Determinazione della CDT

La CDT rappresenta meno del 10% della transferrina totale ed i suoi costituenti differiscono per il numero di residui di acido sialico e quindi per una unità di carica (negativa) tra un'isoforma e l'altra. Un'altra fonte di microeterogeneità nella composizione e nella carica della transferrina può essere rappresentata da variazioni nella sequenza aminoacidica o nel grado di saturazione ferrica. Tale caratteristiche pongono rilevanti problemi analitici sia dal punto di vista della separazione che della determinazione quantitativa.

La tecnica tradizionalmente più impiegata per la determinazione della CDT è stata la focalizzazione isoelettrica associata con l'immunofissazione o Western blotting con rivelazione immunochimica. Secondo questo schema analitico le differenti isoforme sono separate secondo il loro punto isoionico e quindi successivamente selettivamente determinate sulla base del riconoscimento anticorpale. Sfortunatamente questa tecnica, pur estremamente risolutiva pecca dal punto di vista della quantificazione, che risente della complessità analitica e della difficoltà di lettura/integrazione della densità delle bande su gel. Questo acquista particolare rilievo se si considera che la differenza tra soggetti normali e patologici si basa su elementi meramente quantitativi.

Un miglioramento degli aspetti quantitativi è stato ottenuto con l'applicazione della cromatografia liquida ad elevata risoluzione (HPLC) su colonne a scambio anionico. La rivelazione è stata ottenuta mediante immunoassay sulle frazioni corrispondenti alle varie isoforme. Il metodo HPLC più utilizzato, tuttavia, si basa sulla rivelazione per assorbimento UV a 460 nm (8).

La capacità della cromatografia liquida di separare le isoforme della transferrina si accoppia quindi efficacemente sia a metodi di rivelazione on line (assorbimento UV) che off line (immunoassay). Tuttavia ovvie considerazioni di praticità e di costo hanno fatto preferire la prima alternativa. In generale comunque i metodi basati sulla HPLC rappresentano oggi il più accreditato strumento per la determinazione quantitativa della CDT. I limiti di questi metodi sono rappresentati dalla complessità operativa associata alla preparazione del campione e alla separazione in gradiente, su colonne costose ed estremamente delicate. Pertanto tali tecniche sono scarsamente proponibili per un uso routinario.

Altri metodi di analisi proteica, basati sulla combinazione della cromatografia ionica in fase liquida a MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry), trovano un impiego esclusivamente in ambito di ricerca.

Attualmente, per scopi di analisi routinaria, le metodiche impiegate si basano su kit commerciali che accoppiano una prima fase separativa su colonnine monouso a scambio anionico, con la successiva determinazione immunometrica (RIA, immunoenzimatica, immunoturbidimetrica) delle isoforme a punto isoelettrico più elevato (corrispondenti alla CDT). Nonostante il grande successo commerciale, questi metodi presentano pesanti limiti in termini di precisione ed accuratezza che dipendono dalla modesta capacità risolutiva delle separazioni in cartuccia (eseguite senza alcun controllo interno), dalla non specificità degli antisieri verso la CDT (che riconoscono la transferrina ma non distinguono fra le varie isoforme) e dalla complessità manuale che il metodo richiede.

Recentemente per la determinazione quantitativa della CDT è stata proposta una nuova tecnica analitica strumentale nota come elettroforesi capillare (CE), già ampiamente impiegata nella determinazione e separazione di biopolimeri (9).

Le prime esperienze applicative della CE (elettroforesi zonale e focalizzazione isoelettrica in capillari) nella separazione delle glicofornie della transferrina risalgono agli studi meramente chimico-analitici condotti da Kilar e Hjerten nel 1989 (10) su soluzioni standard e non su campioni di siero.

Solo successivamente vennero presentati studi orientati all'applicazione su campioni umani. In particolare, Landers *et al.* (11-13) ha utilizzato un metodo di separazione in elettroforesi zonale con tampone borato, contenente cellulosa alchilata, e rivelazione per assorbimento UV a 200 nm. Tale metodo peraltro, prevedeva un pretrattamento del campione per immunoestrazione che, se da una parte garantisce un'elevata specificità, dall'altra sicuramente limita la produttività del metodo. Tale metodo è stato impiegato con successo nell'identificazione di soggetti alcolisti e di pazienti affetti da CDGS. Nella diagnosi di abuso alcolico, in particolare, la determinazione della CDT mediante CE ha mostrato una specificità del 99% e una sensibilità dell'88% per un consumo di alcool superiore a 70 g al giorno per almeno 2 settimane.

