

Validazione del P/ace CDT conf. kit

Metodica in elettroforesi capillare per la determinazione della
Carbohydrate Deficient Transferrin

Sebastiano Di Biase, Vittorio Salotti, Nicolo' Di Pietro : GeneDia srl Lammari (Lu)

Introduzione

La determinazione del **consumo alcolico cronico** è di notevole importanza sia livello clinico che in ambito medico legale. In particolare la "traffic medicine" è sempre più attenta, nella valutazione della idoneità alla patente di guida, alla identificazione dell'abuso alcolico. Pertanto molto attuale è la ricerca di nuovi marker specifici, accurati e sensibili per la determinazione di tale conduzione, anche considerando i limiti in termini di sensibilità e/o specificità di quelli tradizionali (GGT, MCV, AST, ALT, HDL colesterolo ecc.).

La "**Carbohydrate Deficient Transferrin**" (CDT) è attualmente riferita come il marker più accreditato per la diagnosi oggettiva dell'abuso alcolico cronico. Una buona sensibilità (80-90%) ed una eccellente specificità (90-100%) sono le caratteristiche rilevanti di tale indicatore [Stibler, 1991]. Una vasta letteratura dimostrano che l'assunzione per circa una due settimane di almeno 50-60 g di alcool./die determina un significativo aumento della concentrazione di disialotransferrina. I valori di disialotransferrina tornano alla norma, a seguito di astinenza alcolica con una emivita di circa 15 giorni..

La CDT indica un gruppo di isoforme della transferrina sierica, la principale glicoproteina trasportatrice di Fe^{3+} . Questa proteina presenta differenti stati di glicosilazione per la presenza di catene complesse oligosaccaridiche su due siti in corrispondenza dei residui di asparagina 413 e 611. Su tali catene possono essere presenti da zero ad otto residui di acido sialico. La maggior isoforma tetrasialo Tf circa 90% contiene quattro residui di acido sialico. Come conseguenza di abuso alcolico cronico si ha un incremento di isoforme meno glicosilate (soprattutto asialo e disialo Tf) che sono comunemente indicate come **CDT**.

L'esatto meccanismo di tale fenomeno non è stato ancora chiarito: l'ipotesi più accreditata riguarda l'inibizione dell'enzima di glicosilazione ad opera della acetaldeide (il maggior catabolita dell'etanolo).

Le attuali procedure analitiche, per la determinazione della CDT, prevedono una separazione delle isoforme della transferrina mediante tecniche cromatografiche come la cromatografia a scambio anionico, il cromatofocusing e la rivelazione mediante saggi immunoenzimatici.

Altri metodi si basano sulla focalizzazione iso elettrica /immunoblotting e sulla cromatografia liquida ad elevata risoluzione.

I kit commerciali, attualmente in uso, prevedono una separazione mediante colonnine monouso delle isoforme desialate; le frazioni ottenute vengono successivamente determinate con saggi immunometrici.

Tali metodiche tuttavia mostrano carenze di selettività e riproducibilità dovute sia al processo separativo manuale che alla bassa specificità del legame dell'antisiero verso le isoforme della transferrina.

I limiti dei saggi immunoenzimatici impongono la conferma dei risultati con un metodiche alternative non correlabili dal punto di vista analitico.

Questa necessità è particolarmente stringente in ambito Medico Legale.

