



*Azienda Ospedaliera Nazionale
SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo
Alessandria*

Working Paper of Public Health

Nr. 09/2014



La serie di *Working Paper of Public Health* (WP) dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria è una serie di pubblicazioni *online* ed *Open Access*, *progressiva* e *multi disciplinare* in *Public Health* (ISSN: 2279-9761). Vi rientrano pertanto sia contributi di medicina ed epidemiologia, sia contributi di economia sanitaria e management, etica e diritto. Rientra nella politica aziendale tutto quello che può proteggere e migliorare la salute della comunità attraverso l'educazione e la promozione di stili di vita, così come la prevenzione di malattie ed infezioni, nonché il miglioramento dell'assistenza (sia medica sia infermieristica) e della cura del paziente. Si prefigge quindi l'obiettivo scientifico di migliorare lo stato di salute degli individui e/o pazienti, sia attraverso la prevenzione di quanto potrebbe condizionarla sia mediante l'assistenza medica e/o infermieristica finalizzata al ripristino della stessa.

Gli articoli pubblicati impegnano esclusivamente gli autori, le opinioni espresse non implicano alcuna responsabilità da parte dell'Azienda Ospedaliera "SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo" di Alessandria.

La pubblicazione è presente in: [Directory of Open Access Journals \(DOAJ\)](#); [Google Scholar](#); [Academic Journals Database](#);

Comitato Scientifico:

Dr. Nicola Giorgione (Presidente)

Dr. Luciano Bernini (Vice-Presidente)

Dr. Francesco Arena

Dr. Massimo Desperati

Dr. Carlo Arfini

Dr. Ivo Casagrande

Dr. Gabriele Ferretti

Dr.ssa Lorella Gambarini

Dr. Francesco Musante

Dr. Claudio Pesce

Dr. Fernando Pesce

Dr. Salvatore Petrozzino

Dr. Giuseppe Spinoglio

Comitato di Direzione:

Dr. Antonio Maconi

Dr. Ennio Piantato

Responsabile:

Dr. Antonio Maconi

telefono: +39.0131.206818

email: amaconi@ospedale.al.it

Segreteria:

Roberto Ippoliti, Ph.D.

telefono: +39.0131.206819

email: rippoliti@ospedale.al.it

Norme editoriali:

Le pubblicazioni potranno essere sia in lingua italiana sia in lingua inglese, a discrezione dell'autore. Sarà garantita la sottomissione di manoscritti a tutti coloro che desiderano pubblicare un proprio lavoro scientifico nella serie di WP dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria, purché rientrino nelle linee guida editoriali. Il Responsabile Scientifico di redazione verificherà che gli articoli sottomessi rispondano ai criteri editoriali richiesti. Nel caso in cui lo si ritenga necessario, lo stesso Responsabile valuterà l'opportunità o meno di una revisione a studiosi o ad altri esperti, che potrebbero o meno aver già espresso la loro disponibilità ad essere revisori per il WP (i.e. *peer*

review). L'utilizzo del *peer review* costringerà gli autori ad adeguarsi ai migliori *standard* di qualità della loro disciplina, così come ai requisiti specifici del WP. Con questo approccio, si sottopone il lavoro o le idee di un autore allo scrutinio di uno o più esperti del medesimo settore. Ognuno di questi esperti fornirà una propria valutazione, includendo anche suggerimenti per l'eventuale miglioramento, all'autore, così come una raccomandazione esplicita al Responsabile Scientifico su cosa fare del manoscritto (i.e. *accepted* o *rejected*).

Al fine di rispettare criteri di scientificità nel lavoro proposto, la revisione sarà anonima, così come l'articolo revisionato (i.e. *double blinded*).

Diritto di critica:

Eventuali osservazioni e suggerimenti a quanto pubblicato, dopo opportuna valutazione di attinenza, sarà trasmessa agli autori e pubblicata *on line* in apposita sezione ad essa dedicata.

Questa iniziativa assume importanza nel confronto scientifico poiché stimola la dialettica e arricchisce il dibattito su temi d'interesse. Ciascun professionista avrà il diritto di sostenere, con argomentazioni, la validità delle proprie osservazioni rispetto ai lavori pubblicati sui Working Paper of Public Health.

Nel dettaglio, le norme a cui gli autori devono attenersi sono le seguenti:

- I manoscritti devono essere inviati alla Segreteria esclusivamente in formato elettronico all'indirizzo e-mail dedicato (i.e. rippoliti@ospedale.al.it);
- A discrezione degli autori, gli articoli possono essere in lingua italiana o inglese. Nel caso in cui il manoscritto è in lingua italiana, è possibile accompagnare il testo con due riassunti: uno in inglese ed uno in italiano, così come il titolo;
- Ogni articolo deve indicare, se applicabile, i codici di classificazione JEL (scaricabili al sito: http://www.econlit.org/subject_descriptors.html) e le Keywords, nonché il tipo di articolo (i.e. Original Articles, Brief Reports oppure Research Reviews);
- L'abstract è il riassunto dell'articolo proposto, pertanto dovrà indicare chiaramente: Obiettivi; Metodologia; Risultati; Conclusioni;
- Gli articoli dovrebbero rispettare i seguenti formati: *Original Articles* (4000 parole max., abstract 180 parole max., 40 references max.); *Brief Reports* (2000 parole max., abstract 120 parole max., 20 references max., 2 tabelle o figure) oppure *Research Reviews* (3500-5000 parole, fino a 60 references e 6 tabelle e figure);
- I testi vanno inviati in formato Word (Times New Roman, 12, interlinea 1.5). Le note, che vanno battute in apice, non possono contenere esclusivamente riferimenti bibliografici. Inoltre, la numerazione deve essere progressiva;
- I riferimenti bibliografici vanno inseriti nel testo riportando il cognome dell'Autore e l'anno di pubblicazione (e.g. Calabresi, 1969). Nel caso di più Autori, indicare nel testo il cognome del primo aggiungendo *et al*; tutti gli altri Autori verranno citati nei riferimenti bibliografici alla fine del testo.
- I riferimenti bibliografici vanno elencati alla fine del testo in ordine alfabetico (e cronologico per più opere dello stesso Autore).