Per ovviare alla complessità analitica del metodo di Landers, il nostro gruppo ha recentemente sviluppato un metodo semplificato che prevede la separazione delle componenti della CDT in elettroforesi zonale con tampone borato e rivelazione in UV a 200 nm. L'impiego di capillari di ridotto diametro interno (20 μ m) ha consentito di ottenere un'eccellente capacità risolutiva senza necessità di pretrattamento del campione, richiesta da tutti i metodi precedentemente descritti, se si esclude la saturazione ferrica e la diluizione del siero 1:10 in acqua (14). Tale metodo è stato successivamente modificato mediante l'aggiunta al tampone di corsa di una ammina organica (putrescina) ottenendo un significativo miglioramento dell'efficienza risolutiva che raggiunge 1 milione di piatti teorici/metro (15). Il metodo permette anche una ulteriore conferma dei risultati mediante preventiva immunoestrazione e/o immunosottrazione dei sieri.

Parte sperimentale

La parte sperimentale del presente lavoro riguarda il confronto tra la determinazione della CDT mediante CE e quella basata sul più diffuso metodo commerciale immunometrico.

Materiali e metodi

Materiali

Tutti i prodotti chimici impiegati erano di grado analitico e forniti da Carlo Erba (Milano, Italia) eccetto i seguenti: olo-transferrina (saturata con ferro, umana) approssimativamente pura al 98% e putrescina (diamminobutano, DAB) acquistati da Sigma (St. Louis, MO, USA). Dal DAB è stata preparata una soluzione 90 mM in acqua / 0.05% HCl per evitare la precipitazione durante la conservazione della soluzione stessa.

La determinazione immunometrica è stata eseguita impiegando kit commerciali (% CDT TIA, Bio-Rad, Richmond, CA, USA) e seguendo le istruzioni del produttore.

Strumentazione

Sono stati impiegati elettroferografi P/ACE 2200 e 5500 (Beckman, Fullerton, CA, USA) con rivelatore a lunghezza d'onda singola dotato di filtri di interferenza a 200 nm. I capillari di silice impiegati, forniti da Beckman, erano di tipo uncoated con diametro interno di 20 μ m e lunghezza di 57 cm. I capillari nuovi sono stati inizialmente lavati con idrossido di sodio 1 M per 10 min, idrossido di sodio 0.1 M per 10 min, acqua per 10 min e infine con il tampone di corsa per 20 min. Questi lavaggi sono stati adottati anche ad ogni inizio giornata. Si è poi applicato un potenziale di 20 kV per condizionare il sistema, in modo da avere una linea di base stabile. Tra una corsa e la successiva si è lavato il capillare per 2 min con idrossido di sodio 0.1 M e per 6 min con il tampone di corsa. Tutti i lavaggi sono stati condotti ad una pressione di 20 p.s.i.

Condizioni elettroforetiche e preparazione del campione

Sono state adottate le seguenti condizioni: rivelazione UV a 200 nm, temperatura: 25° C, voltaggio: 20 kV, polarità diretta, iniezione per pressione (0.5 p.s.i.) per 20 s. Il tampone di corsa è stato preparato portando in soluzione sodio tetraborato in quantità tale da ottenere una concentrazione finale di 100 mM ed aggiustando il pH ad 8.3 con HCl 6 M. Tale soluzione è stata addizionata con DAB ad una concentrazione finale 3 mM.

Prima della separazione, i campioni di siero 200 μ L erano incubati con FeCl₃ 10 mM (5 μ L) e con NaHCO₃ 500 mM (5 μ L) per 30 min a temperatura ambiente, al fine di evitare differenze di carica della transferrina, imputabili al diverso grado di saturazione ferrica. Trascorso questo tempo i campioni erano diluiti in acqua 1:10 ed iniettati in CE.