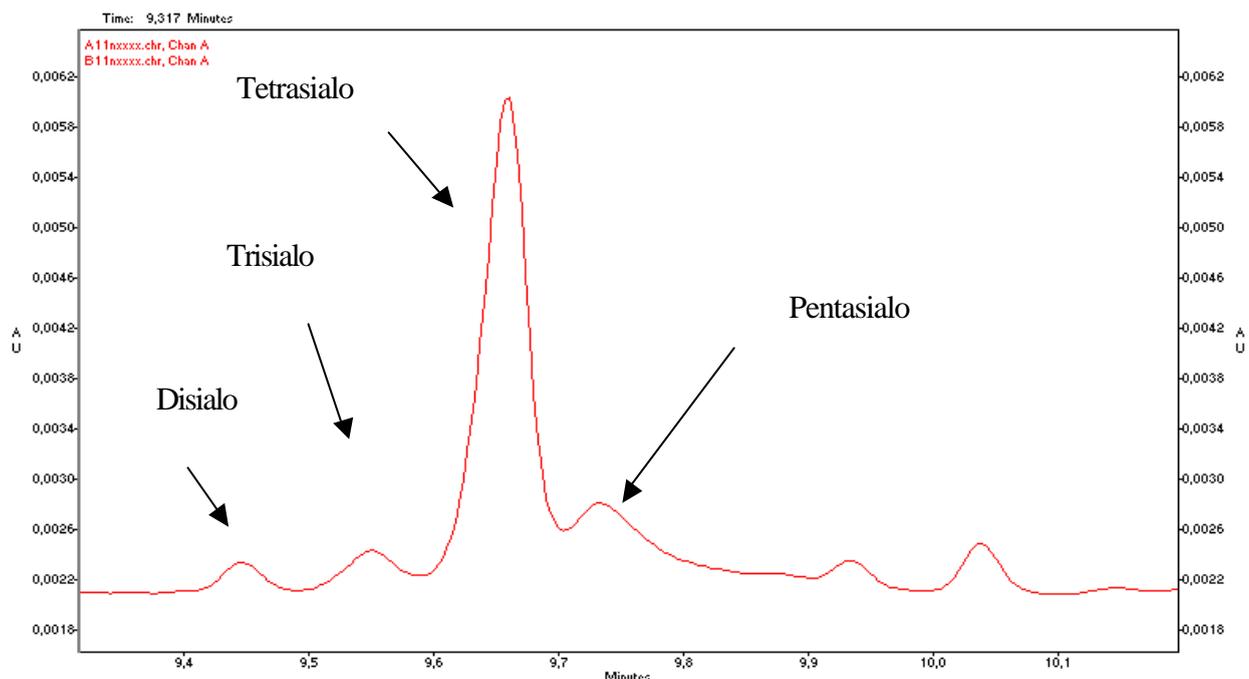
Recentemente l'uso di tecniche elettroforetiche come l'elettroforesi capillare consentono di separare e rivelare direttamente le singole isoforme superando i limiti delle attuali metodiche immunometriche.

Partendo da questi presupposti si è proceduto allo sviluppo di un kit commerciale (P/ace **CDT** conf. kit) che garantisca una elevata sensibilità e specificità limitando al massimo il trattamento del campione biologico.

Onde verificarne la performance analitica della metodica proposta, ed in particolare la sua robustezza, si è proceduto ad una validazione rigorosa del kit, allestendo prove di riproducibilità ed accuratezza utilizzando due strumenti di elettroforesi capillare P/ace serie 5000 e MDQ. Le sedute analitiche sono state eseguite in tempi diversi e con diversi operatori.

La fig. 1 mostra la separazione di siero ottenuta con il kit proposto, dove si evince una netta separazione delle forme disialo, trisialo e tetrasialo Tf, dimostrando l'elevata selettività analitica.

