

CDT TEST SIERICO in UV / VIS – FAST - MONOREAGENTE – Codice Z68210

INTRODUZIONE

La determinazione della TRANSFERRINA DESIALATA o TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (Carbohydrate Deficient Transferrin, CDT) si basa sul dosaggio della transferrina, glicoproteina deputata al trasporto del Ferro e sintetizzata nell'epatocita, a diversi stati di glicosilazione.

La transferrina è una beta 1-globulina glicoproteica e il suo peso molecolare varia da 75.37 a 79.61 kDa. E' costituita da una sola catena di 679 amino acidi (aa) ed è separata in due domini globulari (N-terminale aa 1-336 e C-terminale aa 337-679). Questi domini possono legare ciascuno uno ione Fe^{3+} , indipendentemente uno dall'altro.

Il dominio C- terminale porta due catene glucidiche legate all'N delle asparagine 413 e 611 (1).

Le isoforme, chiamate propriamente glicoforme, più rappresentate nel siero sono la trisialo, la tetrasialo e la pentasialo transferrina, mentre le glicoforme a minor grado di glicosilazione, l'asialo, la monosialo e la disialo transferrina, sono rappresentate per meno del 3% (fig.1). La transferrina che normalmente viene dosata nel siero nell'ambito del metabolismo del ferro è la somma di tutte le glicoforme.

Il complesso Fe-Transferrina ha un'assorbanza massima a 460-470 nm e questo è importante per la sua rilevazione nell'analisi quantitativa.

Lettture cromatografiche effettuate in Eureka Lab Division, su un sistema cromatografico 920-LC Varian corredato di Detector Diode Array, hanno mostrato una lunghezza d'onda secondaria $\lambda=310$ nm dove si può notare un notevole aumento di sensibilità a livello dei componenti di interesse.

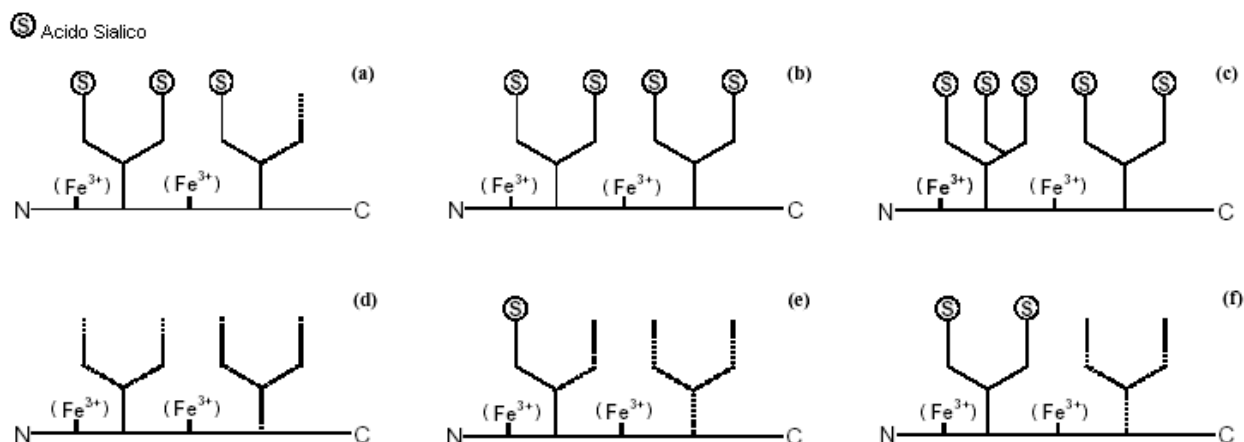


Fig. 1: Glicoforme delle transferrina: trisialo, tetrasialo, pentasialo transferrina (a-c); asialo, monosialo, disialo transferrina (d-f)

Alla fine degli anni '70 venne dimostrata una correlazione tra assunzione eccessiva di alcool ed aumento della concentrazione di transferrina a basso grado di glicosilazione (CDT). Pertanto il dosaggio della CDT si propone come marcatore di abuso cronico di alcool. Il meccanismo chimico di tale fenomeno non è ancora completamente spiegato e sembra basato sull'inibizione di alcuni enzimi glicosilanti da parte dell'etanolo e dei suoi metaboliti (aldeidi).

STANDARDIZZAZIONE DELLA CDT

Lo sviluppo di numerosi metodi per il dosaggio della CDT, che ha reso la determinazione di più facile utilizzo, sta favorendo la sua diffusione in numerosi ambiti. Sono oltre 600 le pubblicazioni sull'argomento CDT apparse su riviste di indubbio valore scientifico dal 2000 ad oggi.

Da queste pubblicazioni emergono risultati e conclusioni differenti e contraddittori anche in termini di sensibilità, specificità diagnostica e valori predittivi, inoltre i risultati non sono sempre paragonabili tra loro.