Nel sottomettere un manoscritto alla segreteria di redazione, l'autore accetta tutte le norme qui indicate.



Titolo: Transferrina-Carboidrato carente (CDT): Updating sul marcatore biochimico più studiato ed utilizzato in ambito alcologico.

Autore: Bianchi V.¹

Tipo: Articolo Originale

Keywords: Alcohol abuse, Carbohydrate deficient Transferrin, CDT, biomarker;

Abstract

Alcohol use and abuse is an important issue and a social problem potentially leading to isolation, physical consequences and several pathologies. Alcohol intoxication is correlated to accidents, injuries and violence. Developing effective strategies to prevent, diagnose and cure alcohol abuse is a priority.

Carbohydrate deficient transferrin (CDT) is the most specific biomarker of alcohol abuse. In this review biochemistry, metabolism and definition are shown.

It is not completely clear how alcohol interferes with the glycosation of transferrin. With the same intake of alcohol different people have different concentration of CDT. Disialotransferrin is the analyte target for CDT and it should be expressed as percentage of the total transferrin.

There are several applications of CDT in hospital, in rehabilitation and in forensic setting when it is important to identify the alcohol exposure and evaluate the treatment efforts. Serum, collected with chain of custody is the best biological material to use. CDT concentration is not significantly modified if the sample is stored in a refrigerator for several weeks. The reference method to measure CDT is HPLC, but there is also a commercial kit for HPLC and CZE. An immunoassay is available, totally automated without preparation of the sample.

¹ Laboratorio di Riferimento Regionale di Tossicologia
Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C. Arrigo Alessandria
E-mail vbianchi@ospedale.al.it



CDT increases with alcohol misuse, age, gender don't interfere. In pregnancy women could show higher values of CDT..

Measurement of CDT needs standardization and this process is not easy, while the harmonization has been demonstrated. Diagnostic sensitivity and specificity are 70-90% and 84-97% .respectely. Guide lines has been written by a working group SIBioC –GITF.



Introduzione

L'uso di bevande alcoliche si perde nella notte dei tempi: un papiro egiziano del 3500 A.C. documenta la produzione di vino, ma è probabile che ancor prima l'uomo praticasse la fermentazione dell'uva. Già nell'antichità le problematiche legate all'abuso alcolico erano conosciute e temute: il codice di Hammurabi (1700 A.C.) puniva severamente i reati commessi sotto l'effetto di bevande alcoliche [Bianchi, 2008].

In Italia l'abuso di alcol è responsabile di oltre 30.000 morti all'anno, ma il problema interessa circa 5.000.000 di bevitori, di cui 1 milione e mezzo sono alcolisti e 3 milioni e mezzo bevitori problematici [Eurispes, 2000].

I disturbi alcol-correlati, compresi i danni derivati da incidenti stradali o infortuni sul lavoro, costituiscono motivo della gran parte dei nuovi ricoveri, la dipendenza da alcol nella popolazione più anziane è un fenomeno principalmente maschile, ma nei giovani questa differenza tende a scomparire.

In Italia l'alcol è da tempo immemorabile parte integrante della cultura e dell'economia, questo rende più difficile la percezione sociale della sua pericolosità e soprattutto che esso possa indurre gravi comportamenti di abuso e dipendenza.

Esistono questionari (AUDIT, CAGE) in grado di evidenziare se il soggetto è un bevitore problematico, ma il fatto stesso che venga autocompilato non sempre porta a risultati veritieri [Mc Cusker, 2002].

E' allora importante al fine di una corretta e precoce diagnosi avere a disposizione strumenti oggettivi quali i biomarcatori di abuso alcolico.

Accanto a test consolidati da tempo quali AST, ALT, GGT, MCV che si positivizzano solo negli stadi avanzati delle patologie alcol-correlate, oggi nuovi marcatori più precoci e più specifici sono stati individuati. Tra questi la transferrina carboidrato carente (CDT), chiamata anche transferrina desialata, è ad oggi il marcatore biochimico dell'abuso alcolico più richiesto e utilizzato. Scopo di questa rassegna è illustrare lo stato dell'arte attuale relativo a tale sostanza.

Biochimica e metabolismo

La transferrina è la proteina che veicola il ferro e lo trasporta nel plasma, è una beta globulina formata da 679 residui aminoacidici che può trasportare fino a due ioni ferrici. Prima della sua secrezione la transferrina va incontro a reazioni post traslazionali mediate da

un sistema enzimatico ad attività glucosiltransferasica che incorpora due catene di glicani ramificati in particolari posizioni della catena [Arndt, 2001].

Tali glicani terminano con residui di acido sialico e la loro incorporazione è alcol dipendente. Mentre l'analisi elettroforetica tradizionale su acetato di cellulosa evidenzia una sola banda attribuibile alla transferrina, analisi più sofisticate come l'isoelettrofocusing mettono in evidenza la microeterogeneità della transferrina. Infatti essa si differenzia sia per il carico di ferro (da 0 a 2 ioni), sia per la struttura primaria (varianti genetiche), sia per il numero di residui di acido sialico.

Per quel che riguarda la struttura primaria, sono state individuate oltre 70 transferrine differenti, le popolazioni caucasiche esprimono di norma la transferrina C, individui con transferrina B o D in omozigosi sono rarissimi, mentre sono comunissime le forme intermedie tra la transferrina C e quelle B o D (prevalenza < 1%).

Per quel che riguarda il carico di residui di acido sialico, nell'uomo, almeno da un punto teorico, sono presente 9 transferrine differenti che ne contengono da 0 ad 8.

La maggior parte della transferrina (oltre l'80%) termina con 4 acidi sialici (tetrasialotransferrina TeST), la forma con due acidi sialici è normalmente presente in concentrazione inferiore al 2%, quella priva di acido sialico è assente o comunque non misurabile con le tecnologie analitiche attuali.