Elettroferogramma di sialo transferrina

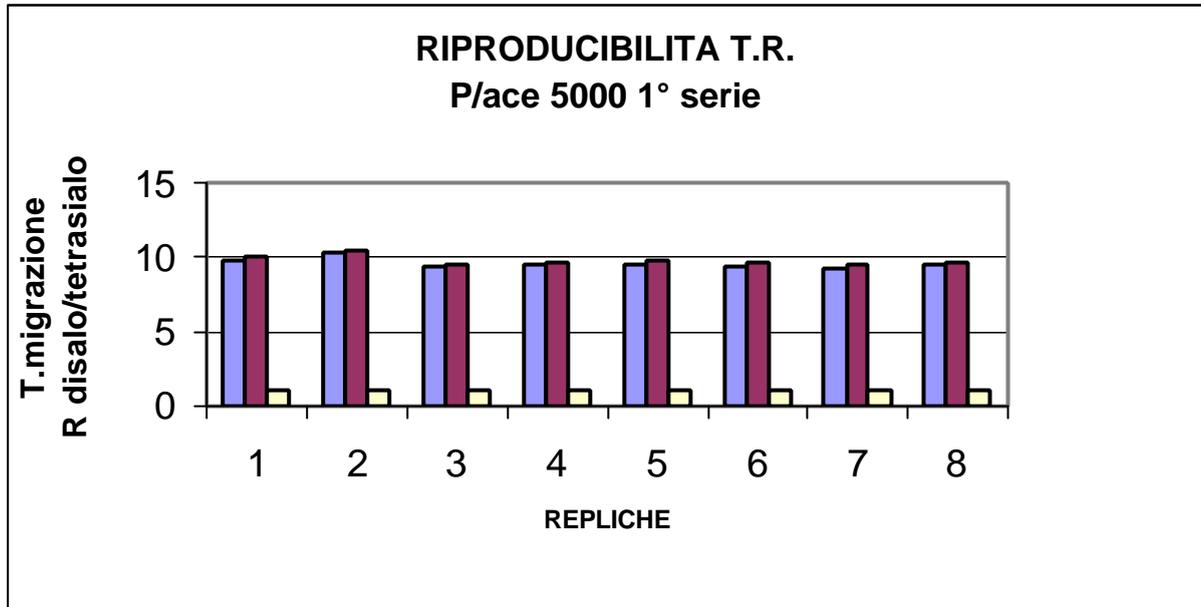


I test di riproducibilità sono stati eseguiti utilizzando sieri con una percentuale di CDT compresa tra 1% e 6%, mentre per le prove di accuratezza sono state effettuate con due sieri con contenuto di CDT compreso tra 5% e il 6%.

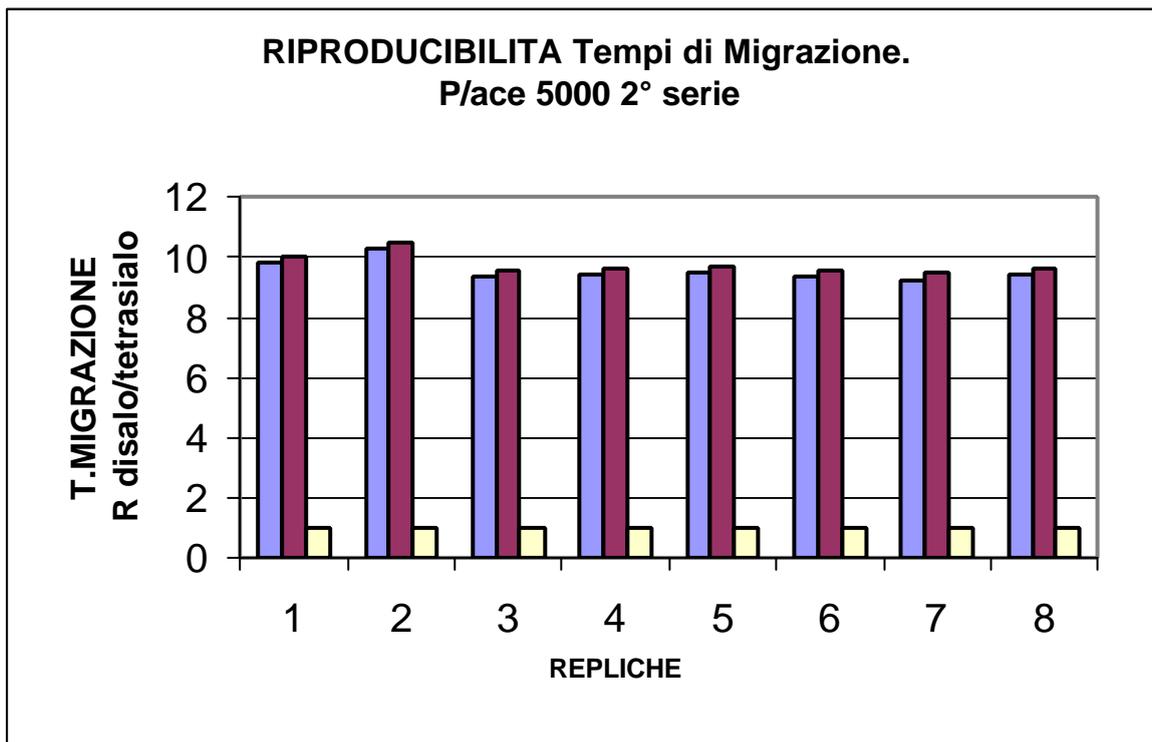
Riproducibilità dei tempi di ritenzione della disialo e tetrasialo transferrina.

