



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI URBINO "CARLO BO"

Dipartimento di Scienze Biomolecolari

Corso di Laurea Magistrale in

Biologia Molecolare, Sanitaria e della Nutrizione

DETERMINAZIONE DEL CDT. CONFRONTO FRA DUE
METODICHE: ELETTROFORESI CAPILLARE ED HPLC

Relatore:

Ch.mo Prof. MAURO FORMICA

Correlatore:

Dott. MICHELE CALCINARI

Tesi di laurea di:

VALENTINA VENERANDI

Anno accademico 2018-2019

INDICE

1. Introduzione.....	p 4
1.1 Aspetti fisiologici dell'alcol.....	p 4
1.1.1 Alterazioni metaboliche indotte dall'etanolo.....	p 9
1.2 Consumo di alcol.....	p 11
1.3 Raccomandazioni sull'assunzione di bevande alcoliche.....	p 13
1.3.1 Alcol e guida.....	p 14
1.3.2 Alcol e donne.....	p 16
1.3.3 Alcol e gravidanza.....	p 17
1.3.4 Alcol e lavoratori.....	p 19
1.4 Alcolismo.....	p 21
1.4.1 Cause dell'alcolismo.....	p 22
1.4.2 Segni e sintomi dell'alcolismo.....	p 23
1.4.3 Complicanze dovute all'alcolismo.....	p 23
1.5 Diagnosi dell'alcolismo cronico.....	p 28
1.6 Carbohydrate-deficient transferrin (CDT).....	p 32
1.6.1 Meccanismi dell'incremento del CDT indotti dall'alcol.....	p 36
1.6.2 Variante genetiche del CDT.....	p 37
1.7 Utilizzo del CDT.....	p 39
1.8 Scopo della tesi.....	p 41
2. Materiali e metodi.....	p 42
2.1 Cromatografia liquida ad alta prestazione.....	p 42
2.1.1 Preparazione dei campioni.....	p 44
2.1.2 Acquisizione e valutazione dei dati.....	p 46
2.1.3 Valori di riferimento.....	p 47
2.2 Elettroforesi capillare.....	p 48

2.2.1 Campioni per l'analisi.....	p 51
2.2.2 Kit CAPILLARYS CDT.....	p 52
2.2.3 Standardizzazione.....	p 53
2.2.4 Valori di riferimento.....	p 56
2.3 Analisi statistica.....	p 57
3. Risultati.....	p 59
4. Discussione dei risultati.....	p 69
5. Conclusioni.....	p 83
Bibliografia.....	p 84
Ringraziamenti.....	p 89

1. INTRODUZIONE

1.1 Aspetti fisiologici dell'alcol

L'alcol o più comunemente chiamato etanolo è un componente spesso presente nella dieta che, pur non essendo un nutriente in senso stretto in quanto non risponde ad una specifica esigenza dell'organismo, apporta energia. L'equivalente calorico dell'etanolo è 7,0 Kcal/g, un valore intermedio fra quello dei glucidi e dei lipidi. Tuttavia a differenza dei comuni nutrienti (glucidi, lipidi e protidi) che, quando assunti in eccesso, possono essere accumulati, in misura maggiore o minore, nei vari organi e tessuti, l'etanolo non viene depositato, bensì catabolizzato o eliminato al più presto. Altra differenza riguarda la sede di utilizzazione: mentre i comuni nutrienti possono essere utilizzati da tutti i tessuti, l'etanolo è metabolizzato primariamente solo dal fegato.

L'etanolo, assunto con bevande alcoliche come vino, birra e liquori, viene assorbito per libera diffusione principalmente dall'intestino tenue ed in parte minore anche dalla mucosa orale e dallo stomaco. La velocità di assorbimento è quindi proporzionale alla quantità di etanolo ingerito e la barriera gastrointestinale non oppone alcun controllo al suo assorbimento.

Gran parte dell'etanolo assunto viene metabolizzato in CO₂ ed H₂O ed una porzione, variabile fra il 5 ed il 15% viene eliminata come tale con l'aria espirata, il sudore e le urine. La capacità dell'organismo di metabolizzare l'etanolo è elevata (normalmente corrispondente a circa 100 mg/ora/Kg di peso), dipende anche da fattori genetici, varia da individuo ad individuo e da etnia ad etnia.

È il fegato l'organo maggiormente impegnato nel metabolismo dell'etanolo attraverso processi ossidativi. In condizioni di apporto limitato, l'etanolo viene ossidato in

acetaldeide e questa in acido acetico, che per la maggior parte viene riversato in circolo (**Figura 1**).

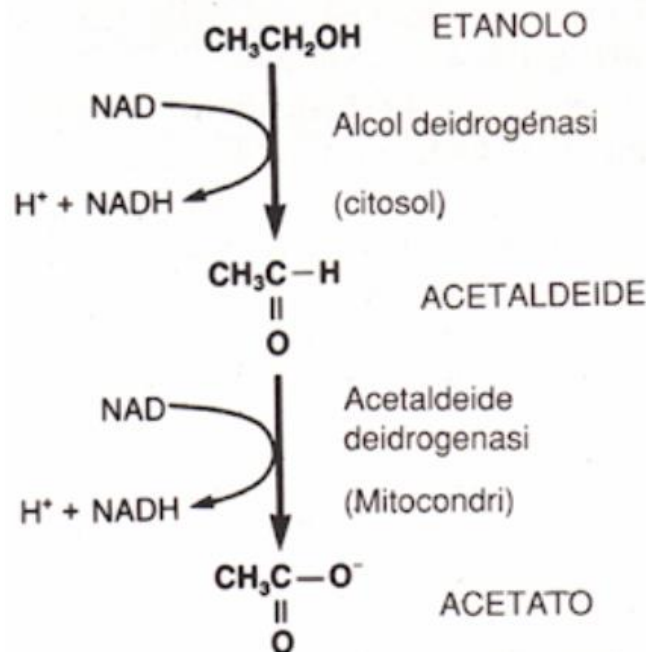


Figura 1. Trasformazione dell'etanolo in acido acetico nell'epatocita.

Solo in misura minore l'acido acetico viene attivato nel fegato stesso ad acetil-CoA e quindi ossidato in CO_2 nel ciclo di Krebs od incorporato nei corpi chetonici, o negli acidi grassi. L'attività della acetato tiochinasi epatica, l'enzima che trasforma l'acetato in acetil-CoA, è infatti relativamente scarsa. Per contro nei tessuti extraepatici e con particolare rapidità nel miocardio, l'acetato rilasciato dal fegato viene attivato in acetil-CoA e prontamente ossidato a CO_2 . Quando l'apporto di etanolo è elevato il fegato diventa incapace di convertire tutto l'etanolo in acetato e riversa in circolo anche l'acetaldeide.

L'ossidazione dell'etanolo in acetaldeide a livello epatico può essere caratterizzata da tre differenti enzimi (**Figura 2**):

1. L'alcool deidrogenasi

2. Il sistema microsomiale ossidante etanolo (MEOS)
3. La catalasi.

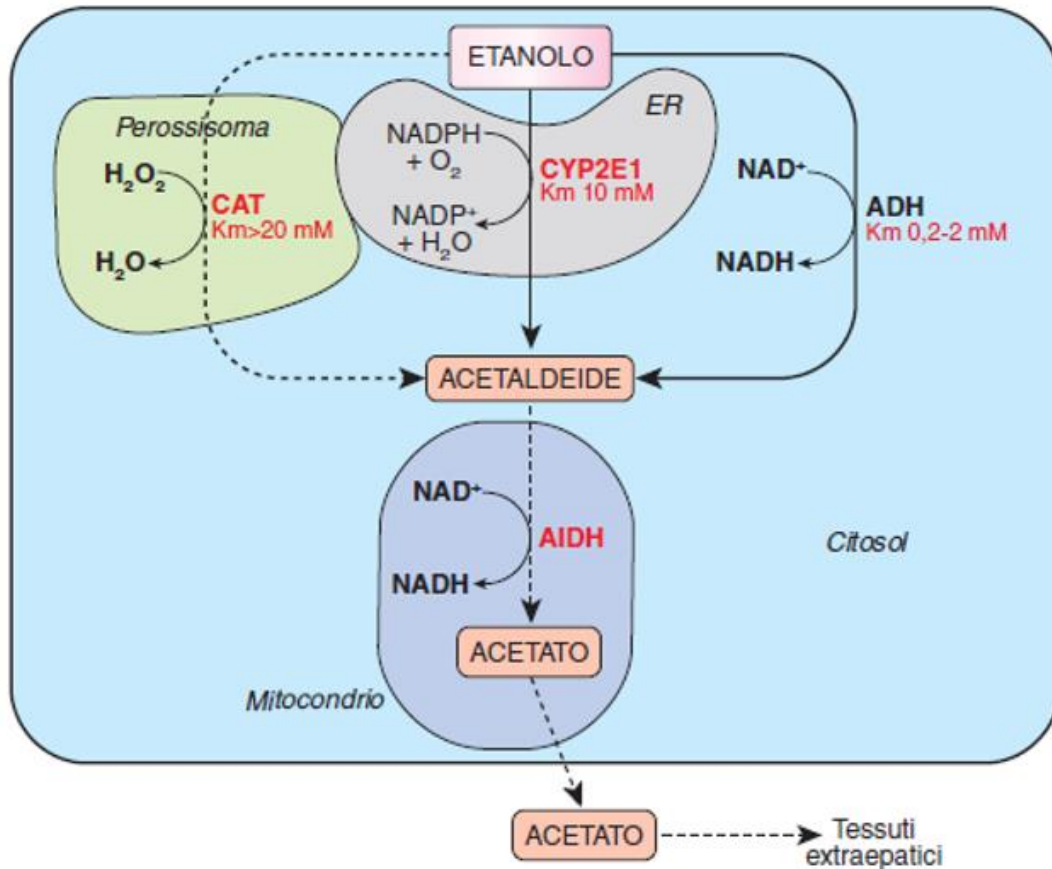
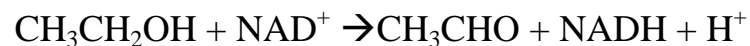


Figura 2. Enzimi implicati nel metabolismo ossidativo dell'etanolo nell'epatocita.