Ancora, un'indagine italiana (2) condotta nei laboratori pubblici ha ampiamente dimostrato questa disomogeneità.

Si è allora reso necessario un processo di standardizzazione di questo analita tanto che in questa logica, la International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), ha istituito un apposito Gruppo di Lavoro dedicato alla "Standardizzazione della CDT".

Nel primo documento pubblicato (7) per quel che riguarda la CDT sono stati definiti :

- Molecola target e molecola per la standardizzazione
- Definizione del misurando e conferma della nomenclatura
- Metodo di riferimento ed espressione del risultato

MOLECOLA TARGET E NOMENCLATURA

Sia l'asialo che la disialotransferrina sono chiaramente correlabili al consumo alcolico cronico, sebbene dimostrino differenti sensibilità e specificità (3-6), tuttavia il gruppo IFCC ha identificato la disialotransferrina come l'analita target per la CDT. Infatti pur essendo la asialoforma più specifica della disialotransferrina per l'abuso alcolico, con i metodi oggi a disposizione essa è rilevabile quando la disialo è già alta, pertanto è quest'ultima forma ad avere la più elevata sensibilità diagnostica.

COME ESPRIMERE IL RISULTATO

Diversi sono i modi per esprimere la CDT: il gruppo IFCC (7) raccomanda di calcolare il suo rapporto percentuale rispetto alla transferrina totale (%CDT), per compensare falsi positivi o falsi negativi legati rispettivamente ad alti o bassi valori di transferrina totale.

$$\%CDT = \frac{\text{Area (asialo + monosialo + disialotransferrina)}}{\text{Area Transferrina totale}} \times 100$$

dove la transferrina totale è calcolata per **Integrazione baseline**: a-, mono-, di-, tri-, tetra-, pentasialotransferrina.

In conclusione il dosaggio della CDT dovrebbe essere compreso nel pacchetto di test, insieme a Transaminasi, GGT e MCV, come strumento per lo studio e la rilevazione di una intossicazione cronica da alcool etilico.

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo :

Il siero viene complessato con un unico reagente, quindi centrifugato ed iniettato nel sistema HPLC, utilizzando una pompa a **gradiente binario** (pag.6). Il kit è stato validato con gli **Standard IFCC**, dimostrando una buona accuratezza integrando a linea di base.

Recupero del Metodo :

Non Applicabile

Sensibilità del Metodo :

Non Applicabile

Linearità del Metodo :

Non Applicabile

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
1,82 %	3,55 %
3,66%	3,10%

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

Ci	Cs
1,82 %	3,55 %
5,92%	3,72%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs
1,20 %	2,52 %	4,34%
6,75%	8,95%	7,10%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs
1,20 %	2,52 %	4,34%
7,57%	8,51%	8,28%

Contenuto della confezione :

Reagente A - Soluzione Complessante, **1 x 5 ml**

Controllo liofilo sierico, **1 x 2 x 1 ml**

Reagente M1 - Fase Mobile M1, **5 x 500 ml**

Reagente M2 – Fase Mobile M2, **2 x 500 ml**

Reagente M3 – Fase Mobile M3, **1 x 500 ml**

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2-8 °C, tranne il **Controllo liofilo sierico** che va conservato a – 20 °C.

Codice Z68019

Confezionato a parte - vedi scheda tecnica

Vanno mantenute a Temperatura ambiente per il minor tempo possibile

Vanno mantenute a Temperatura ambiente per il minor tempo possibile

Vanno mantenute a Temperatura ambiente per il minor tempo possibile

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC binario con loop da 50 µl in peek
Detector spettrofotometrico UV / VIS **λ=460 nm**
Registratore di cromato grammi

Modalità di prelievo ematico :

È consigliato prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta senza gel per il siero. Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il siero e stoccarlo a – 20 °C. Stabile 4 settimane. Non scongelare il siero per più di una volta. Stabile 7 giorni a 2-8 °C.

I campioni vanno mantenuti a Temperatura ambiente per il minor tempo possibile

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei Controlli e dei Campioni

Dispensare in provetta :

	Controllo	Campione
Controllo	100 µl	
Campione		100 µl
Reagente A – Sol. Complessante	50 µl	50 µl

Vortex per 10 secondi

FASE 2 : Centrifugare a 10000 rpm per 10 minuti

FASE 3 : Prelevare 100 µl di surnatante ed aggiungere 400 µl di acqua di grado HPLC

Al vortex per 10 secondi

NOTA: La soluzione deve essere preparata ed iniettata in giornata.

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl nel cromatografo HPLC e attendere la stampa del cromatogramma.

GRADIENTE FAST CDT Test			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (ml/min)
0	100	0	1.6
0.5	100	0	1.6
5.0	75	25	1.6
5.1	0	100	1.6
7.5	0	100	1.6
7.6	100	0	1.6
10.0	100	0	1.6

N.B.: i primi 5 minuti sono dedicati all'analisi vera e propria ed i secondi 5 minuti al lavaggio ed al condizionamento della colonna analitica prima di passare al campione successivo.