In condizioni di pesante e continuativo uso di alcol etilico la frazione DST aumenta e la asialotransferrina (AST) diventa misurabile [Arndt, 2001].

Definizione

In origine si definiva CDT l'insieme delle glicofornie con $pI \geq 5.7$ che comprendeva sia l'AST, che la monosialotransferrina che la DST. Questa definizione traeva origine dalla tecnica analitica di IEF utilizzata.

Oggi è provato che la concentrazione di monosialotransferrina non dipende dalla quantità di alcol assunta, per cui con l'acronimo CDT si intende solo l'insieme delle glicofornie AST e DST [Dibbelt, 2000].

Si deve ad Helena Stibler e al suo gruppo di ricerca la scoperta della CDT: infatti nel 1970 nel liquido cefalorachidiano di alcolisti con danno cerebellare individuò la presenza di un insieme di proteine anomali che si rivelarono poi essere transferrine a basso contenuto di acido sialico, che sparivano con l'astinenza [Stibler, 1991].



La struttura classica più comune della transferrina è una catena proteica con una doppia catena glicanica ramificata, a forma di antenna, sulle cui estremità sono posizionati 4 acidi sialici. La DST ha una sola catena glicanica ramificata che porta alle sue estremità due residui di acido sialico, mentre l'AST è priva di catene glicaniche e quindi di acido sialico

CDT e consumo di alcol

Anche se non è del tutto chiaro il meccanismo biochimico che porta all'aumento della CDT in caso di eccessiva assunzione di alcol, è certo che una quantità elevata di alcol modifica sia la sintesi della catena polipeptidica che la glicosazione, in particolare è stato dimostrato che l'alcol e il suo metabolita acetaldeide diminuiscono l'attività enzimatica dell'N-acetilglucosaminiltransferasi, enzimi della glicosazione.

La modificazione delle catene glicaniche fa aumentare il tempo di dimezzamento della CDT (10 giorni), mentre le catene immodificate hanno tempo di dimezzamento di circa 7 giorni.

Non ci sono dati completi che correlino "matematicamente" la quantità di alcol assunta e la concentrazione di CDT nel sangue, soprattutto per i motivi etici legati allo studio del consumo alcolico.

E' chiaro in ogni caso che non tutti gli individui rispondono allo stesso modo, per cui si è soliti dividere i consumatori in "high responder" e "low responder". A parità di alcol assunto i primi presenteranno valori di CDT maggiori rispetto ai secondi.

E' ragionevole ritenere che per fare aumentare la CDT, un consumo critico si aggira intorno ai 50-80 g/alcol al giorno per almeno sette giorni. Questa è anche la soglia considerata critica per indurre la cirrosi epatica e le altre patologie alcol-correlate [Stibler, 1991].

Per fare un esempio, queste quantità di alcol sono contenute in 600-950 mL di vino, 1-2 L di birra o 100-250 mL di bevande ad alta gradazione alcolica.

Uso della CDT

A più di trent'anni dalla sua scoperta, circa un migliaio di studi rappresenta l'evidenze scientifica inequivocabile sulla specificità della CDT come marcatore biologico dell'abuso cronico di alcol. Per questo la determinazione della CDT viene impiegata validamente in

- Medicina di base : quando si vuole avere l'immediata identificazione di un bevitore problematico che non ha ancora sviluppato patologie alcol correlate [Mc Quade, 2000]. In questo caso la limitazione potrebbe essere il metodo di misura, infatti risultati ottenuti con vecchie metodiche, oggi del tutto abbandonate, hanno portato a risultati poco accettati dai

medici di medicina generale abituati a valutare il bevitore con marcatori classici quali transaminasi, gamma GT ed MCV [Aertgeets, 2001, Meerkerk,1999].

- Ospedale: numerosi pazienti vengono ricoverati per altre cause. Identificare precocemente un bevitore problematico può essere utile per implementare una terapia efficace [Helander, 2003]. I pazienti coinvolti in incidenti, che arrivano al pronto soccorso con traumi, risultano positivi per alcolemia in percentuale tra 1 e 25%, percentuali che aumentano oltre il 30% durante la notte o le prime ore del mattino, specialmente nei fine settimana [Cherpitel,1999]. I bevitori pesanti spesso sviluppano sindrome da astinenza e sono ad alto rischio per problematiche quali sepsi, polmonite ed emorragie, se non addirittura a rischio di morte ([Eggers,2002; Martin, 2002]. Riconoscere ed eventualmente disintossicare il paziente con importanti problemi alcol correlati prima di ogni intervento chirurgico riduce le complicanze e i costi di ospedalizzazione [Tønnesen,1999].

- Riabilitazione di individui alcol dipendenti: in questa fase la CDT può non essere sufficiente a monitorare l'aderenza al trattamento disintossicante e a valutare le possibile ricadute [Huseby, 1997], mentre potrebbe essere utile il dosaggio dell'etilglucuronide nelle urine [Dalh, 2002] e dal fosfatidiletanolo (PEth) nel sangue intero [Helander, 2012].

- Work place testing. Il D.Lgs 81del 9.4.2008, il nuovo Testo unico sulla salute e sicurezza nei luoghi di lavoro, all'art 41 comma 4 dispone che il medico competente effettui "visitefinalizzate alla verifica di assenza di condizioni di alcol dipendenza". In quest'ambito l'utilizzo della CDT può costituire un utile strumento per il monitoraggio del paziente problematico prima e dopo il suo reinserimento nel luogo di lavoro.

- Medicina legale: La determinazione della CDT viene utilizzata nel rilascio del porto d'armi, nell'adozione di minori e soprattutto nella medicina del traffico, per il rilascio della patente tolta per guida in stato di ebbrezza [Bianchi, 2007;Bianchi, 2010; Bianchi 2009]. In questo contesto è ormai consuetudine associare il dosaggio dell'etilglucuronide nel capello per il monitorare il consumo di alcol nel passato [Bianchi, 2013]. In tale situazione è raccomandabile un'attenta e cauta interpretazione dei risultati poiché l'uso del capello in ambito alcologico può presentare ancora molte problematiche non del tutto chiarite (punto di prelievo, preparazione dl campione, trattamento cosmetico ecc) [Boscolo-Berto,2013;Albermann,2013; Mönch, 2013;Høiset,2013].