1. Alcool deidrogenasi (ADH). Questo enzima catalizza l'ossidazione dell'etanolo in acetaldeide a spese del NAD⁺:



L'ADH contiene 4 atomi di Zn²⁺ per molecola; due di questi sono situati in corrispondenza del sito attivo e contribuiscono al legame dei substrati (NAD⁺ ed etanolo) all'enzima, gli altri due hanno la funzione di stabilizzare la struttura terziaria. La dipendenza delle attività dell'ADH dallo Zn²⁺ spiega il maggior fabbisogno in Zn²⁺ degli etilisti cronici. L'ADH umana esiste in forme molecolari multiple, codificate da differenti geni, di cui ognuno presenta diverse varianti

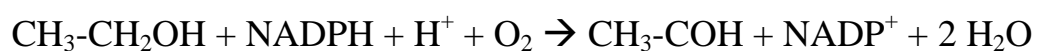
alleliche (polimorfismo). Gli isoenzimi sono proteine omo- o dimeriche citosoliche, suddivise in differenti classi, caratterizzate dalla presenza di subunità diverse, da differente affinità per i substrati e differente localizzazione.

L'ADH1 rappresenta la principale classe di ADH del fegato (95% dell'attività di quest'organo) e costituisce circa il 3% di tutte le proteine epatiche. Gli isoenzimi della classe I dell'ADH sono dimeri composti dalle subunità a, b e g (codificate dai loci ADH1A, ADH1B e ADH1C nel cromosoma 4) ed hanno una K_m piuttosto basse (e quindi elevata affinità) per l'etanolo.

Si conoscono altre due forme di ADH: ADH2, presente nel fegato e con alta K_m per l'etanolo; ADH3, ubiquitaria (presente in grandi quantità nel fegato), inattiva sull'etanolo e, al contrario, attiva su alcool a lunga catena; ADH4, presente nel tratto gastro-intestinale (può essere responsabile del cancro associato all'etilismo) e ADH5, presente nel fegato fetale.

La presenza di diverse forme di ADH, a diversa localizzazione, oltre che epatica, e l'ampia variabilità genetica riscontrata nella popolazione, condiziona la predisposizione e la tolleranza all'alcool in individui diversi.

2. Sistema microsomiale ossidante l'etanolo (MEOS). Si tratta d'idrossilasi a funzione mista associate alla frazione microsomiale, facenti parte della famiglia delle monoossigenasi CYP, che costituiscono i sistemi di detossificazione della fase I. La forma più attiva sull'etanolo è la CYP2E1; utilizzando l'etanolo come substrato, CYP2E1 catalizza la reazione producendo acetaldeide:



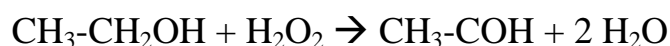
Il CYP2E1 è inducibile dall'etanolo e l'ipertrofia del reticolo endoplasmatico liscio, di cui il MEOS è parte integrante, costituisce una delle prime modificazioni morfologiche conseguenti ad ingestione di elevate quantità di etanolo. Quest'ipertrofia è un fenomeno di adattamento, che conferisce al fegato aumentata capacità a metabolizzare l'etanolo. Il CYP2E1 è tuttavia un

sistema aspecifico, capace anche di metabolizzare molti farmaci e sostanze tossiche ed il suo potenziamento funzionale indotto dall'etanolo si traduce anche in una maggior efficienza nel loro smaltimento. Per questa ragione l'etilista richiede un dosaggio di farmaci generalmente più elevato per ottenere lo stesso effetto farmacologico; d'altra parte l'ingestione contemporanea di farmaci e alcol li mette in competizione per lo stesso sistema di smaltimento, alterando le relative cinetiche di detossificazione ed eliminazione.

L'induzione del CYP2E1 può avere conseguenze negative, sia perché produce acetaldeide, composto tossico (quando non viene metabolizzata rapidamente dalla acetaldeide deidrogenasi entra in circolo e danneggia i tessuti), sia perché dall'azione del CYP2E1 si producono radicali liberi, che possono danneggiare il fegato e portare a forme degenerative epatiche, come la cirrosi.

Quando l'etanolo è metabolizzato dal CYP2E1, non si produce NADH (+H⁺) come nel caso dell'ADH, ma viene consumato NADPH (+H⁺). Conseguentemente diminuisce la resa energetica dell'etanolo ed inoltre si altera l'equilibrio ossido-riduttivo della cellula.

3. Catalasi. La catalasi è in grado di catalizzare la reazione:



La catalasi epatica ha una K_m per l'etanolo di circa 20 mM; pertanto il suo contributo all'ossidazione dell'etanolo è significativo solo quando l'etanolo è presente in concentrazioni molto elevate.

L'acetaldeide, prodotto di ossidazione dell'etanolo, viene quindi ossidata in acido acetico nello stesso epatocita ad opera della acetaldeide deidrogenasi mitocondriale (ALDH), che catalizza la reazione:



La reazione è irreversibile a causa della bassa affinità dell'acetato per l'enzima, che ha invece un'elevata affinità per l'acetaldeide. Come l'ADH, anche questo enzima ha

diverse forme isoenzimatiche. L'isoenzima ALDH2 è normalmente responsabile dell'ossidazione di oltre l'80% dell'acetaldeide; individui con varianti dell'ALDH2 hanno una capacità notevolmente ridotta di metabolizzare l'acetaldeide, il cui accumulo può causare nausea e vomito, ma, nello stesso tempo, previene il vizio dell'alcol (fra gli alcolisti non sono mai stati trovati individui portatori delle varianti di ALDH inefficienti).

L'ALDH, la cui attività richiede l'integrità dei suoi gruppi tiolici (-SH), è inibita da reagenti tiolici e fra questi il disulfiram, farmaco usato nella "terapia del disgusto". Infatti l'accumulo di acetaldeide indotto dal farmaco crea tale malessere da indurre talvolta l'etilista alla rinuncia delle bevande alcoliche [1].

1.1.1 Alterazioni metaboliche indotte dall'etanolo

Gran parte delle alterazioni metaboliche del fegato indotte dall'etanolo sono conseguenti all'eccesso di equivalenti riducenti (NADH) che l'ossidazione dell'etanolo ad acetato comporta ed alla conseguente scarsa o nulla disponibilità di NAD^+ . Per eccesso di NADH il piruvato viene ridotto ad acido lattico e sottratto sia all'ossidazione ad acetil-CoA, sia alla carbossilazione ad ossalacetato. La diminuita formazione di ossalacetato determina un blocco della gluconeogenesi, anche perché l'ossalacetato preesistente viene ridotto a malato dall'eccesso di NADH. Si spiega così la ipoglicemia che spesso consegue ad ingestione di etanolo, specie in condizioni di digiuno e che può complicare, a volte drammaticamente, l'etilismo acuto. Dagli stessi equivalenti riducenti il fosfodiossiacetone viene ridotto a glicerolo-3-fosfato e questo, combinandosi con gli acetil-CoA, forma i trigliceridi. Questi ultimi in parte si accumulano nel fegato, producendo steatosi, ed in parte vengono esportati in circolo con le VLDL, il cui contenuto nel sangue aumenta considerevolmente.

Queste alterazioni metaboliche sono ancora più accentuate quando l'ingestione di alcool è associata ad un'insufficiente alimentazione. Per questo motivo il fabbisogno glucidico è ancora più dipendente dalla gluconeogenesi, che però è resa difficile. L'esaltata mobilizzazione degli acidi grassi accentua la steatosi epatica e l'immissione di trigliceridi nel sangue, ma porta alla chetosi.

Naturalmente queste alterazioni metaboliche sono conseguenti ad ingestione di elevate quantità di etanolo. Al contrario un moderato consumo di etanolo, se associato ad esercizio fisico, induce un aumento del colesterolo legato alle HDL. Questa particolare frazione di colesterolo avrebbe un'azione protettiva contro la malattia aterosclerotica coronarica (**Figura 3**) [1].