PROCEDURA POSTANALITICA

- Disconnettere il detector, installare la colonna girata in senso opposto e fluxsare a 0,5 ml/min 30 ml di **Reagente M3 - Fase Mobile M3**. Invertire la colonna nel verso originario e far fluxsare per 15 minuti il **Reagente M1 - Fase Mobile M1** ad un flusso di 1,5 ml/min.

CDT TEST- Fast - Avvertenze**PARAMETRI DEL DETECTOR SPETTROFOTOMETRICO**

λ UV-Vis	460 nm
GAIN	0,001 AUFS
TEMPO DI INTEGRAZIONE	4 secondi

PARAMETRI HPLC

LOOP	50 µl in peek
Flusso di lavoro consigliato	1,6 ml/min
Pressione corrispondente	30 bar

PREPARAZIONE INIZIALE DEL SISTEMA e CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

1. A colonna staccata inserire i tubi delle due pompe in un unico contenitore contenente acqua
2. Inserire acqua come solvente di lavaggio dell'ago dell'autocampionatore
3. Far fluire acqua, con valvola di spurgo aperta, a 10 ml/min per 2 minuti nelle pompe A e B (50:50) e scaricare
4. Fare due lavaggi dell'ago dell'autocampionatore (3+3 ml) con acqua
5. Inserire un flusso di 0,5 ml/min, chiudere la valvola di spurgo e nel frattempo effettuare 2 iniezioni da 100 µl di acqua (pulizia del loop e del sistema di switching)
6. Inserire i tubi di pescaggio A e B in corrispondenza delle fasi mobili M1 e M2
7. Con valvola di spurgo aperta far fluire le fasi mobili M1 e M2 a 10 ml/min per 2 minuti (A 50:B 50)
8. Con valvola di spurgo chiusa far fluire la fase mobile M1 a 0,5 ml/min per 5 minuti (A 50:B 50)
9. Spegner la pompa
10. Collegare la colonna per CDT
11. Far fluire la fase mobile M1 (100% A) a 1,5 ml/min per 15 minuti
12. Iniettare 100 µl di acqua in modo da far partire il gradiente come da metodica; naturalmente il cromatogramma risultante non va preso in considerazione (effettuare ogni qual volta si effettua una nuova serie)
13. **PER ATTIVARE UNA COLONNA NUOVA:** Dopo aver preparato il sistema come indicato far fluire 15 minuti la fase mobile M1 ad un flusso di 1,5 ml/min, effettuare una iniezione di Acqua grado HPLC ed infine iniettare controlli sierici fino a completa attivazione della colonna.

LAVAGGIO DEL SISTEMA E DELLA COLONNA DA EFFETTUARE AL TERMINE DI OGNI GIORNATA LAVORATIVA

1. La colonna va lasciata nella fase mobile M1
2. Al termine della serie analitica disconnettere il detector, installare la colonna girata in senso opposto e fluire a 0,5 ml/min 30 ml di fase mobile M3. Invertire la colonna nel verso originario e far fluire 15 minuti il fase mobile M1 ad un flusso di 1,5 ml/min.
3. A colonna staccata lavare la tuberia:
 - con valvola di spurgo aperta far fluire acqua a 10 ml/min per 2 minuti (A 50 : B 50)
 - con valvola di spurgo chiusa impostare il flusso a 1 ml/min e fare 2 iniezioni da 500 µl di acqua (A 50 : B 50)
 - con valvola di spurgo aperta far fluire metanolo al 50% a 10 ml/min per 2 minuti (A 50 : B 50)
 - con valvola di spurgo chiusa impostare il flusso a 1 ml/min e fare 2 iniezioni da 500 µl di metanolo al 50% (A 50 : B 50)
 - con valvola di spurgo aperta far fluire acqua a 10 ml/min per 2 minuti (A 50 : B 50)
 - con valvola di spurgo chiusa impostare il flusso a 1 ml/min e fare 2 iniezioni da 500 µl di acqua (A 50 : B 50)
4. Se si prospetta di lasciare il sistema inutilizzato lavare anche il detector collegandolo tramite union e far fluire (con valvola di spurgo chiusa) acqua a 0,5 ml/min per 10 minuti.