Le tabelle mostrano la media dei tempi di migrazione assoluti della disialo e della tetrasialo, le corrispondenti deviazioni standard e la media del tempo di migrazione relativo della disialo rispetto alla tetrasialo. I dati sono stati ottenuti da quattro serie di esperimenti condotti con le diverse strumentazioni, adottando le medesime condizioni analitiche e la medesima procedura sperimentale.

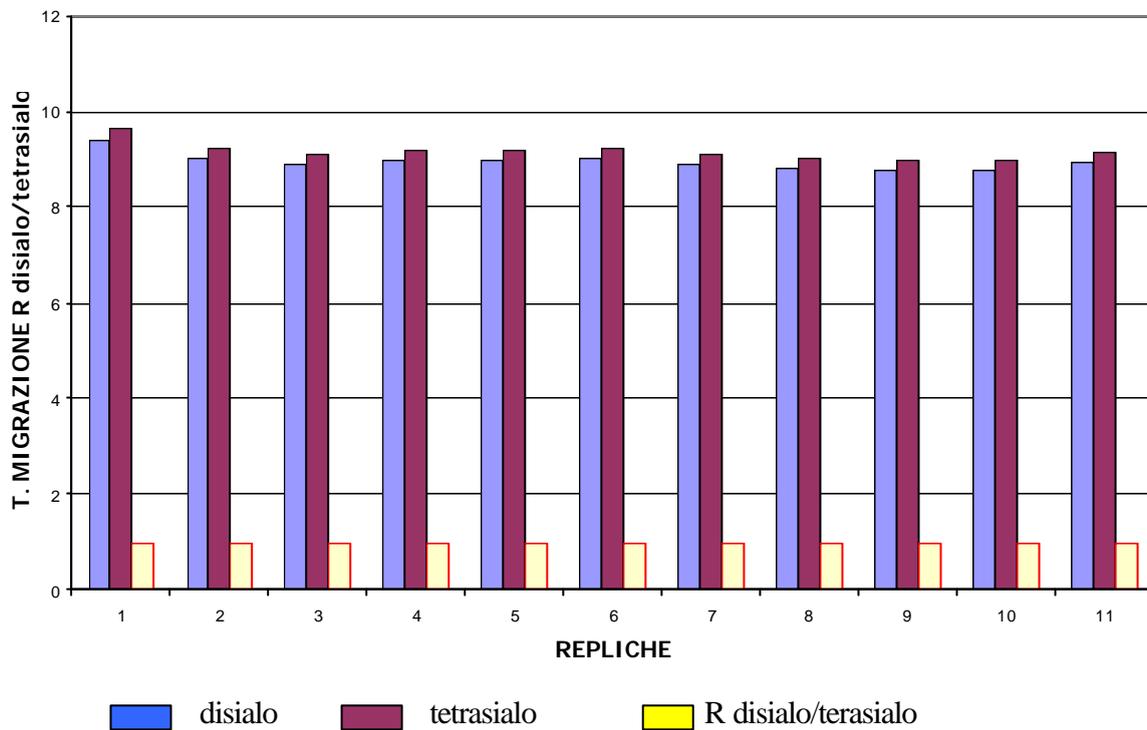
I dati ottenuti indicano una elevata riproducibilità dei tempi di migrazione con deviazioni standard comprese tra 0.33 e 0.17 . La disialo presenta un tempo di migrazione relativo di **0.975-0.976** . Sulla base delle condizioni analitiche adottate (capillare, tamponer di migrazione, soluzione stabilizzante ed attivante) i dati ottenuti dimostrano elevate prestazioni in termine di riproducibilità ed accuratezza analitica.