Misura della CDT

La microeterogeneità della transferrina dovuta alla struttura primaria, carico di ferro e residui di acido sialico, la forte somiglianza tra le glicofornie CDT e non CDT e loro relativa bassa concentrazione rendono la misura piuttosto delicata specialmente nella fase di risoluzione

Fase preanalitica

Il miglior campione biologico è il siero, anche raccolto in provette con acceleratore di coagulazione. L'utilizzo di coagulanti quali EDTA, citrato o eparina possono dare delle importanti interferenze poiché competono con la saturazione del ferro [Helander,2003]. Come conseguenza si ha un'alterazione del rapporto tra le glicofornie e presenza di picchi interferenti con la misura dell'analita di interesse. Interferisce anche l'emolisi poiché l'emoglobina, liberatasi dalla rottura del globulo rosso, assorbe alla stessa lunghezza d'onda del complesso transferrina-ferro e disturba la linea di base. D'altra parte le buone regole di laboratorio raccomandano sempre e comunque di evitare l'utilizzo di sieri emolizzati.

La stabilità della CDT è elevata, anche a temperatura ambiente, tuttavia è raccomandato conservare i sieri in frigorifero, per evitare che la eventuale contaminazione batterica possa in qualche modo favorire la neoformazione di glicofornie a basso contenuto di acido sialico. Ripetuti congelamenti e scongelamenti del siero non alterano la concentrazione di CDT [Appenzeller 2005].

Il ritmo circadiano, la dieta e il contemporaneo uso di farmaci in particolare disulfiram non hanno influenza sulla concentrazione della CDT [Helander, 1996].

Poiché legate alla determinazione della CDT frequentemente si hanno implicazioni amministrativo-forense è sempre raccomandabile la catena di custodia dopo una puntuale identificazione del soggetto che si sottopone all'analisi.

Fase analitica

La misura della CDT richiede metodi sensibili e specifici per diverse ragioni: la microeterogeneità della transferrina è rilevante, la differenza tra glicofornie CDT e non CDT è piccola, la concentrazione della CDT è bassa (meno del 2%) e le caratteristiche chimico-fisiche sono simili alle glicofornie non CDT che sono presenti in elevata concentrazione (98%), per ultimo ma non per questo meno importante, rilevanti sono inoltre le implicazioni medico-legali derivanti dai risultati di questa analisi.

Così come avviene per le sostanze d'abuso, anche per la CDT è raccomandabile confermare sempre con tecnica analitica separativa un dato "presumibilmente" sopra il valore soglia ottenuto con tecnica analitica di gerarchia inferiore [Bianchi,2010;Ardnt 2006].

Metodo immunometrico

E' da considerarsi metodo di screening. Oggi in commercio vi è un solo metodo diretto in fase omogenea e senza pretrattamento del campione, completamente automatico ed utilizzabile solo sulle piattaforme della ditta produttrice il kit. Misura specificatamente le glicoforme della transferrina che hanno perso una o entrambi le catene dei glicani (disialo-, monosialo- e asialotransferrina) attraverso un antisiero specifico. Questo metodo è adatto a carichi di lavoro consistenti e ha l'indubbio vantaggio di non risentire delle varianti più comuni della transferrina.

Metodo in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

Il metodo pubblicato da Helander e collaboratori nel 2003 è considerato il metodo di riferimento [Helander, 2003]. Tuttavia la complessità nella preparazioni del campione e delle fasi mobili, la lunghezza della corsa analitica e la delicatezza della colonna analitica utilizzata poco si adatta al grande numero di campioni che oggi i laboratori sono chiamati ad analizzare. E' per questo che il mercato della diagnostica ha proposto kit per HPLC con o senza strumenti dedicati, derivati dal metodo originale ma adattati, semplificati ed ottimizzati per renderli fruibili da tutti i laboratori.

Le diverse glicoforme sono separate, tuttavia occorre porre attenzione alla presenza di varianti che possano interferire con la misura dell'analita di interesse.

Metodo in elettroforesi capillare zonale (CZE)

La CZE è una tecnica analitica ideale per separare e quantificare le proteine. Sono stati pubblicati metodi in CZE molto performanti, tuttavia anche per questa tecnica è importante la competenza e l'esperienza degli operatori che si matura negli anni e di solito sono patrimonio solo di pochi laboratori specializzati [Pascali,2011]. Il mercato della diagnostica ha allora proposto sistemi CZE dedicati fruibili in breve tempo da tutti, sacrificando la qualità della tecnica a favore della quantità e della velocità. I principali svantaggi degli strumenti CZE sono la lunghezza d'onda fissa (210 nm), il rivestimento del capillare può adsorbire le glicoforme in modo differente e i tamponi non sono completamente trasparenti all'UV.

Ancora, per sua natura, il capillare non può essere caricato oltre una certa quantità di campione e questo rende la tecnica poco sensibile in caso di campioni con bassa quantità di transferrina, situazione non rara nei forti bevitori. Da ultimo va sottolineato che proteine presenti in elevata quantità come immunoglobuline, proteina C reattiva e marcatori tumorali possono rendere difficoltosa l'identificazione dei picchi relativi alla CDT [Lanz,2003].

Considerazioni sui metodi

Fermo restando che la International Federation of Clinical Chemistry ha indicato come metodo di riferimento il metodo proposto da Helander, altri metodi in HPLC effettuati in laboratori specializzati su strumentazione aperta e con la preparazione dei reattivi e dei campioni manuale possono avere performance simili. Il metodi immunometrico e quelli su HPLC o CZE dedicati sono da considerarsi comunque di screening, così come non è corretto definire i kit semplificati, ancorché eseguiti su strumentazione analitica aperta, metodi di riferimento.