CONSIGLI ANALITICI

1. Dopo aver iniettato acqua per far condizionare il sistema con il gradiente iniettare un controllo. Se si ottiene una brutta separazione dei picchi, è necessario modificare il gradiente
2. Il calcolo dell'area sarà sempre in percentuale
3. Attenzione: integrare solo i picchi di vostro interesse
4. I picchi della mono e asialotransferrina sono raramente visibili, soprattutto con detector poco sensibili
5. Pulire il sistema a colonna staccata come indicato
6. Se il picco Asialo > Disialo (a causa dell'EDTA) non bisogna considerare l'area % della asialotransferrina
7. Se si è in presenza di ITTERO il picco della Disialo avrà un consistente interferente
- 8. Si consiglia di integrare a linea di base della Disialo fino alla Esasialo per ottenere un risultato più accurato come nei cromatogrammi allegati**

CONSIDERAZIONI GENERALI

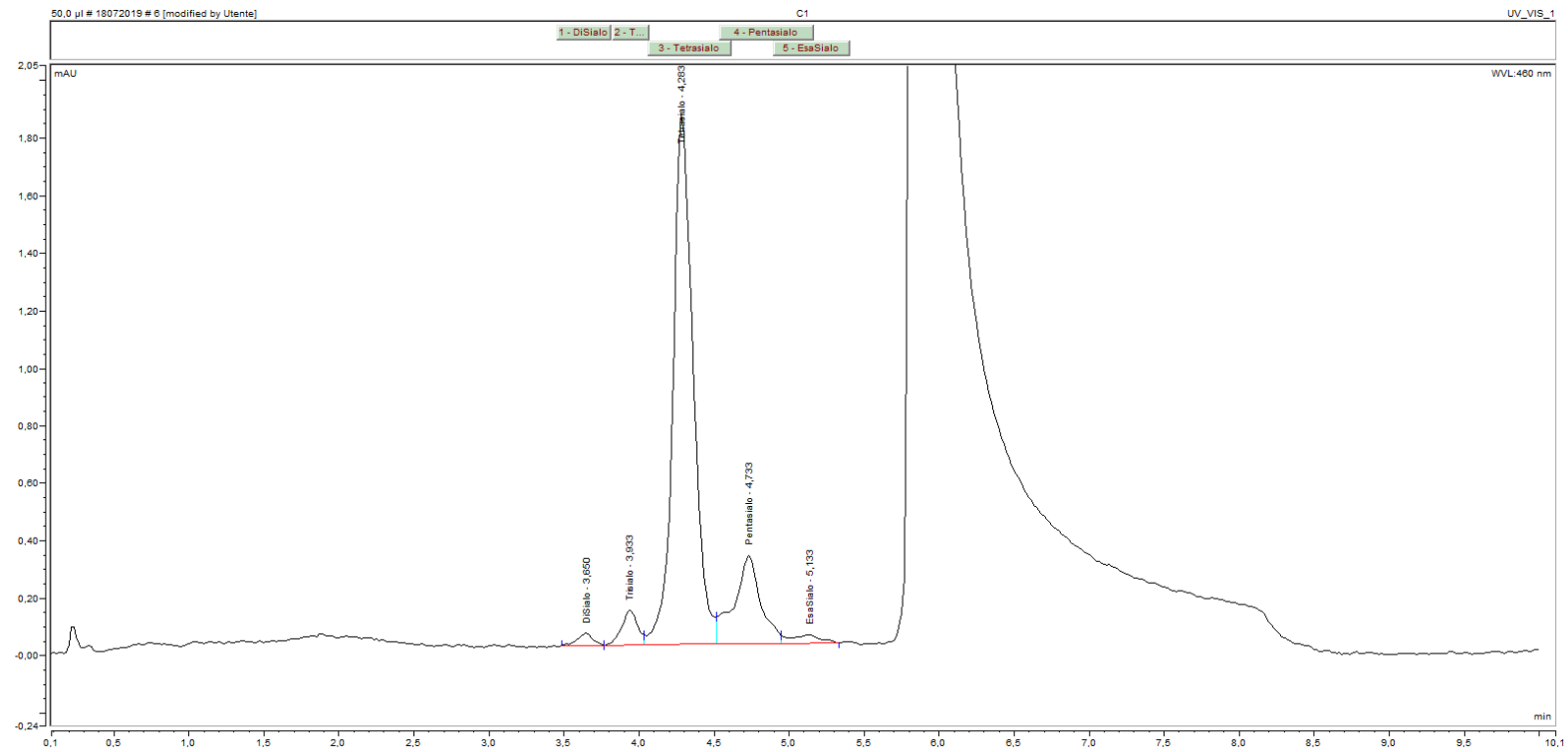
1. La colonna deve essere sempre lasciata con fase mobile M1
2. Quando i picchi della tetrasialo e della pentasialo incominciano a sovrapporsi, si deve girare la colonna, effettuare il lavaggio con la fase mobile M3 come sopra indicato e lavorare a senso contrario.
3. Non lasciare le fasi mobili statiche nella tuberia dell'HPLC, poiché sono fortemente saline, per un periodo di tempo eccessivo
4. Non utilizzare solventi organici e non lasciare alcun residuo di essi nel sistema (quindi prima di ogni seduta eliminare ogni traccia di possibile fase organica dal sistema, compreso l'autocampionatore)
5. Non utilizzare filtri o tubi in metallo
6. Utilizzare loop in peek
7. La pressione di lavoro deve essere di circa 30-80 bar
8. Utilizzare peek blu tra la pompa e l'iniettore