% CDT Turbidimetric Immunoassay (TIA)

Il dosaggio immunometrico della CDT nel siero mediante kit commerciali si basa sull'approccio analitico proposto da Stibler (4) e successivamente applicato a metodologia non radiometrica da Schellenberg [83]. Il dosaggio mediante % CDT TIA su siero è una metodica che prevede la separazione delle isoforme CDT della transferrina su colonnine a scambio ionico, seguita da misurazione immunoturbidimetrica. La prima fase prevede la saturazione ferrica del siero; successivamente il campione viene suddiviso in due diverse aliquote per la determinazione rispettivamente della CDT e della transferrina totale. Una prima aliquota viene eluita su colonna con aggiunte successive del tampone di eluizione (fornito nel kit) raccogliendo opportunamente le frazioni dell'eluato per la determinazione della CDT. Sulla seconda aliquota si procede, previa semplice diluizione con una delle soluzioni fornite nel kit (il tampone usato per l'eluizione della CDT), alla determinazione della transferrina totale.

Dopo aver aggiunto ai campioni la soluzione contenente l'anticorpo anti-transferrina si effettuano due misurazioni a tempi diversi; la prima immediata (bianco) e la seconda a 6 min. Le misurazioni sono condotte per via nefelometrica.

I limiti di confidenza superiori dei valori di % CDT TIA nella popolazione normale corrispondono al 6% della transferrina totale.

Scelta dei soggetti

I 110 soggetti del campione di controllo sono stati reclutati tra donatori di sangue (19 femmine e 91 maschi) di età compresa fra i 20-40 anni, esenti da evidenze cliniche ed anamnestiche di abuso alcolico, i cui valori di GGT e transaminasi sieriche risultavano compresi nell'intervallo normale. Come controlli positivi sono stati utilizzati 18 soggetti alcolisti sulla base di dati clinici (DSM IV) e laboratoristici.

Quaranta soggetti maschi selezionati per un valore elevato di % CDT TIA sono stati controllati mediante CE.

Risultati e discussione

Per quanto riguarda la validazione del metodo, si rimanda alle pubblicazioni specifiche (14, 15).

Il limite di rivelazione (LOD = Limit of Detection) del metodo con un rapporto segnale/rumore di 2 è risultato essere, in termini assoluti, di $6 \pm \text{g/mL}$ e, in termini relativi rispetto alla tetrasialo-transferrina (Tf), di 0.3% per disialo- e trisialo-Tf. Le concentrazioni aspettate, in accordo con quanto riportato in letteratura, sono dell'ordine del 2% e 6% rispettivamente, per la disialo- e la trisialo-Tf e pertanto il metodo proposto è adeguato alla loro determinazione. Nelle condizioni proposte l'asialo-Tf non è invece determinabile nei soggetti normali, dato che la sua concentrazione (0.3%) risulta al limite di sensibilità.

Ai fini della determinazione della precisione analitica è stata valutata la riproducibilità "intra-day" e "day-to-day" dei tempi di migrazione e delle aree dei picchi relativi alle isoforme disialo-, trisialo- e tetrasialo-Tf nelle due condizioni di normalità e di abuso alcolico cronico.

Per la quantificazione si è preferito impiegare un metodo relativo (Tf Index) basato sul rapporto tra l'area del picco delle varie isoforme rispetto a quello della tetrasialo-Tf. Questa scelta è giustificata da un lato, dall'opportunità di evitare il riferimento ad uno standard esterno, dall'altro, dalla possibilità di normalizzare i risultati ottenuti, sulla principale isoforma della transferrina, rendendo dunque indipendente il dato dalla concentrazione totale della proteina.

I valori di riproducibilità sono stati studiati impiegando un siero normale ed un siero con elevate concentrazioni di disialo-Tf. In generale la precisione dei tempi di migrazione era caratterizzata da RSD inferiori allo 0,1%, mentre la precisione quantitativa evidenziava RSD minori o uguali al 10%, sia nei test intra- che inter-day.

I sieri di controllo sono stati analizzati in CE e sui dati ottenuti sono state calcolate media e deviazione standard delle isoforme disialo-Tf e trisialo-Tf, che sono risultate rispettivamente 1,37% (SD 0,45) e 5,63% (SD 1,75). Un tipico esempio di elettroferogramma di un siero normale è mostrato in Fig. 2. I valori di disialo-Tf e di trisialo-Tf nel gruppo di controllo sono del tutto paragonabili a quelli riferiti da Martensson (17) ed ottenuti con un metodo sostanzialmente diverso, basato sulla purificazione dei sieri mediante HPLC e successiva loro determinazione mediante radioimmunoassay.