Generalmente la tecnica CZE mostra un maggior grado di risoluzione, capacità che si verifica anche per l'analisi della CDT. Tuttavia tale alto grado di separazione, in presenza di varianti genetiche in eterozigosi, ha come risultato quello di segnalare un tracciato anomalo e di non quantificare la DST. Tale criticità non si riscontra invece quando si utilizza il metodo di riferimento [Kenan,2010].

Standardizzazione

Nel corso degli anni è emerso che l'originale definizione di CDT deve essere modificata e il valore di questo marcatore deve essere considerato in maniera differente in accordo con i trials clinici effettuati.

I metodi analitici, le glicoforme misurate, l'unità di misura e il cut off sono cambiati. In Italia è stato condotto uno studio sui laboratori pubblici che ha dimostrato questa grande disomogeneità [Bianchi,2006], che in realtà è di tutti i Paesi. Differenti metodi danno differenti risultati a parità di concentrazione di CDT con conseguente differenti conclusioni in termini di sensibilità e specificità diagnostica ed impossibilità di comparazione di dati ottenuti in Centri differenti.

Sulla base di queste considerazioni la IFCC ha evidenziato la necessità di un processo di standardizzazione per la CDT ed ha istituito un apposito gruppo di lavoro (IFCC WG-CDT)

(36) il cui scopo è di sviluppare un sistema di riferimento con procedura e calibratori primari in una catena metrologica di tracciabilità fino al Sistema Internazionale (SI).

Per arrivare a questo è stato necessario definire il misurando e la nomenclatura, confermare una procedura di riferimento e preparare di materiali di riferimento quali i calibratori.

Di tutte le glicoforme della transferrina solo la DST e la AST sono sicuramente associate all'uso di alcol tuttavia ciascuna di esse presenta diversa sensibilità e specificità [Jeppsson, 2007]. Anche se la AST è considerata la glicoforma più specifica per l'abuso alcolico, con i metodi oggi in uso essa è misurabile solo quando la DST è già alta (oltre il 2%). Quest'ultima è infatti la glicoforma con più elevata sensibilità diagnostica. D'altra parte poiché la standardizzazione si focalizza solo su una specifica sostanza, il WG-CDT ha identificato la DST come principale analita target per la standardizzazione della misura della CDT [Jeppsson, 2007].

Nell'ambito della corretta nomenclatura da utilizzare è stato deciso che le differenti forme della transferrina diverse per contenuto di acido sialico sono da definirsi "glicoforme" e non genericamente "isoforme". Pertanto AST, DST ecc sono glicoforme della transferrina a basso contenuto di acido sialico.

Per quel che riguarda la procedura di riferimento per la misura della CDT il WG-CDT ha ritenuto che essa dovesse essere "pubblica ed indipendente", cioè non legata ad alcun brevetto o alcun marchio. Tale procedura dovrebbe permettere di misurare l'analita di interesse in tutti i campioni, anche quelli con varianti della transferrina.

La HPLC-MS/MS è sicuramente la tecnica analitica di riferimento allo stato dell'arte odierno, ma ad oggi il metodo HPLC-UV è il più consolidato e probabilmente il migliore poiché:

- misura l'assorbanza del complesso ferro-transferrina a 460-470 nm con bassi rischi di interferenze analitiche
- ha elevato potere risolutivo e separa adeguatamente le glicoforme della transferrina
- può quantificare la DST in maniera assoluta o relativa (%)
- fornisce un cromatogramma esplicativo del pattern delle glicoforme può quindi essere facilmente interpretato [Jeppsson, 2007]

Sulla base di queste considerazioni è stato scelto un metodo ben descritto e validato pubblicato nel 2003 che utilizza reattivi commerciali e come tale può essere riprodotto in qualsiasi laboratorio con una buona esperienza di cromatografia [Helander, 2003]. Con



questo metodo sono state fatte misure comparate per l'assegnazione del titolo del materiale ed è stata implementata una rete internazionale di laboratori di riferimento [Helander, 2010]. Per quel che riguarda l'espressione del risultato, nel passato ci sono stati diversi approcci: un tempo si utilizzava il CDT Index (rapporto tra la concentrazione di DST e TeST) soprattutto tra gli utilizzatori della CZE, oggi il IFCC WG ha raccomandato di esprimere la CDT come percentuale della DST rispetto alla transferrina totale. E' auspicabile che in futuro, analogamente a quello che è avvenuto per l'HbA1C, si possa arrivare ad esprimere la concentrazione in mmoli/moli.

E' naturale chiedersi se nell'esprimere il risultato è bene aggiungere anche la AST. Dal momento, che questa diventa misurabile quando la DST è già abbondantemente patologica, inserirla o non inserirla è solo questione di successiva confrontabilità tra i risultati. Un laboratorio che sceglierà di refertare anche la AST, lo dovrà soltanto dichiarare nel referto. In questo modo il Medico saprà valutare il risultato nel tempo e rispetto ai risultati ottenuti in altri laboratori.

Un progetto di standardizzazione deve contenere anche lo studio dei materiali di riferimento e calibratori.

E' stato preparato, dopo un lungo e laborioso lavoro, materiale purificato di DST e con questo sono stati preparati dei possibili calibratori primari, il cui studio si è dimostrato complicato, poiché il metodo candidato ad essere di riferimento quantifica la DST in relazione alla somma di tutte le glicoforme della transferrina [Helander, 2010] e non è chiaro se le diverse glicoforme hanno la stessa estinzione molare. Inoltre la disponibilità e la stima della purezza della DST isolata non erano soddisfacenti.

Poiché le soluzioni di queste problematiche tecniche avrebbero potuto richiedere molto tempo o addirittura essere impossibili, il WG ha deciso per una più bassa categoria nella gerarchia della tracciabilità metrologica. Indagini sul materiale candidato ad essere di riferimento hanno evidenziato la potenzialità dell'uso di sieri umani nativi e la inadeguatezza dei sieri ottenuti con aggiunta di DST isolata [Weykamp, 2013].