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z68017	Controllo liofilo in matrice per CDT Test, Livello 1	5 x 1 ml
Z68018	Controllo liofilo in matrice per CDT Test, Livello 2	5 x 1 ml
Z68019	Controllo liofilo in matrice per CDT Test, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
Z054998	Colonna Analitica SAX 10 G (50 x 4 mm -5 um)	1 PZ
S29307U	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
S29046U	Tappi neri per vial di vetro a volume ridotto	1 x 100 PZ

CDT TEST SIERICO - FAST

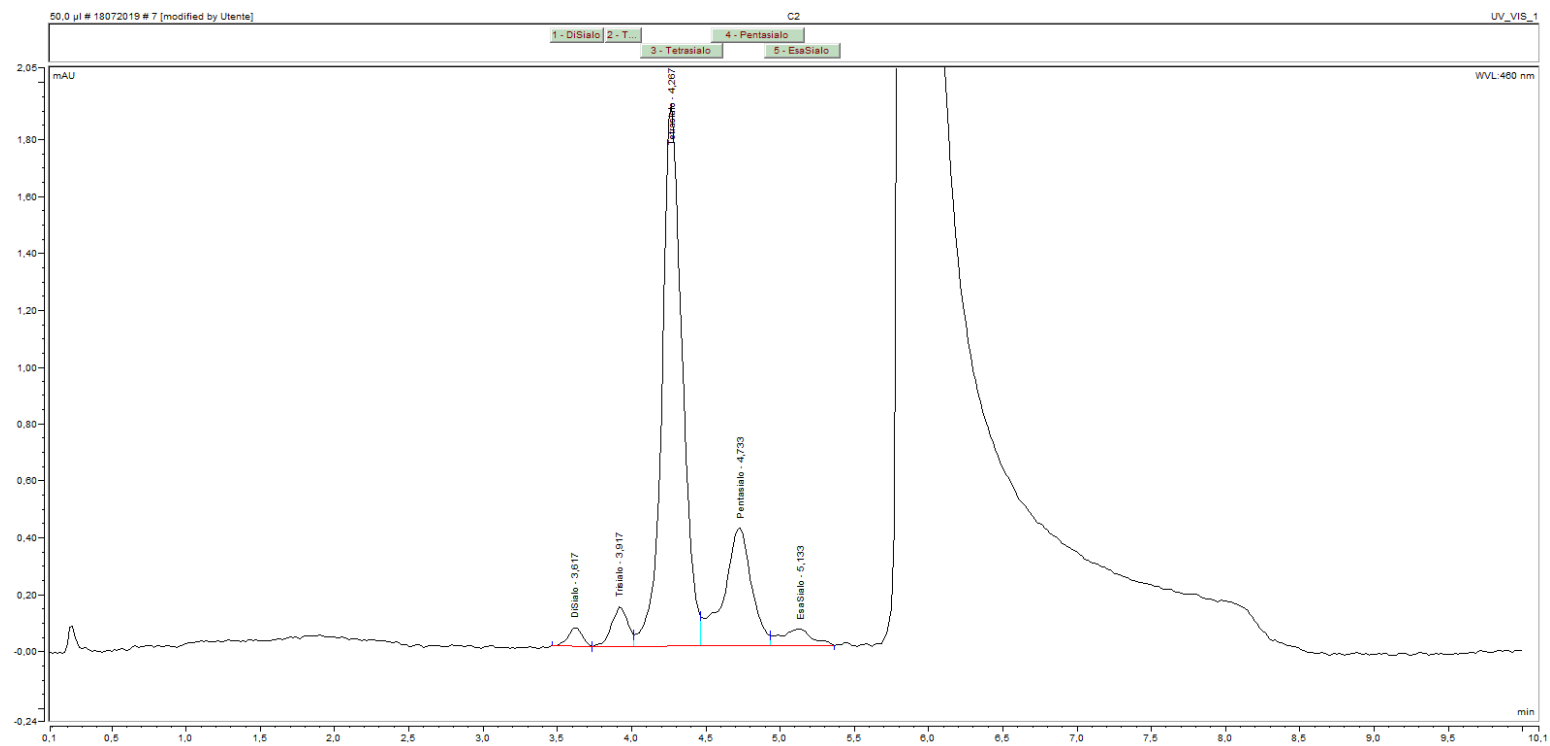
(Cromatogrammi di Riferimento)