■ disialo
 ■ tetrasialo
 ■ R disialo/tetrasialo



RIPRODUCIBILITA' Tempi di Migrazione.
P/ace MDQ 2° seire



RIPRODUCIBILITA' Tempi di Migrazione
P/ace MDQ 1° serie

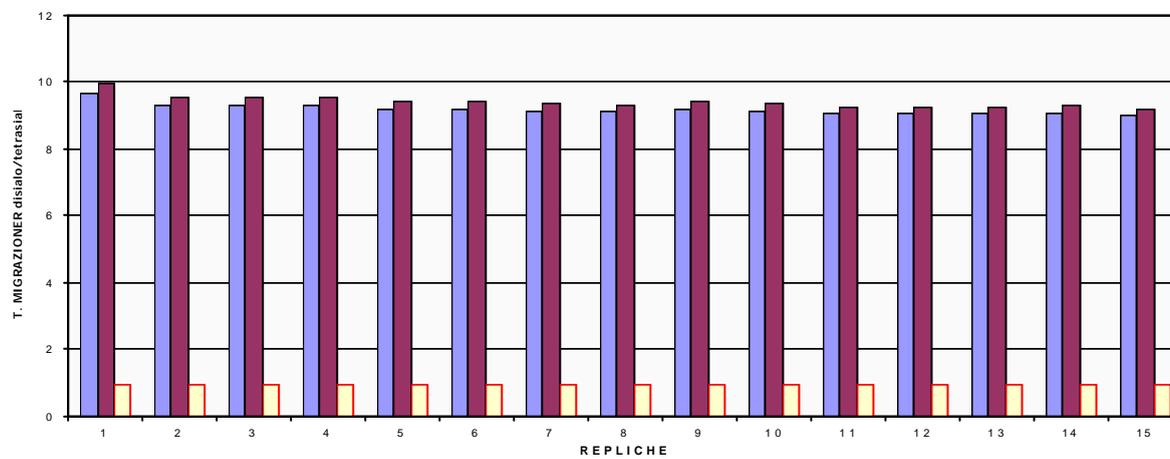


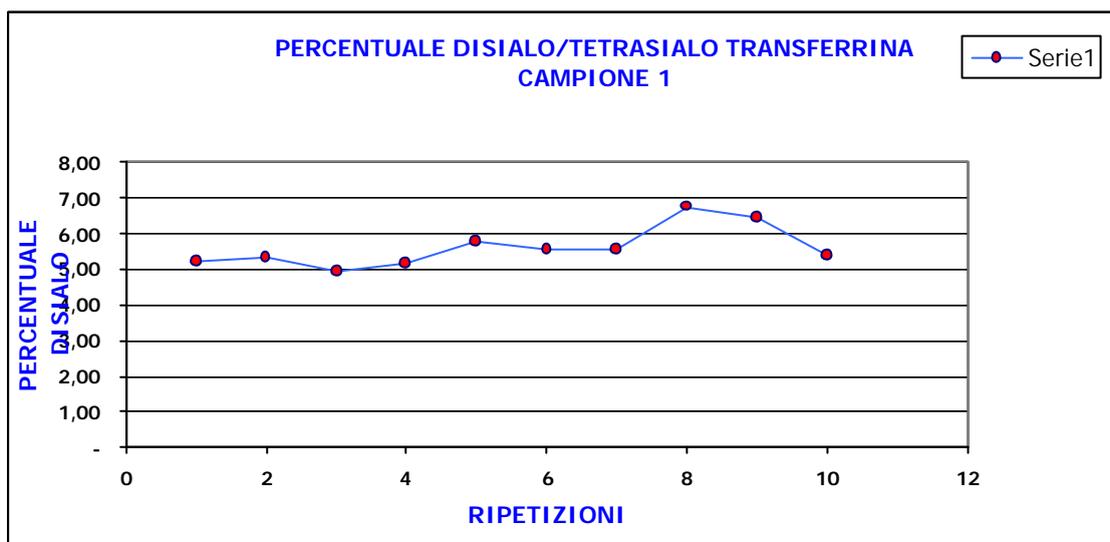
Tabella riassuntiva riproducibilità tempi di ritenzione con relative medie e deviazioni standard