Recentemente l'American Association of Clinical Chemistry (AACC) ha adottato un insieme di procedure tecniche sviluppate dall'International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results (ICHCLR) [AACC, 2014] che permettono l'armonizzazione di un misurando (40,41). L'utilizzo di questo processo ha dimostrato che l'armonizzazione dei metodi di misura commerciali per la CDT è possibile [Weykamp, 2014].



Il processo di standardizzazione sta comunque ancora proseguendo con lo studio della saturazione delle glicoforiche da parte del ferro. Infatti il carico di ferro influenza il punto isoelettrico della proteina, la sua struttura tridimensionale, le proprietà chimico fisiche e quelle antigeniche. Se si aggiunge poi che il ferro può legare in due distinte posizioni della DST (Asn 413 e Asn 611), si capisce come sia importante e complicato avere la chiara idea della struttura dell'analita da studiare e misurare.

Fase post-analitica

Un risultato per essere correttamente valutato ed interpretato, oltre al nome del paziente deve essere corredato di :

- metodo (di riferimento, HPLC, CZE, immunometrico)
- valore numerico
- unità di misura (%)
- calcolo ($100 \times \text{disialotransferrina} / \text{transferrina totale}$)
- valore decisionale (cut-off)

In caso di varianti della transferrina che possono interferire con la separazione della DST, là dove non fosse possibile, neanche manualmente, giungere al risultato, dovrebbe essere dichiarata nel referto la causa dell'impossibilità di una corretta quantificazione della CDT.

Interpretazione dei risultati

Studi condotti su un numero considerevole di campioni di diverse parti del mondo [Bergström, 2008] hanno evidenziato che se la popolazione viene divisa con precisi criteri, sulla base dell'assunzione di alcol in non bevitori, moderati e forti bevitori, la AST è assente nei non bevitori, mentre la DST media aumenta passando dai non bevitori ai moderati e ai pesanti bevitori (1,14%, 1,34%, 2,25%) nella popolazione caucasica. Nelle popolazioni di colore o in quelle orientali la media della DST nei non bevitori e nei moderati bevitori non è statisticamente differente, mentre lo diventa passando dai moderati ai pesanti bevitori.

La DST è quindi un marcatore del bere "eccessivo", anche se non c'è una relazione diretta tra alcol assunto e valore di DST.

A parità di consumo alcolico non ci sono differenze significative nell'uomo e nella donna, così come in differenti fasce di età, mentre il fumo farebbe aumentare leggermente la quantità di DST presente, senza tuttavia portare ad una classificazione errata del soggetto.

Differente è il comportamento in gravidanza, passando dal primo all'ultimo trimestre si ha un aumento considerevole della DST, tanto che alcune donne, al termine della gravidanza, esprimono DST tipiche di forti bevitori [Bianchi, 2011]. Ad un mese dal parto tutto si normalizza [Kenan,2011].

Nei bambini il pattern delle glicoforme è simile a quello dell'adulto, indipendentemente dall'età, pertanto in condizioni normali l'AST è assente [Bianchi, 2012].

In rari sindromi genetiche come la sindrome da deficienza di glicosazione (CDG) si ha la presenza di AST e DST elevate (anche maggiori di 10-15%) a causa del difetto di alcuni enzimi metabolici. I soggetti affetti da questa complessa patologia presentano manifestazioni cliniche evidenti fin dalla nascita, con forti carenze dello sviluppo cognitivo.

Un recente lavoro ha evidenziato l'individuazione di un nucleo familiare svedese carente dell'enzima fosfomannoso isomerasi, quindi affetto da CDG, i cui membri non manifestavano alcuna evidenza clinica grazie all'indagine eseguita su di una donna, astemia, appartenente a questa famiglia che sottoposta ad un'indagine di routine ha manifestato una CDT pari al 17% [Helander, 2014].

Efficienza diagnostica della CDT

Sono stati pubblicati numerosi studi clinici che riguardano sensibilità e specificità della CDT come biomarcatore dell'abuso alcolico. Per calcolare i parametri di efficienza diagnostica è importante avere chiare e precise conoscenze del consumo alcolico al fine di classificare correttamente i falsi negativi e i falsi positivi. Spesso ci si riferisce solo ad test autocompilati dai soggetti che è noto tendono a sottostimare la loro problematica. In questo contesto sono importanti anche i metodi usati, perché un tempo veniva utilizzato un metodo immunocromatografico affetto da numerose interferenze da varianti e da trisialotransferrina in alte concentrazioni.

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica della CDT come marcatore dell'abuso alcolico dipende da molto fattori quali età, ipertensione, BMI, fumo, genere e altre variabili [Bergström, 2008], come indicato in tabella 1.

TABELLA 1 influenza di alcune variabili sulla CDT

VARIABILE	EVIDENZA
Età	Nessuna correlazione tra età e CDT nel siero
Genere	Nessuna differenza rilevata tra donne e uomini
BMI	CDT aumenta in individui obesi (>30)
Fumo	AST e DST sono significativamente più elevati nei fumatori rispetto ai non fumatori con abitudini all'alcol simili
Etnia	Nessuna significativa differenza tra bianchi, neri, e asiatici. La risposta al consumo alcolico nei neri e negli asiatici è maggiore che nei bianchi
Ipertensione	Aumenta nella curva dose-risposta (alcol-CDT) in pazienti con pressione diastolica >90 mmHg, mentre non si ha alcun effetto se la pressione è <90 mmHg
Alcohol	Pesanti bevitori hanno CDT più elevate dei moderati o dei non bevitori
Farmaci	Nessuna interferenza, poiché i meccanismi di metabolizzazione sono differenti (3)

All'inizio del trattamento, in una popolazione di forti bevitori o di bevitori occasionali (bevitori sociali) la sensibilità della CDT varia dal 70 al 90% [Bergström, 2008]. Quando si predispongono studi di questo genere sarebbe opportuno tenere conto del tempo di dimezzamento della CDT che è di circa 12-15 giorni della quantità di alcol assunto e dell'intervallo temporale in cui è avvenuto il consumo.