Calibratore IFCC Livello 1: % Disialotransferrina = 1,20%

CDT TEST SIERICO - FAST

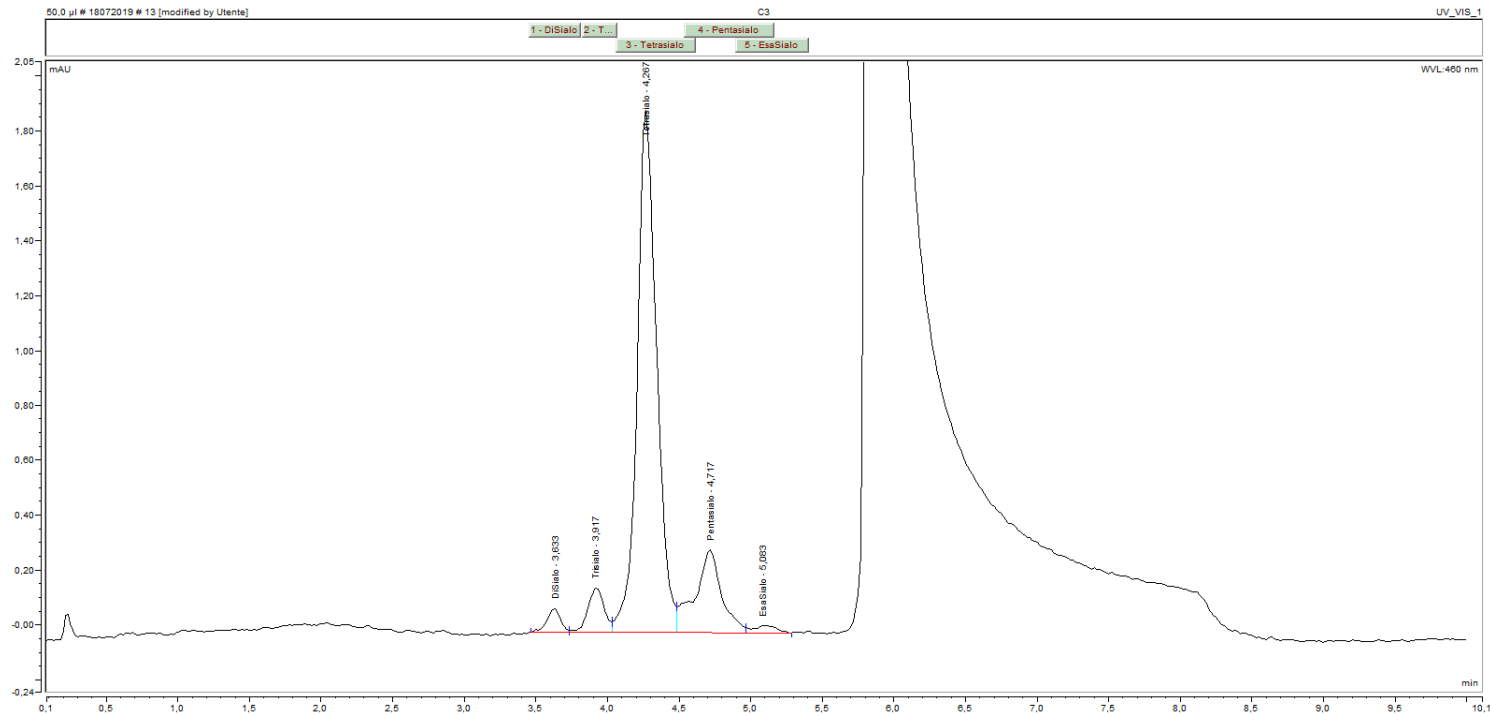
(Cromatogrammi di Riferimento)