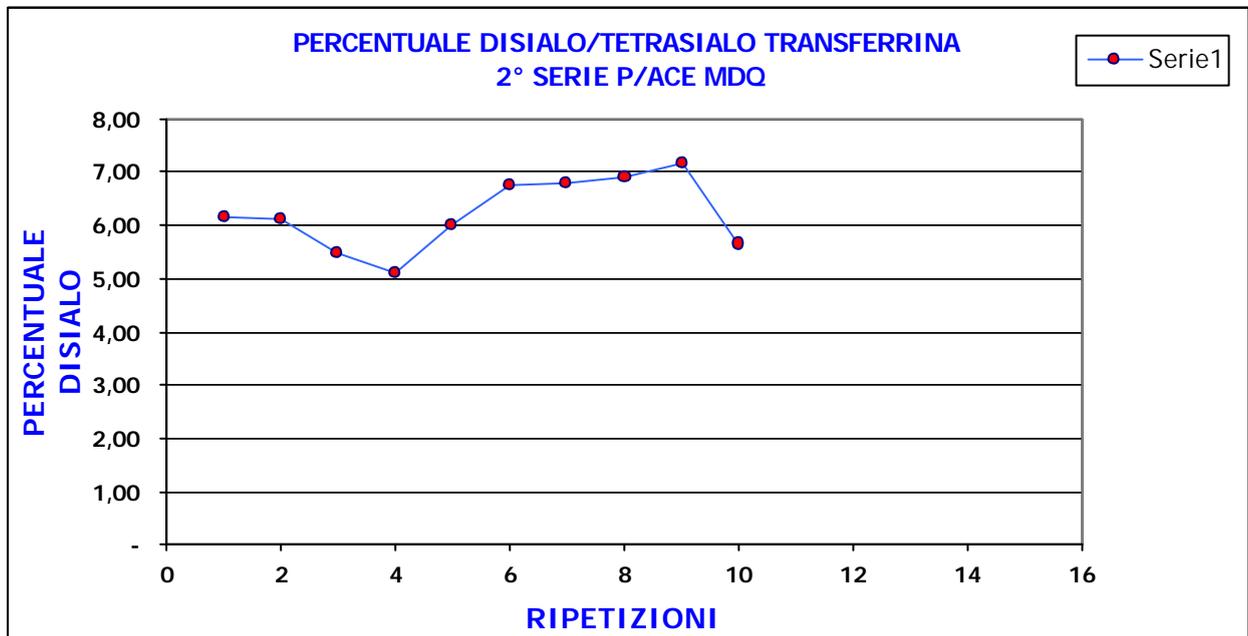
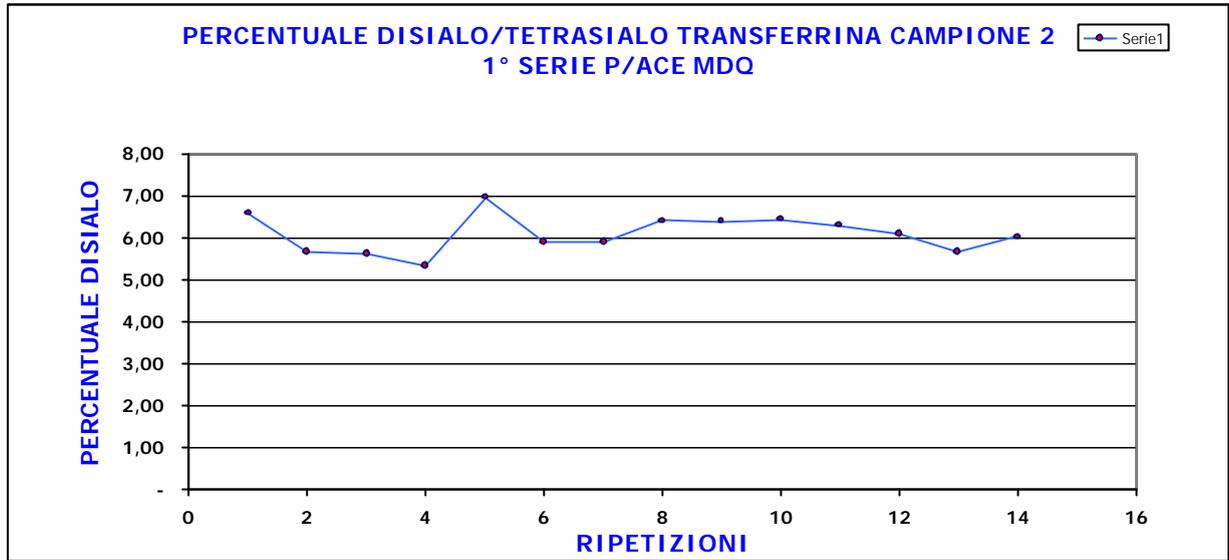
	1°Serie P/ace 5000	2°Serie P/ace 5000	1°Serie P/ace MDQ	1°Serie P/ace MDQ
Media T.R. disialo	9.54	9.68	9.18	8.95
Media T.R. tetrasialo	9.77	9.88	9.41	9.16
Dev.Stan. disialo	0.33	0.28	0.17	0.17
Dev. Stan. tetrasialo	0.34	0.30	0.18	0.18
R disialo /tetrasialo	0.976	0.975	0.975	0.976

Riproducibilità quantitativa della CDT.