I livelli delle due glicofornie sono stati studiati anche nel gruppo dei soggetti "positivi" per abuso alcolico cronico, nel quale sono risultati rispettivamente 4,11% (SD 2,13) e 5,71% (SD 2,50). Un tipico esempio di elettroferogramma di un siero di soggetto con chiare evidenze abuso alcolico è mostrato in Fig. 3. In tre casi, che presentavano livelli particolarmente elevati di disialo-Tf, sono stati identificati picchi corrispondenti, sulla base del tempo di migrazione relativo, all'asialo-Tf.

Un paragone statistico tra i due gruppi ha mostrato una differenza altamente significativa ($p < 0.001$) per quanto riguarda la disialo-Tf mentre i livelli di trisialo-Tf erano sostanzialmente immutati. Impiegando un livello di cut-off pari alla media dei controlli + 2 deviazioni standard (cioè 2.27%) 15 su 18 soggetti risultavano correttamente identificati sulla base delle percentuali di disialo-Tf. Non è stata invece evidenziata correlazione significativa ($R^2 = 0.014$) tra le concentrazioni di disialo-Tf e trisialo-Tf. Questo dunque depone per una irrilevanza della trisialo-Tf nella diagnosi di abuso alcolico cronico, come peraltro è già segnalato in letteratura.

Dati particolarmente interessanti sono stati evidenziati dal paragone dei risultati ottenuti mediante % CDT TIA e CE nel gruppo di soggetti selezionati per elevati valori di CDT all'immunoassay (% CDT TIA > 6.0) e quindi identificabili su questa base come abusatori di alcool. È risultato che una sostanziosa percentuale di questi soggetti (25-30%) mostrava livelli di disialo-Tf, analizzati mediante CE, entro i limiti di confidenza normali. La grande maggioranza di questi casi (73%) presentava valori di trisialo-Tf elevati (Fig. 4), che pertanto possono essere indicati come origine dei risultati falsamente positivi all'immunoassay. Altri, per quanto rari, casi erroneamente positivi all'immunoassay erano dovuti alla presenza di varianti D della transferrina (Fig. 5).

Conclusioni

L'importanza di una "certezza diagnostica" nell'identificazione dell'abuso alcolico è un'esigenza irrinunciabile non solo in ambito medico-legale, ma anche da un punto di vista clinico e terapeutico.

Mentre la diagnostica dell'intossicazione acuta è stata tradizionalmente impostata su parametri oggettivi (determinazione dell'alcoolemia), la diagnosi dell'abuso cronico si basa tuttora su criteri clinici e su indici biochimici indiretti, caratterizzati da bassa sensibilità e specificità.

L'introduzione di un marker specificamente correlato all'abuso cronico o comunque ripetuto di alcool, quale la CDT può portare anche in questo ambito quegli elementi di oggettività assolutamente necessari, considerate le ripercussioni che tale diagnosi comporta per l'individuo.

La determinazione di questo analita deve tuttavia soddisfare i criteri di accuratezza che la moderna tossicologia analitica richiede, primo fra questi la possibilità di analisi quantitativa con almeno due metodi basati su principi chimico-fisici diversi. L'elettroforesi capillare a questo riguardo sembra offrire un ideale metodo di conferma delle tecniche comunemente usate nei laboratori chimico - clinici e tossicologici, basate su metodi immunometrici.

Riassunto

Il presente lavoro riassume i principali markers di abuso alcolico cronico attualmente utilizzati con particolare riferimento ad un nuovo indicatore, noto come carbohydrate deficient transferrin (CDT) dotato di elevata sensibilità e specificità.

Sono brevemente discussi i metodi per la sua determinazione ed è presentato un metodo originale basato sull'elettroforesi capillare che permette l'analisi diretta del siero. Tale metodo è proposto e sperimentato come conferma strumentale delle determinazioni della CDT mediante tecniche immunometriche.

Summary

The present work reports a short review of the most important biochemical markers of chronic alcohol abuse with a particular attention paid to carbohydrate deficient transferrin (CDT), which according to the literature is characterized by high sensitivity and specificity.

The paper describes an original method based onto capillary electrophoresis for CDT determination, which allows the direct analysis of human sera. This method is compared to the most common routine methods in terms of accuracy and is proposed as a confirmatory technique for CDT routine analysis.