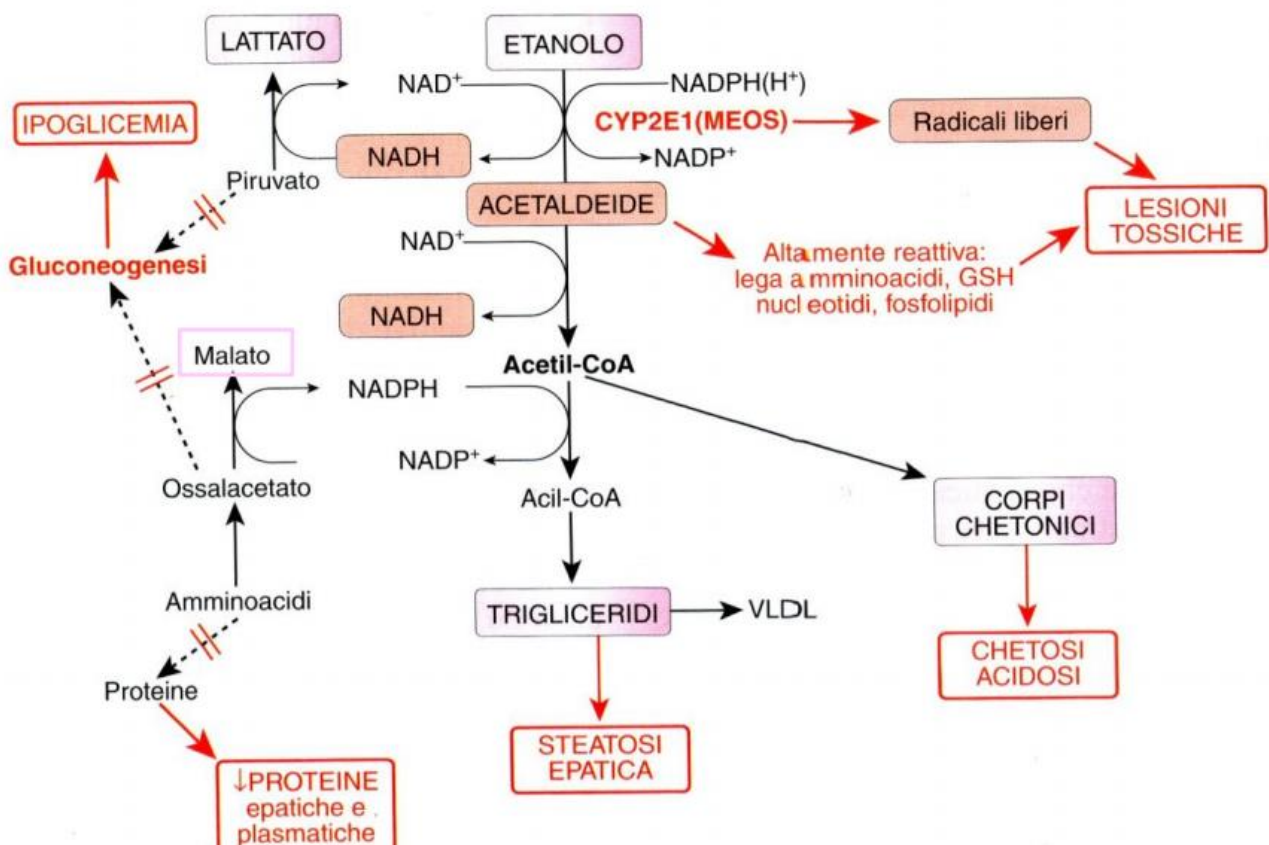


Figura 3. Alterazioni metaboliche conseguenti all'ingestione di etanolo.

1.2 Consumo di alcol

Per consumo di alcol s'intende il consumo di almeno un tipo di bevanda alcolica (vino, birra, altri alcolici) almeno una volta all'anno [2].

Come riportato dall'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) nel rapporto "Global status report on alcohol and health", il documento che presenta un quadro completo del consumo di bevande alcoliche e del carico di malattia attribuibile all'alcol in tutto il mondo e che descrive le azioni dei paesi per ridurre questo grave problema di sanità pubblica, in media sono circa 2,3 miliardi le persone che consumano bevande alcoliche nel mondo.

Ogni persona di età maggiore di 15 anni consuma ogni anno 6,4 litri di alcol puro. Tuttavia, poiché il 43% della popolazione globale tende a bere alcolici, di fatto coloro che bevono davvero consumano una media di 15,1 litri di alcol puro annualmente. Peraltro, più della metà (57% o 3,1 miliardi di persone) della popolazione globale con più di 15 anni di età dichiara di essersi astenuta dal bere alcolici nei precedenti 12 mesi.

Il consumo medio giornaliero di coloro che bevono alcolici è di 33 grammi di alcol puro al giorno, equivalenti circa a 2 bicchieri (ciascuno da 150 ml) di vino, una bottiglia di birra grande (750 ml) o due bicchierini (ciascuno da 40 ml) di super alcolici. In tutto il mondo, più di un quarto (27%) di tutti i ragazzi di 15-19 anni consuma alcolici e i tassi di consumo di alcol per questa fascia d'età sono in assoluto e per frequenza i più alti registrati: in Europa (44%), Americhe (38%) e Pacifico occidentale (38%). Alcune indagini svolte a livello scolastico indicano che, in molti Paesi, l'uso di alcol inizia ben prima dei 15 anni con differenze molto piccole tra ragazzi e ragazze.

I differenti livelli di consumo tra Regioni e Paesi sono dovuti alla presenza di numerosi fattori (socio-demografici, livelli di astensione della popolazione, sviluppo economico, cultura, tipi di bevande preferite). Ad esempio, solo il 2,9% della

popolazione nella Regione dell'OMS del Mediterraneo orientale ha consumato alcol negli ultimi 12 mesi mentre, al contrario, i consumi alcolici tra la popolazione della Regione europea sono oltre un quinto (21,2%) del totale mondiale. L'alcol è consumato da più della metà della popolazione in tre Regioni dell'OMS (America, Europa e Pacifico occidentale) e l'Europa è la Regione nel mondo in cui il consumo medio è il doppio della media mondiale, nei fatti il più alto consumo pro capite del pianeta (nonostante sia diminuito di oltre il 10% dal 2010).

Esistono inoltre marcate differenze geografiche per quanto riguarda il tipo di bevande consumate. Globalmente, il 44,8% dell'alcol viene consumato sotto forma di superalcolici, che rappresentano anche il tipo di bevanda più consumata nelle Regioni OMS del Sud-Est asiatico, del Mediterraneo e del Pacifico occidentale. Il secondo tipo di bevanda più consumata è la birra, che rappresenta il 34,3% di tutte le bevande alcoliche consumate nel mondo. Solo l'11,7% dell'alcol viene invece consumato sotto forma di vino. Tuttavia, il consumo di questa bevanda rappresenta un quarto del consumo totale nella Regione europea (29,8%).

I maggiori cambiamenti nelle preferenze si sono verificati in Europa, dove l'uso di superalcolici è diminuito del 3% mentre quello del vino e della birra è aumentato [3]. Per quanto riguarda il consumo di alcolici in Italia l'ISTAT ha reso disponibili i dati rilevati tramite l'indagine Multiscopo sulle famiglie "Aspetti della vita quotidiana" condotta nel 2018 su un campione di circa 24 mila famiglie. Nel 2018 il 66,8% della popolazione di 11 anni e più ha consumato almeno una bevanda alcolica nell'anno, percentuale in aumento rispetto al 65,4% del 2017.

La percentuale dei consumatori giornalieri di bevande alcoliche è pari al 20,6%, in diminuzione rispetto a quanto osservato dieci anni prima (27,4% nel 2008).

In aumento la quota di quanti consumano alcol occasionalmente (dal 40,6% del 2008 al 46,2% del 2018) e quella di coloro che bevono alcolici fuori dai pasti (dal 25,4% del 2008 al 30,2% del 2018) [2].

1.3 Raccomandazioni sull'assunzione di bevande alcoliche

Non esiste un consumo di alcol sicuro per la salute. Tuttavia, se si decide di bere è necessario attenersi a delle semplici regole.

È sempre consigliabile bere alcolici solo durante i pasti principali e mai a digiuno. Meglio scegliere bevande a bassa gradazione alcolica e consumare gradualmente piccole quantità sempre in un arco temporale prolungato rallentando così l'assorbimento di quantità di alcol che possono portare problematiche alla salute.

È bene non superare le quantità considerate a basso rischio:

- ✓ 2 unità alcoliche al giorno per gli uomini
- ✓ 1 unità alcolica al giorno per le donne
- ✓ 1 unità alcolica al giorno per le persone con più di 65 anni
- ✓ zero unità di alcol sotto i 18 anni

1 unità alcolica corrisponde a 12 grammi di alcol puro ed equivale a (**Figura 4**):

- ✓ un bicchiere di vino (125 ml a 12°)
- ✓ una lattina di birra (330 ml a 4,5°)
- ✓ un aperitivo (80 ml a 38°)
- ✓ un bicchierino di superalcolico (40 ml a 40°).

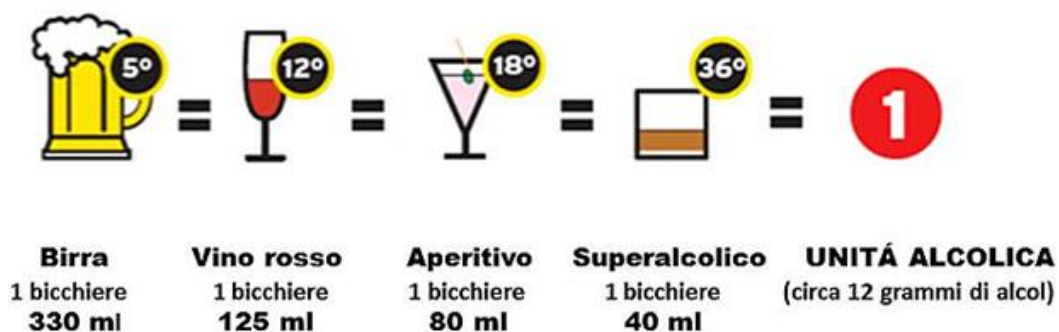


Figura 4. Unità alcolica.

Negli ultimi dieci anni si è diffuso in particolare tra i giovani nel nostro Paese un modello di consumo di bevande alcoliche completamente diverso da quello tradizionale, mediterraneo, ispirato ai consumi ai pasti e in quantità moderate, consumate nel controllo formale ed informale della famiglia o della collettività.