La verifica di riproducibilità ed accuratezza in termini quantitativi viene dimostrata dalle tabelle riportate, dalle quali si evince altresì una notevole precisione strumentale . Sono state eseguite 34 analisi su due campioni in tre sedute con differente strumentazione. Tutti i campioni hanno subito l'intero percorso analitico .

	n° Campioni	Media% disialo	Dev. Standard
Campioni 1	10	5.61	0.57
Campione 2	10	6.21	0.68
Campione 2	14	6.1	0.45

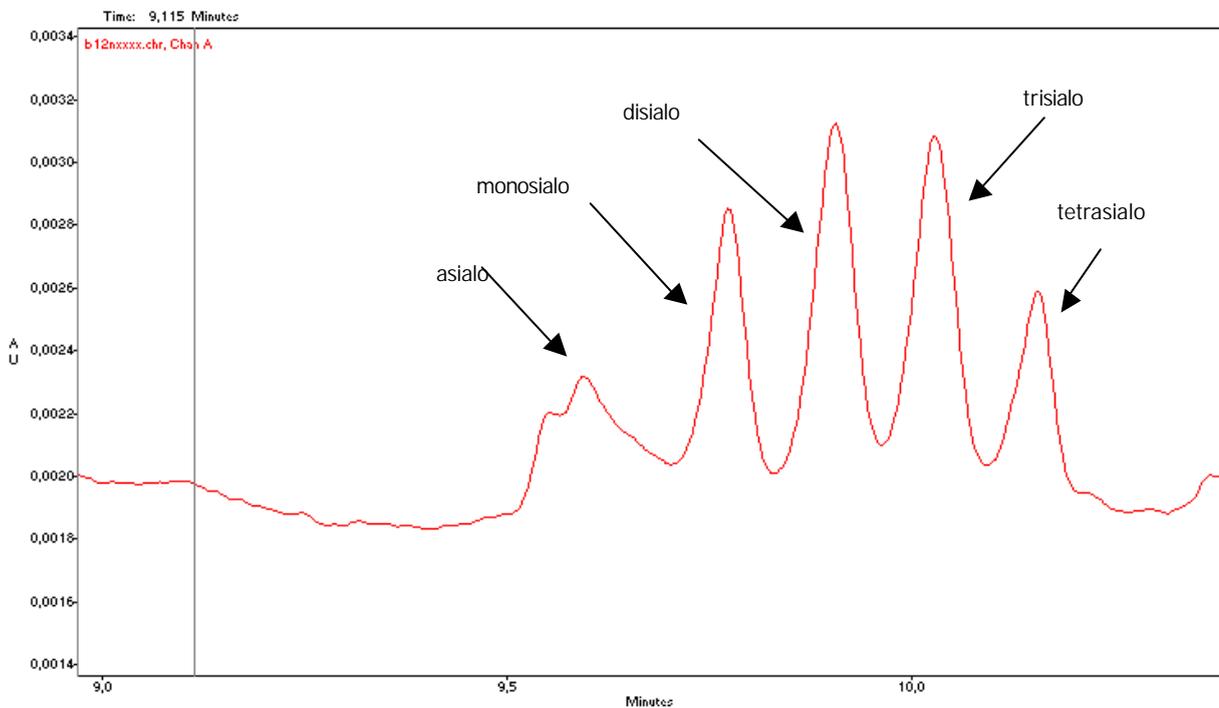




Verifica della specificità

Per verificare la specificità della metodica si è proceduto ad una idrolisi enzimatica dei residui di acido sialico ad opera della neuroamidasi, su un campione di tetrasialtostranferina producendo frazioni di sialotranferina. Il campione così trattato è stato processato in elettroforesi capillare onde verificare la comparsa delle sialoforme.

La figura n° 2 mostra il tracciato ottenuto confermando la specificità analitica.



Conclusioni

La presente validazione dimostra la specificità, ed accuratezza del **P/ace CDT Conf. kit** nella determinazione delle componenti principali della CDT nel siero umano.