Bibliografia

1. Tagliaro F., Lubli G., Ghielmi S., Franchi D., Marigo M., *Methods for chromatographic blood alcohol analysis*, J. Chromatogr. 580, 161, 1992.
2. Rosalki S.B., *Biochemical identification of alcohol abuse*, Int. J. Clin. Pract. 53, 138, 1999.
3. Musshof F., Daldrup T., *Determination of biological markers for alcohol abuse*. J. Chromatogr. B 713, 245, 1998.
4. Stibler H., *Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed*, Clin. Chem. 37, 2029, 1991.
5. Xin Y., Lasker J.M., Lieber C.S., *Serum carbohydrate-deficient transferrin: mechanism of increase after chronic alcohol intake*, Hepatology 22, 1462, 1995.
6. Helander H., Jones A.W., *Biochemical tests for acute and chronic alcohol ingestion*, in: Karch S.B. (ed.), Drug Abuse Handbook, CRC Press, Boca Raton, FL, 1998, p. 374.
7. Tagliaro F., Bortolotti F., Crivellente F., Cittadini F., *Objective diagnosis of chronic alcohol abuse – determination of carbohydrate deficient transferrin (CDT) with capillary electrophoresis*, Forensic Sci. Rev. 12, 133, 2000.
8. Jeppsson J.O., Kristensson H., Fimiani C., *Carbohydrate-deficient transferrin quantitated by HPLC to determine heavy consumption of alcohol*, Clin. Chem. 39, 2115, 1993.
9. Righetti P.G. (ed), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1996; 1996.
10. Kilar F., Hjerten S., *Separation of the human transferrin isoforms by carrier-free high-performance zone electrophoresis and isoelectric focusing*, J. Chromatogr. 480, 351, 1989.
11. Oda R.P., Landers J.P., *Effect of cationic buffer additives on the capillary electrophoretic separation of serum transferrin from different species*, Electrophoresis 17, 431, 1996.
12. Oda R.P., Prasad R., Stout R.L., Coffin D., Patton W.P., Kraft D.L., O'Brien J.F., Landers J.P., *Capillary electrophoresis based separation of transferrin sialoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome*, Electrophoresis 18, 1819, 1997.
13. Prasad R., Stout R.L., Coffin D., Smith J., *Analysis of carbohydrate deficient transferrin by capillary zone electrophoresis*, Electrophoresis 18, 1814, 1997.
14. 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 19, 3033, 1998.
15. Crivellente F., Fracasso G., Valentini R., Manetto G., Riviera A., Tagliaro F., *Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. B, 739, 81, 2000.