La nuova abitudine, particolarmente diffusa tra le fasce giovanili, si caratterizza per un consumo rischioso e dannoso, episodico e ricorrente di quantità consumate a digiuno che eccedono le sei unità in un arco temporale di solito ristretto a 2-3 ore. Questo modello di consumo, importato dai paesi nord-europei è denominato “binge drinking” ossia il “bere fino a ubriacarsi”. Si tratta di un fenomeno pericoloso sia per la propria salute sia per i comportamenti a rischio che ne derivano in funzione dell’abbassamento della percezione del rischio che si sperimenta già a partire da 1-2 bicchieri consumati e che, progressivamente, porta all’intossicazione alcolica e può spingersi sino al coma etilico. Il binge drinking e qualunque forma di intossicazione sono nocivi e dannosi sia alla salute che alla sicurezza personale e dei terzi e quindi assolutamente da evitare [4].

1.3.1 Alcol e guida

Non esistono quantità di alcol sicure alla guida. Il livello di concentrazione di alcol nel sangue (alcolemia) ottimale ai fini dell’idoneità psico-fisica alla guida è zero grammi per litro. La legge impone tale livello per i minori di 21 anni, per i neopatentati e per i professionisti del volante. Guidare dopo aver bevuto anche un solo bicchiere di bevanda alcolica aumenta il rischio di provocare o essere vittima di incidenti, in quanto l’alcol altera la capacità di rispondere prontamente agli stimoli acustici, luminosi e spaziali. Di solito basta aspettare 2-3 ore per portare a zero l’alcolemia di un bicchiere di bevanda alcolica consumata; se non si è digiuni il tempo può anche ridursi a 1-2 ore.

Con un livello di alcolemia (cioè la concentrazione di alcol nel sangue) di 0,5 g/l, che rappresenta il massimo livello consentito dal codice della strada e che non dovrebbe mai essere raggiunto se s'intende porsi alla guida:

- ✓ il tempo di frenata raddoppia;
- ✓ si riduce il campo visivo, in particolare quello laterale;
- ✓ si ha una percezione distorta delle distanze e della velocità.

L'incidente causato dall'alcol alla guida rappresenta la prima causa di morte tra i giovani in Italia. Se si deve guidare quindi è fondamentale non bere, qualunque sia l'età. Quando si consuma alcol nonostante ci si debba mettere alla guida è indispensabile aspettare due ore per ogni bicchiere di bevanda consumato [4].

Come già specificato precedentemente, la normativa attuale italiana stabilisce come valore limite legale il tasso di alcolemia di 0,5 g/l. Guidare un veicolo oltre questo limite, quindi in stato di ebbrezza, costituisce un reato, punito, oltre che con la perdita di 10 punti della patente, con le severe sanzioni previste dagli articoli 186 e 186 bis del Codice della Strada.

In caso di guida con tasso alcolemico compreso tra 0,5 e 0,8 g/l è prevista un'ammenda da 500 a 2000 euro con sospensione della patente da 3 a 6 mesi.

In caso di guida con tasso alcolemico tra 0,8 e 1,5 g/l è prevista un'ammenda da 800 a 3200 euro, l'arresto fino a 6 mesi e la sospensione della patente da 6 mesi ad 1 anno.

In caso di guida con tasso alcolemico superiore a 1,5 g/l la legge prevede un'ammenda da 1500 a 6000 euro, l'arresto da 6 mesi ad un anno, la sospensione della patente da 1 a 2 anni, il sequestro preventivo del veicolo e la confisca del veicolo.

La patente di guida è sempre revocata quando: il reato è stato commesso da conducente di autobus o di veicolo destinato al trasporto merci; in caso di recidiva biennale (cioè se la stessa persona compie più violazioni nel corso di due anni).

La revoca della patente viene inoltre disposta quando il conducente, con tasso alcolemico superiore a 1,5 g/l o sotto l'influenza di droghe, ha provocato un incidente.

Le pene previste dall'articolo 186 comma 2 e 186 bis comma 3 del Codice della Strada sono raddoppiate se il conducente in stato di ebbrezza provoca un incidente stradale [5].

L'accertamento alcolimetrico è eseguito attraverso uno strumento chiamato etilometro che misura la quantità di alcol contenuto nell'aria espirata. L'esame viene ripetuto due volte, effettuando due misurazioni successive a distanza di 5 minuti l'una dall'altra. Tutte le apparecchiature sono omologate dal Ministero dei Trasporti secondo le prescrizioni fissate nell'art. 379 del Regolamento di esecuzione del codice della strada e nel richiamato disciplinare tecnico approvato con il Decreto del Ministero dei Trasporti. Il conducente viene sottoposto al test utilizzando boccagli monouso, ed il campione di aria che egli introduce viene poi analizzato all'interno dello strumento tramite tecnologia ad infrarosso. L'aria espirata raggiunge infatti una camera di misura attraversata da raggi all'infrarosso a doppia lunghezza d'onda (3 e 9 micron) e poiché l'alcol etilico ha elevata proprietà di assorbimento delle radiazioni ne consegue che tanto maggiore è tale assorbimento, tanto maggiore è la quantità di alcol presente nell'aria sottoposta ad analisi. Al termine di questo processo un fotorilevatore misura la riduzione di energia del raggio all'infrarosso e trasferisce poi elettronicamente il dato da elaborare al microprocessore: dalla proporzione tra l'alcol nel sangue e l'alcol nell'aria espirata dai polmoni scaturisce il dato del tasso alcolemico. Tramite un collegamento alla stampante termica integrata si può trasferire su carta l'esito dell'esame: l'apparecchio, infatti, produce uno scontrino con i dati relativi al giorno, all'ora dell'analisi effettuata e al valore di alcol presente [6].

1.3.2 Alcol e Donne

L'organismo femminile, rispetto a quello maschile, risulta essere più vulnerabile agli effetti dell'alcol [4].

Evidenze sperimentali hanno dimostrato che assumendo uguali dosi di alcol in eguali condizioni le donne raggiungono un livello di alcolemia (concentrazioni di alcol nel sangue) più elevato rispetto agli uomini. Una delle cause può essere il minor contenuto di acqua corporea nella donna. La donna ha proporzionalmente più grasso e meno acqua rispetto all'uomo e, dal momento che l'etanolo diffonde nell'acqua, ad assunzioni equivalenti di alcol il volume di distribuzione nella donna è minore e quindi il livello di alcolemia risultante è più elevato.

Un'altra causa è la diminuita attività dell'alcol deidrogenasi gastrica, la cui attività è età-dipendente. Inoltre, nella donna alcolista l'attività dell'ADH gastrica è praticamente inesistente: da ciò consegue che, nella donna, una quota maggiore di alcol arriva direttamente al fegato e ciò può aggravare l'insorgere di danni epatici.

Un'ulteriore spiegazione sulle differenze di genere si basa sul fatto che alcuni studi suggeriscono che ci sia un'influenza degli ormoni femminili. Si pensa che estrogeno e progesterone possano influenzare l'attività dell'ADH. Si ipotizza che le fluttuazioni dei livelli ormonali durante il ciclo mestruale possano influenzare il metabolismo dell'alcol, soprattutto a livello di ADH epatica, rendendo la donna più suscettibile in differenti momenti del ciclo [7].

1.3.3 Alcol e gravidanza

Un discorso particolare va fatto per la donna in gravidanza, periodo in cui va evitato anche un consumo moderato di alcol [4].

L'alcol ingerito da una donna in gravidanza attraversa facilmente la placenta ed arriva direttamente al feto, che ha bassissima tolleranza all'alcol. L'etanolo interferisce con lo sviluppo fetale causando aborto, morte fetale, nascita prematura, basso peso alla nascita, anomalie di sviluppo, ritardo mentale e alterazioni somatiche più o meno evidenti, e la sindrome feto-alcolica (fetal alcohol syndrome,

FAS). Il danno fetale può sopravvenire anche per dosi modeste di alcol soprattutto nelle prime fasi di gestazione [7].

Disturbi fetali dello spettro alcolico (FASD) è un termine generico utilizzato per descrivere la gamma di effetti che si possono verificare in un individuo con esposizione prenatale all'alcol. Questi effetti possono avere implicazioni per tutta la vita tra cui problemi fisici, mentali, comportamentali e di apprendimento. Tra questi svariati disturbi si possono individuare:

- La sindrome alcolica fetale (FAS) che rappresenta la forma più grave di FASD. La diagnosi si basa sulla presenza di anomalie facciali tra le quali philtrum liscio (l'area tra naso e labbro superiore), labbro superiore sottile, piccole fessure palpebrali. Inoltre è presente un deficit della crescita ed anomalie del sistema nervoso centrale (**Figura 5**).

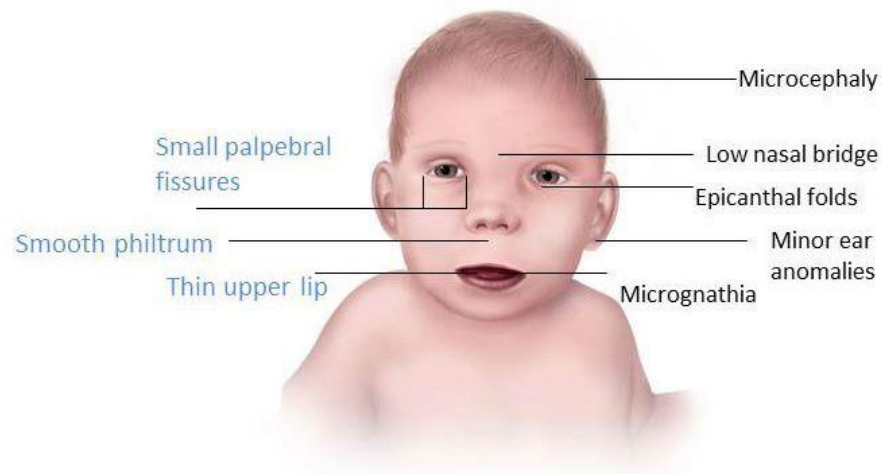


Figura 5. Malformazioni fisiche della sindrome alcolica fetale.