Calibratore IFCC Livello 2: % Disialotransferrina = 1,82%

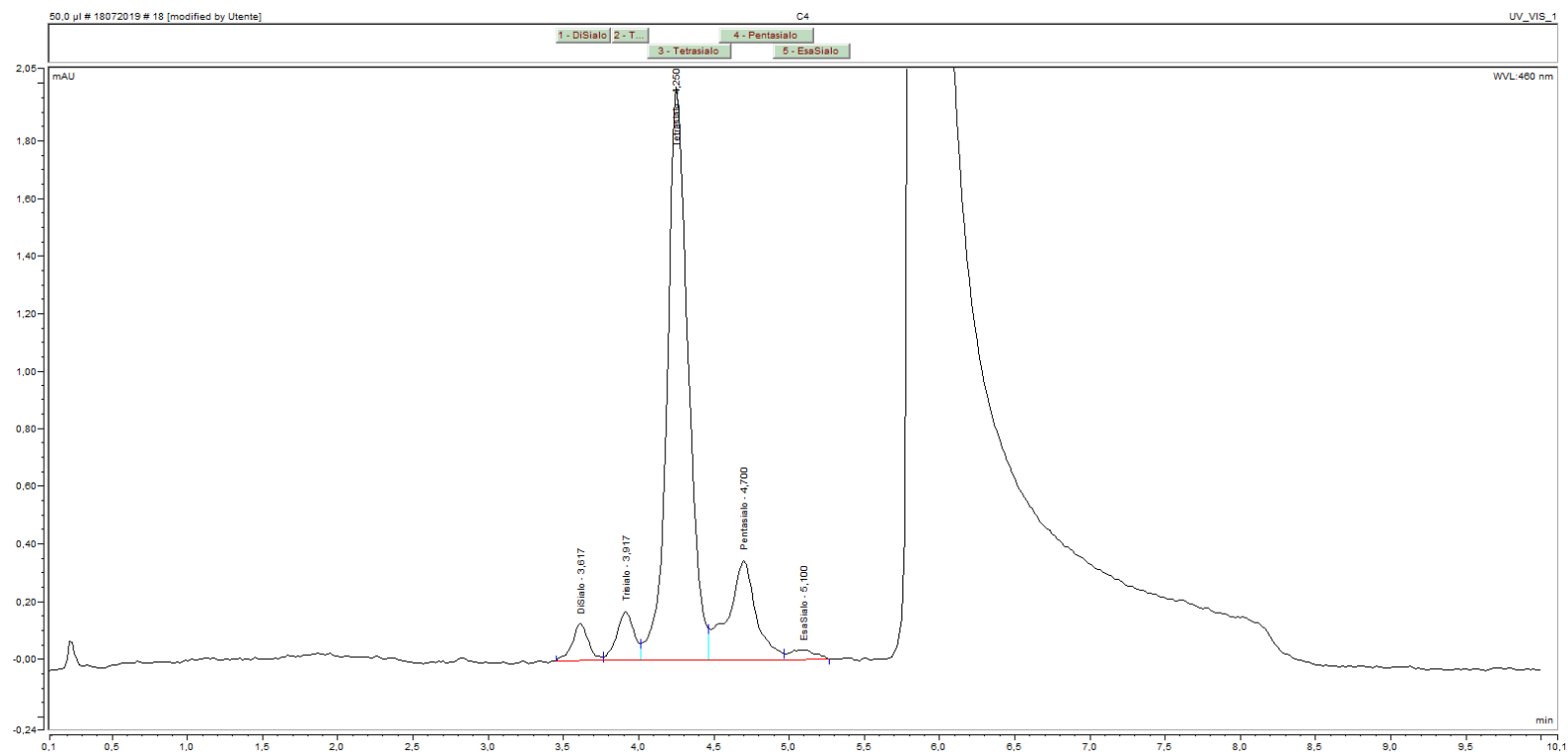
CDT TEST SIERICO - FAST

(Cromatogrammi di Riferimento)



Calibratore IFCC Livello 3: % Disialotransferrina = 2,52%

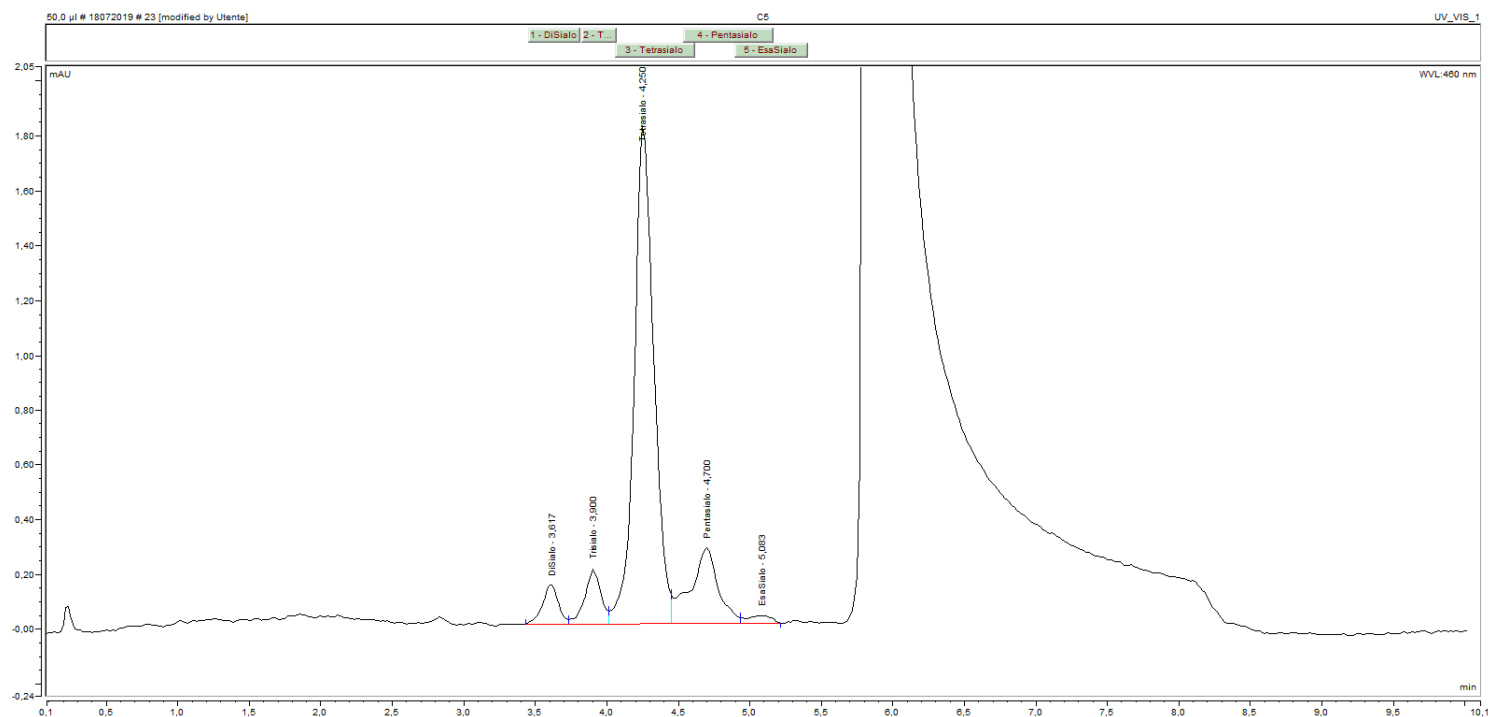
CDT TEST SIERICO - FAST (Cromatogrammi di Riferimento)