Fig 1. Rappresentazione della struttura della transferrina

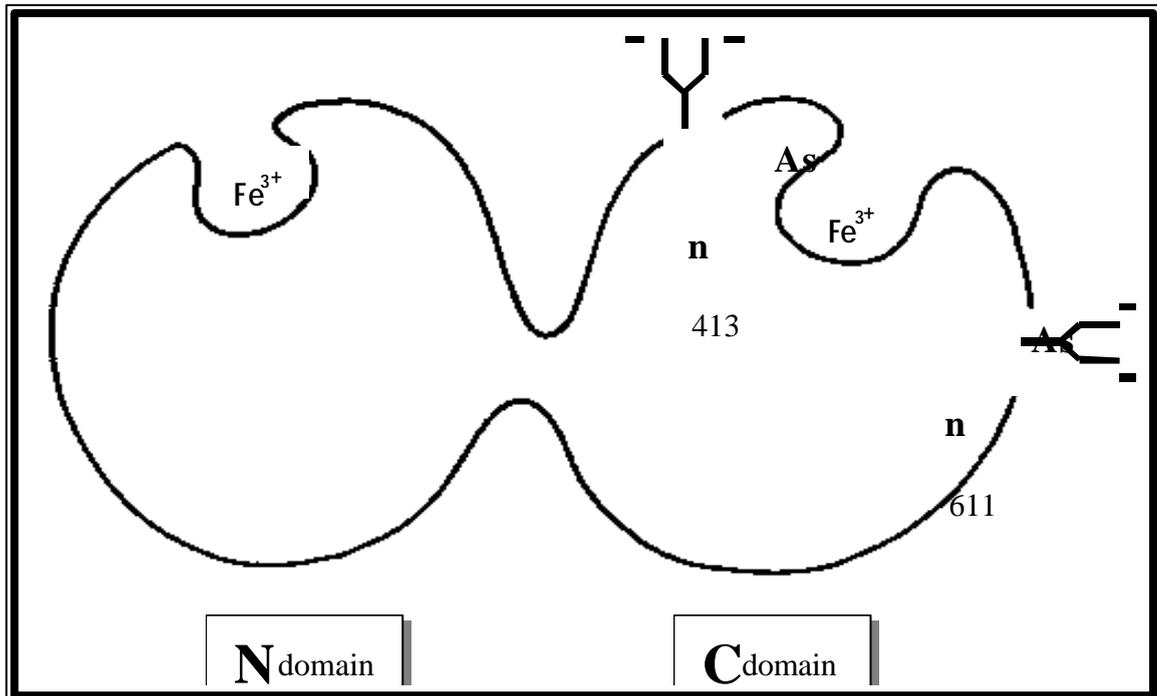


Fig. 2. Elettroferogramma di un siero normale (disialo-Tf: 1,07%; trisialo-Tf: 3,64%). Condizioni analitiche: tampone sodio tetraborato 100mM, DAB 3mM, pH 8.3; rivelazione UV a 200 nm, temperatura: 25° C, voltaggio: 20 kV, polarità diretta, iniezione per pressione (0.5 p.s.i.) per 20 s.

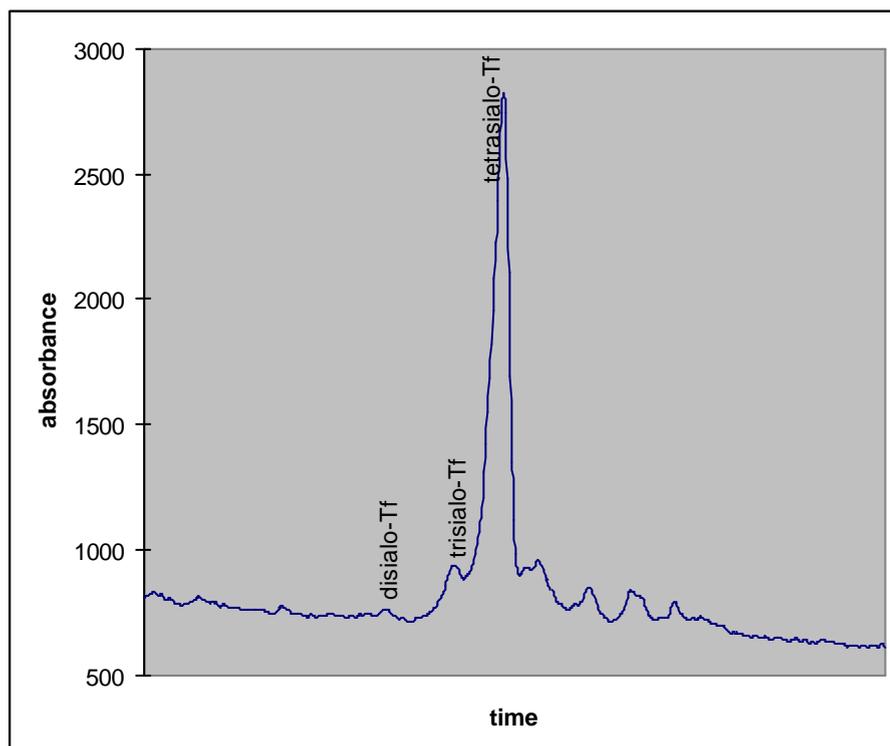


Fig. 3. Elettroferogramma di un siero di soggetto con evidenze di abuso alcolico cronico (disialo-Tf: 4,96%; trisialo-Tf: 0,80%). Condizioni analitiche: come in Fig. 2.