- La sindrome alcolica fetale parziale (pFAS) si manifesta quando il soggetto non soddisfa tutti i criteri diagnostici per la FAS ma ha avuto un'esposizione prenatale all'alcol e alcune anomalie della facciali, un deficit della crescita oppure anomalie del sistema nervoso centrale.
- Il disturbo dello sviluppo neurologico relativo all'alcol (ARND) non prevede anomalie facciali o deficit della crescita, ma presenta problemi

di sviluppo e di funzione del cervello e del sistema nervoso. Questi soggetti possono avere disabilità intellettive, problemi di comportamento e di apprendimento, anomalie del nervo o del cervello.

- Disturbo neuro-comportamentale associato all'esposizione prenatale all'alcol (ND-PAE). Oltre all'esposizione prenatale all'alcol, questi soggetti presentano una compromissione della neuro-cognizione.
- Deficit alla nascita correlati all'alcol (ARBD), in questo caso il problema è correlato ad anomalie nello sviluppo o nel funzionamento di alcuni organi, tra cui: cuore, rene, ossa, udito, visione.

È difficile diagnosticare queste sindromi perché non esistono test specifici. È possibile riscontrarle in risultati fisici, in problemi comportamentali, nei fallimenti scolastici, ecc.. [8]. La FAS, che ha effetti permanenti e irreversibili sullo sviluppo del sistema nervoso, può e deve essere assolutamente prevenuta con un solo mezzo: evitando completamente l'uso di alcol in gravidanza. Sarà perciò cura dei medici avvertire in maniera adeguata le donne che sono già in gravidanza o intendono iniziarla, affinché evitino assolutamente l'uso di alcolici [7].

1.3.4 Alcol e lavoratori

Ogni anno in Italia si verificano circa 100 mila infortuni sul lavoro. Una percentuale tra il 10 e il 40 per cento è dovuto all'alcol. Non è un caso che gli infortuni siano più frequenti nelle ore immediatamente successive l'assunzione di alcolici: le prime ore del mattino e successivamente alla pausa pranzo. E' da rilevare, a tale riguardo, che oltre il 25% degli incidenti sono quelli "in itinere" sul percorso tra casa e lavoro e viceversa. Il lavoro pesante, che prevede un'intensa attività fisica, non contribuisce significativamente ad eliminare più in fretta l'alcol rispetto ai lavoratori d'ufficio o sedentari. Per tutti, basta raggiungere un'alcolemia di 0,5 g/l per raddoppiare il

rischio di subire un infortunio. Sul lavoro il consumo di alcol raccomandato è zero e per alcune categorie ad alto rischio per l'incolumità a terzi la legge prevede esplicitamente il divieto di consumo nei luoghi di lavoro [4].

1.4 Alcolismo

L'alcolismo è una malattia cronica caratterizzata da alterazioni comportamentali, fisiche e psichiche causate dal consumo continuativo o periodico di quantità elevate di alcol. Gli effetti dell'alcolismo interferiscono pesantemente con la salute della persona e con la vita lavorativa, relazionale e sociale.

La dipendenza alcolica è caratterizzata da un comportamento ossessivo di ricerca compulsiva di bevande alcoliche, come la necessità di bere al mattino, e da assuefazione e tolleranza (per raggiungere l'effetto desiderato dall'individuo si è costretti a bere quantità sempre maggiori di bevande alcoliche). Anche per l'alcol-dipendenza, come per qualunque tossico-dipendenza da droghe illegali, la brusca interruzione del consumo di alcol causa la sindrome da astinenza caratterizzata da tachicardia, tremori, nausea e vomito, agitazione, allucinazioni, convulsioni.

L'alcol è causa di patologie e problematiche correlate anche quando il suo consumo non è arrivato al punto da poter definire "alcolista" un individuo.

Si parla per esempio di consumo rischioso o dannoso di bevande alcoliche quando le quantità di alcol consumate possono esporre la persona ad un pericolo o un rischio per la salute o la sicurezza, giungendo ad interferire sul regolare svolgimento della vita sociale, lavorativa o scolastica, a condizionare negativamente le capacità individuali, come quelle necessarie ad affrontare potenziali situazioni di pericolo (ad esempio prima di mettersi alla guida), a provocare in chi lo consuma problemi con la legge. Non esistono quantità considerabili "sicure" di consumo alcolico, tuttavia maggiore è il consumo, maggiore è il rischio per salute e sicurezza.

L'alcol deprime il sistema nervoso centrale, riduce i freni inibitori e influenza pensieri, emozioni e capacità di giudizio. Può causare dunque problemi di vario grado di gravità che coinvolgono non solo il soggetto ma anche la sua famiglia e la società (ad esempio in caso di incidenti stradali o di atti di violenza) [9].

1.4.1 Cause dell'alcolismo

Non esiste una singola causa in grado di determinare i problemi e le patologie alcol-correlate. L'alcolismo deriva da un insieme di cause predisponenti genetiche e biologiche. Sul fronte della genetica, un ruolo importante sembra essere giocato dal gene dei recettori D2 per la dopamina: una forma particolare di questo gene conferisce un rischio aumentato di sviluppare dipendenza da alcol.

Tra i fattori sociali che possono predisporre ai problemi con l'alcol, molto importante è la presenza di una storia familiare di alcolismo, oltre a fattori individuali quali alti livelli di stress e incapacità di affrontare situazioni problematiche.

Importante è anche l'influenza dell'ambiente e delle amicizie più strette.

Sono diverse le condizioni che possono favorire l'alcolismo:

- ✓ il genere: gli uomini sono colpiti il doppio delle donne;
- ✓ l'età: chi comincia a bere in giovanissima età (adolescenza) è più a rischio di sviluppare malattie alcol-correlate o di alcolismo;
- ✓ la storia familiare di alcolismo: chi ha uno o entrambi i genitori alcolisti è più a rischio di alcolismo; anche avere il partner o uno stretto amico con problemi di alcol, aumenta il rischio di alcolismo;
- ✓ la presenza di altre malattie psichiatriche: la depressione in particolare è molto comune nelle persone con problemi di alcol;
- ✓ uno stile di vita molto stressante o che esponga a un elevato numero di eventi sociali;
- ✓ la bassa autostima [9].

1.4.2 Segni e sintomi dell'alcolismo

Un eccesso di alcol deprime il sistema nervoso centrale; il linguaggio diventa impastato e rallentato, si perde la coordinazione dei movimenti, si perdono i freni inibitori e la capacità di giudizio. Questo può causare incidenti stradali, episodi di violenza familiare, crimini violenti. I sintomi possono essere progressivamente sperimentati a partire da quantità moderate di alcol e variano da persona a persona in funzione di sesso, età, condizioni di stomaco pieno o di digiuno.

L'alcolismo è sempre accompagnato dalla comparsa di tolleranza, cioè dalla necessità di bere sempre di più, per ottenere un determinato effetto desiderato e inevitabilmente da sindrome da astinenza alla cessazione dell'assunzione di alcol, con diverse manifestazioni a seconda del tempo passato dall'ultima ingestione [9].

1.4.3 Complicanze dovute all'alcolismo

È stato stimato che l'abuso di alcol rappresenta il terzo fattore di rischio al mondo per malattia e disabilità. Il fegato è l'organo principale responsabile del metabolismo dell'etanolo, quindi è da tempo considerato la principale vittima dell'uso dannoso dell'alcol. L'etanolo ed i suoi prodotti bioattivi, acetaldeide-acetato, esteri di etanolo di acidi grassi, addotti di etanolo-proteina, sono stati considerati come epatotossine che esercitano direttamente e indirettamente il loro effetto tossico sul fegato.

Secondo il Rapporto dell'Organizzazione mondiale della sanità su alcol e salute (2011), l'abuso di alcol è responsabile di almeno 60 principali tipi di malattie sistemiche. Inoltre, il consumo di alcol aumenta significativamente il rischio complessivo di sviluppare il cancro [10].

Dopo l'epatite C, l'alcol rappresenta la causa più comune di malattia epatica cronica nella maggior parte dei paesi industrializzati. Complessivamente, circa il 25% dei

casi di cirrosi epatica riconosce come prima reazione la sovraesposizione all'alcol. Tuttavia, anche se tutte le persone esposte cronicamente all'alcol sviluppano steatosi epatica (fegato grasso), solo una minoranza progredisce fino alla cirrosi. La durata e la quantità di alcol ingerita rimangono i fattori di rischio più importanti per lo sviluppo di una forma di malattia epatica dipendente dall'alcol, anche se non esiste una soglia definita di consumo di alcol in grado di prevedere una forma grave di malattia epatica. È stato riportato che un consumo giornaliero di 60-80 g/die di alcol per 10 anni o più negli uomini e 20 g/die nelle donne porta ad una forma avanzata di malattia del fegato in meno del 40% dei casi.