Calibratore IFCC Livello 4: % Disialotransferrina = 3,55%

CDT TEST SIERICO - FAST

(Cromatogrammi di Riferimento)



Calibratore IFCC Livello 5: % Disialotransferrina = 4,34%

BIBLIOGRAFIA

- (1) de Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG "The biology of transferrin" Clin Chim Acta 1990;190:1-46
- (2) Bianchi V, Roveta A, Arfini C " La prima indagine conoscitiva sullo stato dell'arte nel dosaggio della transferrina carboidrato-carente in Italia" 2007 Minerva Med Leg 2007;127:45-49
- (3) Stibler H "Abnormal micro-heterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism" Acta Med Scand 1978;204:49-56
- (4) Aertgeets B, Buntix F, Ansoms S, Fevery J " Screening proprieties of questionnaires and laboratory tests for the detection of alcohol abuse or dependance in a general practice population " Br J Gen Pract 2001; 51: 206-217
- (5) Lanz C, Kuhn M, Deiss V, Thormann W "Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera" Electrophoresis 2004;25:2309-2318
- (6) Stibler H, Borg S, Joustra M "A modified method for the assay of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum" Alcohol Alcohol Suppl 1991;451-4
- (7) Jeppsson J-O, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JPM, Anton RF, Whitfield JB, Helander A "Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method" Clin Chem Lab Med 2007;45:558-562
- (8) Bianchi V, Arfini C, Helander A "Determination of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in Italy" Clin Chem Med Lab 2008; 46:1759-1762
- (9) Janet Weaver, Simeon Pollack, "Iron Binding to Apotransferrin"; Acta Haematol 1990;84:68-71
- (10) Seda Onder 1,2, Ozden Tacal 1 and Oksana Lockridge, "Delipidation of Plasma Has Minimal Effects on Human Butyrylcholinesterase" DOI 10.3389/fphar.2018.00117
- (11) Mario Gabric'evic', Damon S. Anderson, Timothy A. Mietzner, and Alvin L. Crumbliss, "Kinetics and Mechanism of Iron(III) Complexation by Ferric Binding Protein: The Role of Phosphate", *Biochemistry* 2004, 43, 5811-5819
- (12) François Schellenberg, Jos Wielders, Raymond Anton, Vincenza Bianchi, Jean Deenmamode, Cas Weykamp, John Whitfield, Jan-Olof Jeppsson, Anders Helander, "IFCC approved HPLC reference measurement procedure for the alcohol consumption biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT): Its validation and use", Clinica Chimica Acta, DOI 10.1016/j.cca.2016.12.022
- (13) Immacolata Amoroso, Daniela Giardiello, Rita Fiore, Agnese Morani, Patrizia Padulano, Luigi Vrenna "Valutazione dei metodi per la determinazione della transferrina carboidratocarente" *biochimica clinica*, 2007, vol. 31, n. 1
- (14) Cas Weykamp , Jos P.M. Wielders , Anders Helander , Raymond F. Anton, Vincenza Bianchi, Jan-Olof Jeppsson, Carla Siebelder, John B. Whitfield and Francois Schellenberg*, on behalf of the IFCC Working Group on Standardization of Carbohydrate-Deficient Transferrin (WG-CDT), "Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: III. Performance of native serum and serum spiked with disialotransferrin proves that harmonization of CDT assays is possible", Clin Chem Lab Med 2012