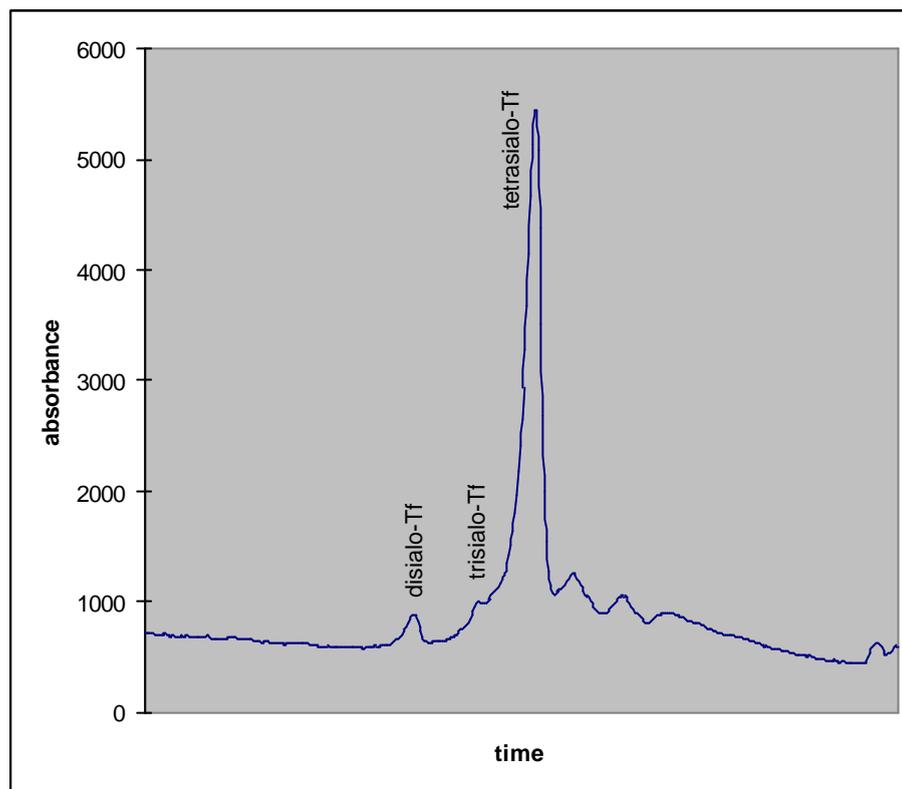


Fig. 4. Tipico elettroferogramma di un siero di soggetto risultato falsamente "CDT positivo" all'immunoassay, per la presenza di incremento della trisialo-Tf non correlata al consumo alcolico (disialo-Tf: 1,64%; trisialo-Tf: 13,21%). Condizioni analitiche: come in Fig. 2.

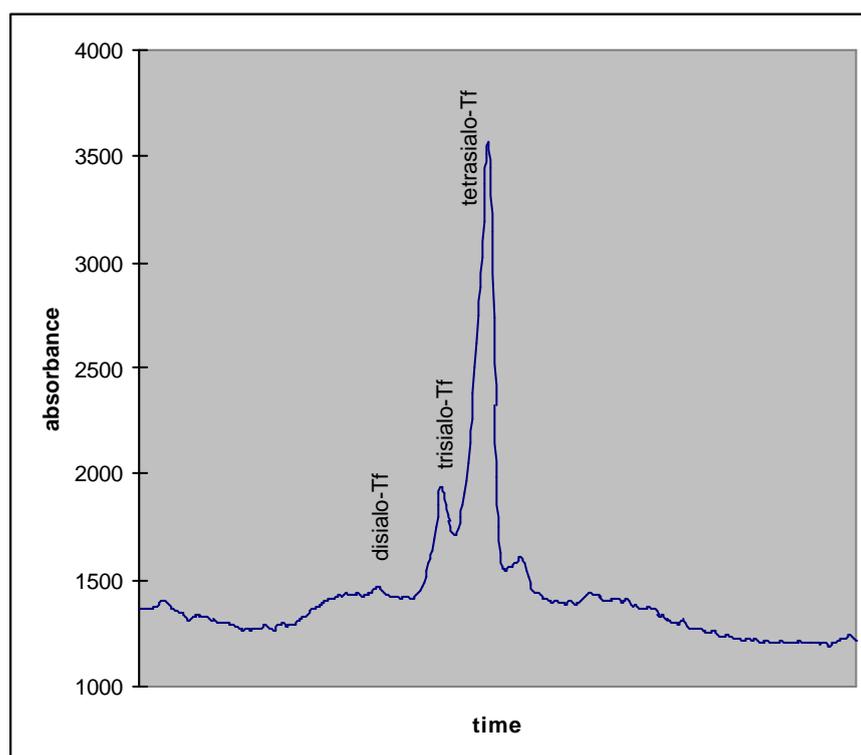


Fig. 5. Elettroferogramma di un siero di soggetto risultato falsamente “CDT positivo” all’immunoassay per la presenza di una variante genetica della Tf in forma eterozigote.

Condizioni analitiche: come in Fig. 2.