Inoltre, l'alcol interagisce sinergicamente con altri agenti causali del danno epatico come il virus dell'epatite B o C e l'infezione da virus dell'immunodeficienza umana, la steatosi epatica non alcolica ed i disturbi come l'emocromatosi, per promuovere la progressione del danno epatico alcol-correlato [10].

L'acetaldeide danneggia il fegato attivando direttamente l'infiammazione, il rimodellamento della matrice extracellulare e la fibrogenesi. Inoltre, si lega in modo covalente alle proteine e al DNA portando alla produzione di addotti immunogeni negli epatociti. Infine, l'acetaldeide stimola la segnalazione del TGF- β (fattore di crescita trasformante- β) nelle cellule stellate epatiche che acquisiscono un profilo pro-fibrogenico e pro-infiammatorio. Gli elettroni vengono trasferiti a NAD⁺, con produzione di NADH. Variazioni del rapporto NADH/NAD⁺ possono influenzare le reazioni biochimiche nei mitocondri e l'espressione genica nel nucleo. L'aumento di NADH richiede quantità di ossigeno aggiuntive nei mitocondri, gli epatociti assorbono più della loro normale quota di ossigeno dal sangue arterioso, ma non abbastanza da fornire adeguatamente tutte le regioni del fegato. Pertanto, il consumo di alcol si traduce in un'ipossia significativa degli epatociti che sono i primi a mostrare evidenza di danno causato dal consumo cronico di alcol [10].

Il citocromo P450 e in particolare il citocromo P450 2E1 (CYP2E1) è up-regolato in condizioni di abuso cronico di alcol e aiuta l'alcol deidrogenasi (ADH) a convertire l'alcol in acetaldeide. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), come il perossido di

idrogeno e gli anioni superossido, generate dal CYP2E1 sono responsabili del profilo pro-infiammatorio alcol-correlato mediante:

- 1) attivazione di fattori di trascrizione redox-sensibili, ovvero l'NF-kB;
- 2) reclutamento di neutrofili e altre cellule immunitarie;
- 3) aumento del livello di citochine pro-infiammatorie circolanti;
- 4) perossidazione lipidica associata a danno epatico da alcol.

La catalasi, un enzima perossisomale, è il principale regolatore del metabolismo non ossidativo dell'alcool, il cui prodotto finale sono esteri etilici degli acidi grassi (FAEE) responsabili della steatosi alcolica ed utili come biomarcatori del consumo cronico di alcol [10].

Il pancreas metabolizza direttamente etanolo producendo metaboliti e sottoprodotti responsabili di lesioni delle cellule acinose e stimola le cellule stellate pancreatiche per produrre e depositare matrice extracellulare. Gli esteri etilici degli acidi grassi esercitano i loro effetti tossici interagendo direttamente con le membrane cellulari, stimolando la sintesi dell'estere del colesterolo e liberando gli acidi grassi liberi con conseguente danno mitocondriale. Inoltre, gli esteri etilici degli acidi grassi possono indurre l'attivazione dei fattori di trascrizione NF-KB e AP-1 (Activator protein-1) e l'alterazione del metabolismo del calcio intracellulare. Il danneggiamento della funzione microtubulare e l'instabilità dei granuli di zinco e dei lisosomi si traduce in un'attivazione inappropriata degli enzimi digestivi e dell'autodigestione delle ghiandole pancreatiche. La morte delle cellule acinose (sia da necrosi che da apoptosi), attivate da fattori di crescita proliferativi e pro-fibrinogenici come il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), TGF- α e fattore di crescita connettivo, spinge le cellule stellate pancreatiche (PSC) in uno stato altamente proliferativo con conseguente fibrosi tissutale [10].

Gli effetti dell'alcol sul tratto gastrointestinale superiore sono stati sistematicamente studiati solo negli ultimi 15 anni. Sia il consumo acuto e cronico di alcol influisce sul tratto gastrointestinale superiore con meccanismi che dipendono sia dal contatto

diretto di etanolo e dal suo metabolita acetaldeide con la mucosa, sia da componenti non alcolici di bevande alcoliche, come i prodotti di fermentazione. Questi meccanismi si traducono in:

- infiammazione della mucosa esofagea e gastrica;
- modificazione della pressione sfinteriale e compromissione della motilità;
- alterazione della produzione di acido gastrico.

Tutti questi effetti sono dose-dipendenti e reversibili dopo l'astinenza.

L'infiammazione indotta dall'etanolo della mucosa esofagea dipende dal danno diretto alla barriera mucosa che, a sua volta, predispone il tessuto alla lesione acida. L'etanolo può causare edema mucoso, erosione, emorragia e necrosi, danneggiando direttamente la barriera mucosa gastrica e compromettendo così la capacità della mucosa gastrica di difendersi dagli enzimi gastrici, biliari e digestivi. Recenti studi hanno dimostrato che una ridotta microcircolazione gastrica, accompagnata da un aumento dei livelli ematici di endotelina-1 (ET-1) e diminuzione dei livelli di ossido nitrico (NO) e prostaglandina-E2 può contribuire in modo critico al danno della barriera mucosa in un modello di ratto. Ossido nitrico e prostaglandina-E2 accelerano il flusso della microcircolazione della mucosa gastrica, promuovono la secrezione di bicarbonato, mediano la funzione di protezione immunitaria adattativa, aumentano la sintesi proteica e il rinnovamento cellulare e infine migliorano la capacità di riparazione della mucosa gastrica danneggiata. Al contrario, l'endotelina-1 è il più potente vasocostrittore della microcircolazione della mucosa gastrica [10].

L'alcol può influenzare direttamente il tratto gastrointestinale inferiore danneggiando la mucosa intestinale o indirettamente alterando la microflora residente e compromettendo il sistema immunitario della mucosa.

Le caratteristiche istologiche dell'esposizione all'alcol che sono la perdita dell'epitelio sulla punta dei villi, le erosioni emorragiche della mucosa e l'emorragia nella lamina propria sono state dimostrate anche in volontari con endoscopia gastrointestinale

superiore in precedenza normale 3 ore dopo l'assunzione di 1 g/kg peso corporeo di etanolo.

I meccanismi con cui l'alcol provoca i cambiamenti strutturali della mucosa intestinale non sono stati completamente chiariti. È probabile che l'alcol causi la contrazione dei villi con conseguente formazione di vesciche, formazione di ostruzione linfatica ed esfoliazione delle punte dei villi. Inoltre, l'etanolo può indirettamente contribuire al danno della mucosa innescando uno "stato infiammatorio" della mucosa intestinale con invasione di leucociti e rilascio di mediatori nocivi, come specie reattive dell'ossigeno, leucotrieni e rilascio di istamina da mastociti. Infine, l'alcol può aumentare la permeabilità dei micro-vasi della mucosa con una maggiore filtrazione del fluido transcapillare e un'interruzione della continuità epiteliale [10].

1.5 Diagnosi dell'alcolismo cronico

I marcatori biologici dell'alcolismo sono strumenti utili per confrontare le quantità di alcol con le dichiarazioni di un potenziale consumatore. Esistono biomarcatori "diretti" e "indiretti". I primi sono i prodotti generati durante la metabolizzazione dell'alcol nel corpo umano, mentre i secondi sono i parametri fisiologici le cui concentrazioni sono aumentate o diminuite a seconda della quantità di alcol con la quale il soggetto entra in contatto. Questi biomarcatori differiscono tra loro a seconda della loro sensibilità (cioè la capacità di evitare falsi negativi) e specificità (cioè la capacità di evitare falsi positivi). Inoltre si distinguono in base alla quantità di alcol necessaria per vedere cambiamenti ed in base al tempo necessario per la normalizzazione del parametro.

Sebbene non siano sempre una vera e propria prova del consumo di alcol o di astinenza, rimangono fino ad oggi i parametri più utilizzati per valutare il consumo di alcol [11].

I biomarcatori indiretti includono:

- Valore corpuscolare medio (MCV), per il quale i valori di riferimento sono compresi tra 83 e 100 fl (femtolitri), aumenta con il consumo eccessivo e prolungato di alcol (almeno 60 grammi di alcol puro al giorno per 4-6 settimane). I tempi di normalizzazione del parametro sono di circa due mesi di astensione totale da alcol. L'aumento del volume corpuscolare medio è caratterizzato da una carenza della vitamina B12 (cobalamina) e della vitamina B9 (acido folico), deficit frequentemente osservati nel soggetto che fa abuso di alcol a causa del malassorbimento. Risultati di falsi positivi sono stati riscontrati nella malattia di Biermer od anemia perniziosa, così come nelle patologie che causano emorragie o nell'ipotiroidismo. Anche svariati farmaci

possono indurre un incremento di questo parametro, come ad esempio alcuni contraccettivi orali, anti-convulsionanti, antivirali, colchicina, chemioterapia. Questo marcatore ha una specificità ed una sensibilità piuttosto basse perciò non dovrebbe essere utilizzato nel contesto della diagnosi dell'alcolismo, in quanto potrebbe dare risultati di confondimento.

- Gamma-glutamyl transferasi (GGT) è un enzima intracellulare e microsomiale di origine epatica. Presenta un aumento dell'attività con un consumo eccessivo di alcol, precisamente di circa 5 bicchieri al giorno per diverse settimane. Con l'astinenza i valori sierici di questo enzima diminuiscono della metà dopo circa 14-26 giorni. Alcune condizioni mediche possono portare a falsi positivi, come ad esempio insufficienza biliare, malattie epatiche, pancreatite, obesità od ipotiroidismo. Questo parametro può essere utile per confermare l'assenza di consumo durante i trattamenti di disintossicazione, verificando la normalizzazione dei parametri e la diminuzione del GGT ogni 2-3 settimane.
- Transaminasi note come GOT (Glutammato-Ossalacetato Transaminasi) e GPT (Glutammato-Piruvato Transaminasi) presenti nei mitocondri e nel citoplasma dell'epatocita. La loro attività aumenta nell'alcolista in seguito ad un danno epatico, che comporta il rilascio degli enzimi nella circolazione. L'aumento dei livelli avviene da 3 a 7 giorni dopo un consumo giornaliero di circa 4 bicchieri al giorno. Avendo una specificità ed una sensibilità piuttosto bassa questi parametri possono essere utilizzati solo per identificare soggetti altamente dipendenti da alcol e consumatori non moderati.