E' noto infatti che la CDT aumenta se l'assunzione di alcol è continuativa anche se in quantità non eccessiva, mentre non aumenta nel caso di un'assunzione importante in una sola volta o in breve tempo.

Specificità diagnostica

Molti articoli pubblicati in passato, quando la CDT veniva ancora misurata con metodi "obsoleti", riportano casi di CDT falsamente positivi come la sindrome CDG, le varianti genetiche, la cirrosi, l'epatite, l'anemia e i trapianti. Oggi l'uso di metodi separativi, come le analisi in cromatografia e elettroforesi che permettono di separare ed identificare le singole glicoforme hanno diminuito o anche annullato la maggior parte delle interferenze.

Numerosi studi sono stati condotti per valutare la specificità diagnostica della CDT: essa varia dal 84 al 94% nell'uomo e dal 92 al 97% nella donna a seconda se ci sia o non ci sia la concomitante presenza di danno epatico. Sulla base di questi dati si può concludere che la CDT è il marcatore di abuso alcolico più specifico, anche supportato dal fatto che si tratta di analita misurato nel sangue, quindi difficilmente adulterabile.

Valori decisionali o cut off

Per definizione il cut off è un valore arbitrario legato all'utilizzo del risultato. Differenti tecnologie e differenti kit possono dare risultati differenti a parità di CDT. Come è buona norma ogni laboratorio dovrebbe definire i propri cut-off sulla propria popolazione e sull'imprecisione del proprio metodo e tenere conto del contesto in cui l'analisi è impiegato. Per questa ragione è importante scegliere una popolazione rappresentativa dell'ambito in cui il cut off viene usato. Per esempio, se si vuole valutare la popolazione in generale non è certo rappresentativo studiare soli soggetti astemi. Se poi la CDT è misurato con metodi di elevata gerarchia metodologica, studi effettuati sulla base di dati istologici, a meno di un concomitante utilizzo di alcol, hanno dimostrato che la cirrosi epatica e il carcinoma epatocellulare non interferiscono (dati non pubblicati).

Linee guida per la determinazione della CDT

Sulla base di quanto fin qui illustrato, al fine di pervenire a risultati il più possibili armonici nel 2010 un gruppo congiunto SiBioC –GTFI ha proposto linee guida condivise che raccomandano alcune importanti azioni a cui deve ottemperare il Laboratorio per ottenere risultati validi sia da un punto di vista analitico che interpretativo [Bianchi, 2010].

La maggior parte di queste raccomandazioni sono riportate in questa rassegna.

Conclusioni

La CDT è un valido biomarcatore per la valutazione del consumo alcolico, trova applicazione in molti ambiti della medicina preventiva, del lavoro e legale. L'utilizzo di linee guida e di tecniche analitiche consolidate che evitano i falsi positivi, il costo relativamente contenuto e la disponibilità in breve tempo del risultato nonché i numerosi studi scientifici lo hanno reso oggi l'analisi più studiata, conosciuto ed utilizzato in ambito alcologico.



ABBREVIAZIONI

AACC	American Association of Clinical Chemistry
AST	asialotransferrina
BMI	indice di massa corporea
CDG	disturbi congeniti della glicosazione
CDT	transferrina carboidrato-carente o transferrina desialata
CZE	elettroforesi capillare zonale
DST	disialotransferrina
GITF-SIMLA	Gruppo Italiano di Tossicologia Forense e Associazione Italiana di medicina Legale e delle Assicurazioni
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
ICHCLR	International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results
HPLC	cromatografia liquida ad alta prestazione
HPLC/MS-MS	cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem
TeST	tetrasialotransferrina
WG-CDT	gruppo di lavoro per la standardizzazione della misura della CDT

Bibliografia

- AACC. Clinical Laboratory Test Harmonization. www.harmonization.net (ultimo accesso: Aprile 2014).
- Aertgeets B, Buntix F, Ansoms S et al. (2001) Screening properties of questionnaires and laboratory tests for the detection of alcohol abuse or dependence in a general practice population. *Br J Gen Pract* 51:206-217.
- Albermann ME, Kerekes I, Yegles M. (2013) Coloring, bleaching and perming: influence on EtG content in hair. *Ther Drug Monit* 35:527-529.
- Appenzeller BMR; Wenning R. (2005) Altered distribution of transferrin isoforms according serum storage condition. *Clin Chem* 51:2159-2162.
- Arndt T. (2001) Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol use: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation. *Clin Chem* 47:13-27.
- Arndt T. (2006) Valid carbohydrate-deficient transferrin testing. *Chim Clin Acta* 364:367-368.
- Bergström JP, Helander A. (2008) Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking in the serum transferrin glycoform pattern: implications for the use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. *Clin Chim Acta* 388:59-67.
- Bianchi V, Arfini C, Helander A. (2006) Determination of carbohydrate-deficient transferrin in Italy. *Clin Chem Med Lab* 46:1759-1762.
- Bianchi V, Arfini C, Helander A. (2007) Suggestions on carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurement in forensic use and a traffic safety context. *Clin. Chem. Med. Lab* 45:A161
- Bianchi V, Raspagni A, Arfini C. (2008) Alcol e donna: considerazioni sul problema. *Pandora* 3:23-28.
- Bianchi V, Raspagni A, Arfini C. (2009) Uso e abuso di alcol: utilizzo dei biomarcatori per la sicurezza sulla strada. *Minerva Med Leg* 129:25-31
- Bianchi V, Pacifici R, Palmi I et al. (2010) Transferrina carboidrato-carente (CDT): strategie analitiche ed interpretative. *Biochimica Clinica* 34:128-138.
- Bianchi V, Ivaldi A, Raspagni A et al. (2010) Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) alone and combined with GGT (γ -CDT) in traffic medicine *Alcohol Alcohol* 3:306-11