REFERENZE

- Tagliaro F., Crivellante 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
- Crivellante F., Fracasso G., Valentini R., Manetto G., Riviera A., Tagliaro F.: Improved method for carbohydrate deficient transferrin in human serum by capillary zone electrophoresis. *J. of Chromatography*
- Allen JP, Litten RZ, Anton RF, Cross GM: Carbohydrate-deficient transferrin as a measure of immoderate drinking: Remaining issues. *Alcohol Clin Exp Res* 18, 799-812 (1994).
- Anton RF, Moak DH: Carbohydrate-deficient transferrin and -glutamyltransferase as markers of heavy alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 18/3, 747-754 (1994).
- Anton R, Bean P: Two methods for measuring carbohydrate-deficient transferrin in inpatient alcoholics and healthy controls compared. *Clin Chem* 40/3, 364-368 (1994).
- Behrens U, Worner TM, Braly LF et al: Carbohydrate-deficient Transferrin, a Marker for Chronic Alcohol Consumption in Different Ethnic Populations. *Alcohol Clin Exp Res* 12, 427-432 (1988).
- Behrens UJ, Worner TM, Lieber CS: Changes in Carbohydrate-Deficient Transferrin levels after alcohol withdrawal. *Alcohol Clin Exp Res* 12, 539-542 (1988).
- Bell H, Tallaksen C, Sjahem T, Weberg R et al: Serum carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol consumption in patients with chronic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 17/2, 246-252 (1993).
- Bell H, Tallaksen CME, Try K, Haug E: Carbohydrate-deficient transferrin and other markers of high alcohol consumption: A study of 502 patients admitted consecutively to a medical department. *Alcohol Clin Exp Res* 18, 1103-1108 (1994).
- Bell H, Tallaksen CCM, Haug E, Try K: A comparison between two commercial methods for determining carbohydrate deficient transferrin (CDT). *Scand J Clin Lab Invest* 54, 453-457 (1994)
- Crow KE, Batt RD (ed): Human metabolism of alcohol. Vol I: Pharmacokinetics, medicolegal aspects and general interest. Vol II: Regulation, enzymology and metabolites of ethanol. Vol III: Metabolic and physiological effects of alcohol. CRC Press, Boca Raton, Florida, (1989).
- Gilg T, Weidinger S, Josephi E, Tutsch-Bauer E, vMeyer L, Bieger WP: Bestimmung von CDT (Carbohydrate Deficient Transferrin), -GT, Methanol, Isopropanol und Ethanol in forensischen Blutproben zur Beurteilung chronischen Alkoholmißbrauchs. *Lab Med* 18, 143-153 (1994)
- Gjerde H, Johnsen J, Bjoerneboe GE, Moerland J: A comparison of serum carbohydrate-deficient transferrin with other biological markers of excessive drinking. *Scand J Clin Lab Invest* 48, 1-6 (1988).
- Kranzler HR (editor): The pharmacology of alcohol abuse. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg New York, (1995).
- LaGrange L, Anton RF, Garcia S, Herrbold C: Carbohydrate-deficient transferrin levels in a female population. *Alcohol Clin Exp Res* 19/1, 100-103 (1995).
- Salmela KS, Laitinen K, Nyström M, Salaspuro M: Carbohydrate-deficient transferrin during 3 weeks' heavy alcohol consumption. *Alcohol Clin Exper Res* 18/2, 228-230 (1994).
- Sillanaukee P, Seppä K, Lof K, Koivula T: CDT by anion-exchange chromatography followed by RIA as a marker of heavy drinking among men. *Alcohol Clin Exp Res* 17, 230-233 (1993).

Stibler H: Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 37,2029-2037 (1991).

Watson RR (ed.): *Diagnosis of alcohol abuse*. CRC Press, Boca Raton, Florida (1989)

Xin Y, Rosman AS, Lasker JM, Lieber CS: Measurement of carbohydrate-deficient transferrin by isoelectric focusing/western blotting and by micro anion-exchange chromatography/radioimmunoassay: comparison of diagnostic accuracy. *Alcohol Alcohol* 27,425-433 (1992).

Yamauchi M, Hirakawa J, Maezawa Y et al: Serum level of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol Suppl* 1B,3-8 (1993).