Nessuno dei biomarcatori finora citati sono sufficientemente specifici per affermare un consumo eccessivo di alcol in quanto diverse patologie alcol-indipendenti possono provocare le stesse anomalie. Inoltre questi biomarcatori non sono in grado di rilevare casi di "binge drinking", ovvero una modalità di consumo di alcol eccessivo e per brevi periodi [11].

Fino ad oggi il parametro “indiretto” più appropriato per valutare il consumo di alcol è il Carbohydrate-deficient Transferrin (CDT). La transferrina è una glicoproteina coinvolta nel trasporto del ferro a tutto l’organismo ed ha la particolarità di trasportare diversi residui di acido sialico. Il consumo da 50 ad 80 grammi di alcol al giorno (5-8 bicchieri) per 10 giorni porta ad una riduzione dei residui sialici. Il valore si normalizza dopo 2-4 settimane di astinenza [11].

I biomarcatori “diretti” del consumo di alcol includono:

- Etilglucoronide (ETG), deriva dalla fase II del metabolismo, cioè la coniugazione di etanolo con acido glucuronico prodotto nel reticolo endoplasmatico dell’epatocita. L’ETG può essere ricercato nel sangue, nelle urine e persino nei capelli. Appare nel sangue 45 minuti dopo il consumo e 15 minuti dopo nelle urine. Questo metabolita viene completamente eliminato con le urine dopo 48 ore. La sua presenza nei capelli permette di stimare il consumo di alcol del soggetto negli ultimi 3 mesi, a condizione che la lunghezza dei capelli lo consenta. Viene considerato un ottimo biomarcatore per rilevare le ricadute durante il trattamento di astinenza da alcol. Questo parametro presenta svantaggi legati alla sua elevata sensibilità. Infatti l’uso di collutori a base alcolica è sufficiente per ottenere positività a livello delle urine, così come l’ingestione di diverse birre analcoliche. È possibile ottenere risultati positivi anche a livello dei capelli, attraverso l’utilizzo di lozioni contenenti alcol; oppure è possibile ottenere risultati negativi in seguito a trattamenti aggressivi per i capelli come ad esempio lo scolorimento.
- Etil-solfato (ETS), è un metabolita di fase II come nel caso precedente. Presenta caratteristiche molto simili all’ETG ma è prodotto in quantità decisamente inferiori.
- Fosfatidil-Etanolo (PEth), presente sulla membrana dei globuli rossi solo in presenza di etanolo. Il suo livello è rilevabile nel sangue dopo 30 minuti dal

consumo di alcol, può raggiungere il picco massimo dopo 90-120 minuti e rimane significativo dopo un singolo consumo di alcol. Il livello di PEth sembra non essere sensibile ai parametri che possono disturbare i biomarcatori “indiretti” come età, sesso, terapie farmacologiche, patologie come ipertensione, insufficienza renale. Il parametro non è sensibile nemmeno a lozioni per capelli, collutori, ecc. Tuttavia il PEth non presenta ancora un “cut-off” ufficialmente stabilito, ma in futuro potrebbe essere il parametro più utilizzato per valutare il consumo di un soggetto sia astinente che bevitore.

- Esteri etilici degli acidi grassi (FAEEs), derivano dall’azione dell’alcol sugli acidi grassi liberi. In questo caso viene dosato l’acido palmitico. Questo parametro viene ricercato nel sangue e nei capelli, ma non nelle urine a causa della sua bassa solubilità. Presenta le stesse problematiche dell’ETG.

Tra i biomarcatori “diretti” è possibile considerare anche l’acetaldeide, metabolita derivante dall’azione dell’alcol deidrogenasi. Se viene prodotta in grande quantità può formare addotti in molte strutture proteiche, rilevabili nel sangue fino a 3 settimane dopo il consumo [11].

1.6 Carbohydrate-deficient transferrin (CDT)

La transferrina (Tf) è una β 1-globulina con un peso molecolare che varia da 75,37 a 79,61 kDa. E' costituita da una sola catena di 679 amminoacidi 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'azoto delle asparagine 413 e 611, che usualmente legano due catene carboidratiche bi o triantennarie contenenti 4 differenti carboidrati (N-acetilglucosammina, mannosio, galattosio e acido sialico in sede terminale).

La transferrina lega reversibilmente numerosi cationi come ferro, rame, zinco, cobalto e calcio, ma solo il legame con il ferro ed il rame sembra avere significato fisiologico [12].

La transferrina è deputata al trasporto del ferro che è in grado di legare due atomi di metallo in forma ossidata per molecola insieme al carbonato. Il ferro legato a questa proteina rappresenta solo lo 0,1% del ferro totale. Questa proteina è in grado di trasportare il Fe^{3+} alle cellule dove questa si lega ad un recettore di superficie della membrana plasmatica. Una volta che il recettore ha legato la transferrina, una porzione della membrana si invagina sino a formare una vescicola rivestita di clatrina. La clatrina viene rimossa all'interno della cellula a formare un endosoma che contiene sulla membrana delle pompe ATP dipendenti che trasportano H^+ all'interno dello stesso sino ad abbassare il pH a valori compresi tra 5 e 6. A questi valori di pH il ferro viene rilasciato dalla transferrina mediante un meccanismo che comporta la protonazione del carbonato e della tirosina legante. Il ferro così rilasciato è disponibile al legame alla ferritina, mentre la vescicola torna a fondersi con la membrana plasmatica rilasciando apo-transferrina nell'ambiente extra-cellulare (**Figura 6**) [13].

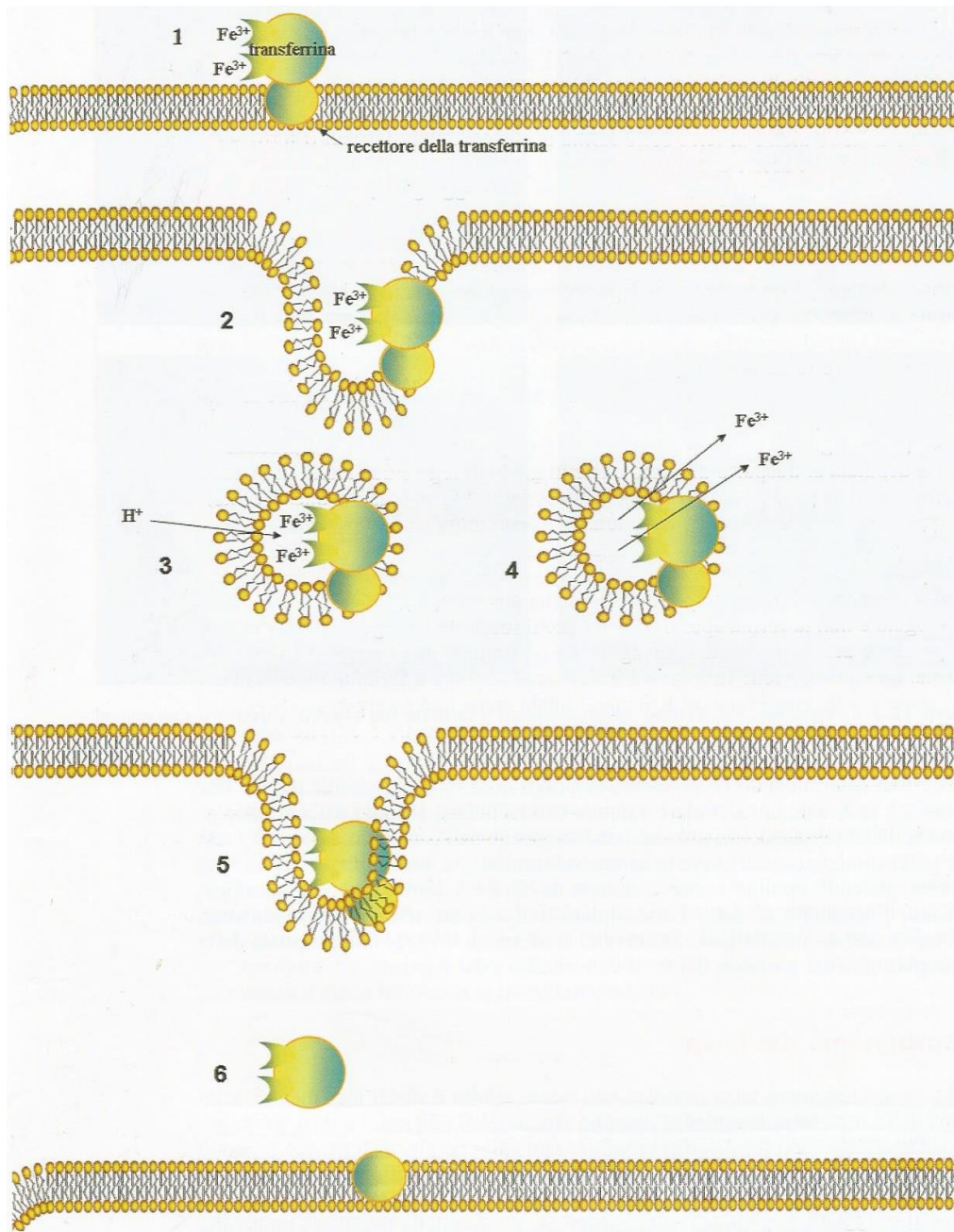


Figura 6. Trasporto del ferro mediante transferrina.