- Bianchi V, Ivaldi A, Raspagni A et al. (2011) Pregnancy and variations of carbohydrate-deficient transferrin levels measured by the candidate reference HPLC method. *Alcohol Alcohol* 46:123-127.
- Bianchi V, Raspagni A, Arfini C et al. (2012) High performance liquid chromatography evaluation of serum carbohydrate-deficient transferrin and more sialylated transferrin glycoforms in children. *Scand J Clin Lab Invest* 72:274-280.
- Bianchi V, Raspagni A, Arfini C. (2013) Emerging Biomarkers of Alcohol Consumption: Clinical and forensic applications: *The Open Toxicology Journal* 6: 27-33
- Boscolo-Berto R, Viel G, Montisci M et al. (2013) Ethyl glucuronide concentration in hair for detecting heavy drinking and/or abstinence: a meta-analysis. *Int J Legal Med* 127:611-619.
- Cherpitel CJ, Griesbrecht N, Mc Donald S. (1999) Alcohol and injury: a comparison of emergency room population in two Canadian provinces. *Am J Drug Alcohol Abuse* 25:743-759.
- Dahl H, Stephenson N, Beck O et al. (2002) Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethylglucuronide. *J Anal Tox* 26:201-203.
- Dibbelt L. (2000) Does trisialotransferrin provide valuable information for the laboratory diagnosis of chronically increased alcohol consumption by determination of carbohydrate-deficient transferrin? *Clin Chem* 46:1203-1206
- Eggers V, Tio J, Neumann T et al. (2002) Blood alcohol concentration for monitoring ethanol treatment to prevent alcohol withdrawal in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 28:1475-1482.
- Helander A, Carlsson S. (1996) Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyl transferase levels during disulfiram therapy. *Alcohol Clin Exp Res* 20:1202-1205.
- Helander A, Husa A, Jeppsson J-O. (2003) Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 49:1881-1890.
- Helander A. (2003) Biological Markers in alcoholism. *J Neural Transm Suppl*:15-32.
- Helander A, Bergstrom JP, Freeze HH. (2004) Testing for congenital disorders of glycosylation by HPLC measurement of serum carbohydrate-deficient transferrin glycoforms. *Clin Chem* 50:954-958.
- Helander A, Wienders JP, Jeppsson JO et al. (2010) Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: II. Performance of a laboratory network running

the HPLC candidate reference measurement procedure and evaluation of a candidate reference material. *Clin Chem Lab Med* 48:1585-1592.

Helander A, Péter O, Zheng Y. (2012) Monitoring of the alcohol biomarkers PEth, CDT and EtG/EtS in an outpatient treatment setting. *Alcohol Alcohol* 47,552–557.

Helander A, Jaeken J, Matthijs G et al. (2014) Asymptomatic phosphomannose isomerase deficiency (MPI-CDG) initially mistaken for excessive alcohol consumption. *Clin Chim Acta* 431:15-18.

<http://Eurispes.eu> (ultimo accesso: Aprile 2014)

Huseby NE, Bjordal E, Nilssen O et al. (1997) Utility of biological markers during outpatient of alcohol-dependent subject: carbohydrate-deficient transferrin responds to moderate changes in alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 21:1343-134639.

Høiseth G, Morini L, Ganss R et al. (2013) Higher levels of hair EtG in patients with decreased kidney function. *Alcohol Clin Exp Res* 37:14-16.

Jeppsson J-O, Arndt T, Schellenberg F et al. (2007) Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Med Lab* 45:558-562.

Kenan N, Husand S, Helander A. (2010) Importance of HPLC confirmation of problematic CDT results from a multicapillary electrophoresis routine method. *Clin Chim Acta* 411:1845-1851.

Kenan N, Larsson A, Axelsson O et al. (2011) Changes in transferrin glycosylation during pregnancy may lead to false-positive carbohydrate-deficient transferrin (CDT) results in testing for riskful alcohol consumption. *Clin Chim Acta*. 412:129-133.

Lanz C, Marti U, Thormann W. (2003) Capillary zone electrophoresis with dynamic double coating for analysis of carbohydrate-deficient transferrin in human serum: precision performance and pattern recognition. *J Chromat A* 1013:131-147.

Martin MU, Heymann C, Neuman T et al. (2002) Preoperative evaluation of chronic alcoholists assessed for surgery of the upper digestive tract. *Alcohol Clin Exp Res* 26:836-840.

McCusker MT, Basquille J, Khwaja M et al. (2002) Hazardous and harmful drinking: a comparison of the AUDIT and CAGE screening questionnaires. *J. QJM*. 95:591-595.

McQuade WH, Levy SM, Yanek LR et al. (2000) Detecting symptoms of alcohol abuse in primary care setting. *Arch Fam Med*;9:814-821.



- Meerkerk GJ, Njoo KH, Bongers et al. (1999) Comparing the diagnostic accuracy of carbohydrate- deficient transferrin , gamma glutamyltransferase and mean cell volume in a general practice population. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1052-1059.
- Miller WG, Myers GL, Lou Ganzer M et al.. (2011) Roadmap for harmonization of clinical laboratory measurement procedures. *Clin Chem* 57:1108 –1117.
- Musshoff F, Aengenheister L, Madea B. (2012) Investigation on the influence of different grinding procedures in measured EtG concentrations in hair determined with an optimized and validate LC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem.* 403:769-776.
- Mönch B, Becker R, Nehls I . (2013) Quantification of EtG in hair: effect of milling on extraction efficiency. *Alcohol Alcohol.* 48:558-563.
- Pascali JP, Bortolotti F, Sorio D et al. (2011) Improved capillary electrophoresis determination of carbohydrate-deficient transferrin including on-line immunosubtraction. *Med Sci Law.*;51:26-31.
- Stibler H. (1991) Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 37:2029-2037.
- Tønnesen H. (1999) The alcohol patient and surgery. *Alcohol Alcohol* 34:148-152.
- Weykamp C, Helander A, Bianchi V et al. (2013) Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: III. Performance of native serum and serum spiked with disialotransferrin proves that harmonisation of CDT assays is possible. *Chim Clin Lab Med* 51:991-996.
- Weykamp C , Wielders J.P.M, Bianchi V et al. (2014) Harmonization of measurement results of the alcohol biomarker CDT using the toolbox of technical procedures of the International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results. *Clin Chem* April 1.