La transferrina è sintetizzata principalmente dal fegato ed in piccola quantità dal sistema del reticolo endoteliale e dalle ghiandole endocrine (testicoli ed ovaie) con un'emivita di circa 7 giorni. Le concentrazioni plasmatiche sono regolate principalmente dalla disponibilità di ferro: in condizioni ferro carenziali le

concentrazioni plasmatiche di transferrina aumentano, mentre dopo somministrazione di ferro ritornano a livelli fisiologici.

La transferrina è una molecola che presenta diversi livelli di eterogeneità.

Il primo livello di eterogeneità è dovuto al carico di ferro. Infatti, possono essere identificate diverse forme: l'apotransferrina (pI Fe0 = 6,1), la transferrina monoferrica, dove il Fe è legato nei domini N- o C-terminali (pI Fe1N = 5,8 e pI Fe1C = 5,7) e la transferrina diferrica (pI Fe2 = 5,4). Negli individui sani il livello di saturazione del Fe è circa il 30%: per ogni ione ferrico si osserva una variazione approssimativa del punto isoelettrico (pI) di 0,3 unità.

Il secondo livello di eterogeneità è determinato dalla presenza e dalla composizione delle catene glicaniche. Queste sono costituite da residui di N-acetilglicosammina, mannosio e galattosio e possono essere bi, tri e tetra-antennate. Ciascuna "antenna" termina con una molecola di acido sialico che crea una carica negativa alla terminazione della catena. In linea teorica sono possibili transferrine con residui di acido sialico da 0 ad 8 (da 0 a 2 catene, cioè da 0 ad 8 antenne). Le forme asialo, monosialo ed ottasialo non sono fisiologicamente rilevabili nel siero. La forma tetrasialo è la glicofoma più rappresentata nel siero umano, contiene due N-glicani bi-antennari per un totale di 4 residui di acido sialico (pI 5,4); sono inoltre presenti glicoforme a diverso contenuto di acido sialico, quali la disialo-transferrina (pI 5,7), la trisialo-transferrina, (pI 5,6), la pentasialo-transferrina (pI 5,2) e la esiasialo-transferrina, (pI 5,0) (**Figura 7**) [12].

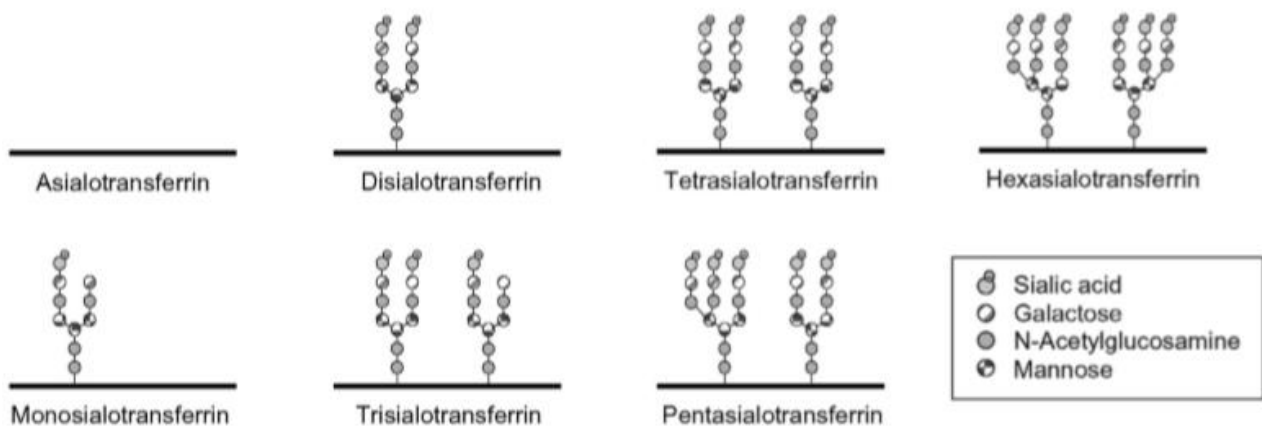


Figura 7. Rappresentazione delle strutture delle differenti forma di transferrina umana.

Tra queste la forma con 2 acidi sialici è fisiologicamente presente in quantità inferiori al 2% [14].

Per ogni residuo di acido sialico si osserva una variazione approssimativa del punto isoelettrico di 0,1 unità per molecola. Studi di spettrometria di massa hanno evidenziato che la disialo-transferrina può coesistere in due varianti presenti in quantità differenti: la prima, quella maggiormente rappresentata, lega i due residui di acido sialico alla stessa catena glucidica, mentre l'altra possiede due catene glucidiche che legano un residuo di acido sialico ciascuna [12].

Il CDT rientra nel gruppo delle transferrine. L'abuso cronico di alcol causa un disturbo della biosintesi della transferrina, ne consegue un aumento della concentrazione delle isoforme aventi un numero di residui di acido sialico non superiore a 2. Queste tre isoforme (disialo, monosialo ed asialo) vengono indicate collettivamente come CDT. Il componente principale del CDT è la disialo transferrina; nei campioni di siero patologici contenenti oltre il 3% di disialo-transferrina si trova anche l' asialo-transferrina. La monosialo-transferrina si presenta solo molto raramente in quantità rilevabili.

Un consumo regolare di oltre 60 grammi di etanolo al giorno, che corrispondono a circa 750 ml di vino o 1,5 l di birra, provoca un marcato aumento del CDT nell'arco di circa 7 giorni. L'emivita del CDT è di circa 14 giorni e, a seguito di astinenza

dall'alcol, il valore si normalizza nuovamente in un arco di tempo di pari durata. Questo marker è pertanto utilizzabile anche nel controllo delle terapie disintossicanti. Come già visto nei paragrafi precedenti, il CDT non aumenta in presenza di altre patologie. Anche l'assunzione di farmaci non incide sui valori di CDT.

Normalmente il CDT viene indicata in percentuale rispetto alla transferrina totale [15].

1.6.1 Meccanismi dell'incremento del CDT indotti dall'alcol

Attualmente è un dato di fatto che il CDT aumenta sopra i livelli "normali" a seguito dell'assunzione di almeno 60-80 g/die di alcol etilico per 10-15 giorni. Tuttavia, ad oggi l'esatto meccanismo con cui l'alcol etilico determina l'aumento delle isoforme carboidrato-deficienti non è ancora completamente compreso. Secondo la letteratura più recente si tratta di un processo complesso che coinvolge sia il trasporto intracellulare di proteine che l'attività enzimatica. Vi sono inoltre evidenze secondo cui la concentrazione di CDT aumenta, pur rimanendo entro i comuni limiti di normalità, anche in caso di moderato consumo di bevande alcoliche. Non è ancora chiarita la variabilità individuale dei meccanismi fisiopatologici che determinano l'incremento in seguito al consumo alcolico. Da studi recenti, non risultano significative differenze nelle concentrazioni basali di CDT in differenti aree geografiche, includendo anche quelle aree in cui è noto un deficit dei sistemi ossidativi dell'alcol [16].

Per ovviare al fatto che non tutti gli individui rispondono allo stesso modo, è possibile suddividere i consumatori in "high responder" e "low responder", cioè a parità di alcol assunto i primi presenteranno valori di CDT maggiori rispetto ai secondi [14].

1.6.2 Varianti genetiche del CDT

Come già detto nel paragrafo precedente, esistono diversi livelli di eterogeneità che caratterizzano il CDT. Infatti è possibile determinare un terzo livello di eterogeneità sulla struttura primaria della proteina. Si conoscono almeno 38 varianti genetiche che differiscono per uno o più amminoacidi, anche se tre sono i tipi di transferrine che si possono trovare con una prevalenza superiore all'1%. La Tf-C è la più comune nella popolazione caucasica: di questa si conoscono almeno 16 varianti (C1-C16). La variante Tf-C1 è la più diffusa (95%) ed il suo gene codificante, polimorfico, possiede due varianti alleliche che generano la Tf-C2 (la prolina in posizione 570 è sostituita da una serina) e la Tf-C3. Vi sono poi la Tf-B con migrazione più anodica e la Tf-D con migrazione più catodica, delle quali a loro volta si conoscono numerose varianti. La Tf-D è maggiormente diffusa nell'Africa occidentale. A queste si aggiungono le associazioni eterozigoti tra le varie C, B e D [12].

Bernini M. et al hanno condotto uno studio sulle varianti genetiche della transferrina nella popolazione bresciana ed hanno potuto riscontrare la presenza di 3 diversi profili di varianti. Infatti come mostra la **Figura 8** sono presenti 4 tracciati cromatografici differenti.

Nel tracciato cromatografico a) è possibile riconoscere la presenza della 4 isoforme di transferrina: disialo-transferrina, trisialo-transferrina, tetrasialo-transferrina e pentasialo-transferrina, ognuna corrispondente al proprio tempo di eluizione: 6,25; 6,95; 7,83; 8,62. I tracciati b); c); d) mostrano 3 diversi profili di varianti rispetto al cromatogramma a).

Con il metodo HPLC utilizzato non è possibile distinguere le 3 diverse forma di varianti B, C, D ma solamente rilevarle dal punto di vista cromatografico [17].

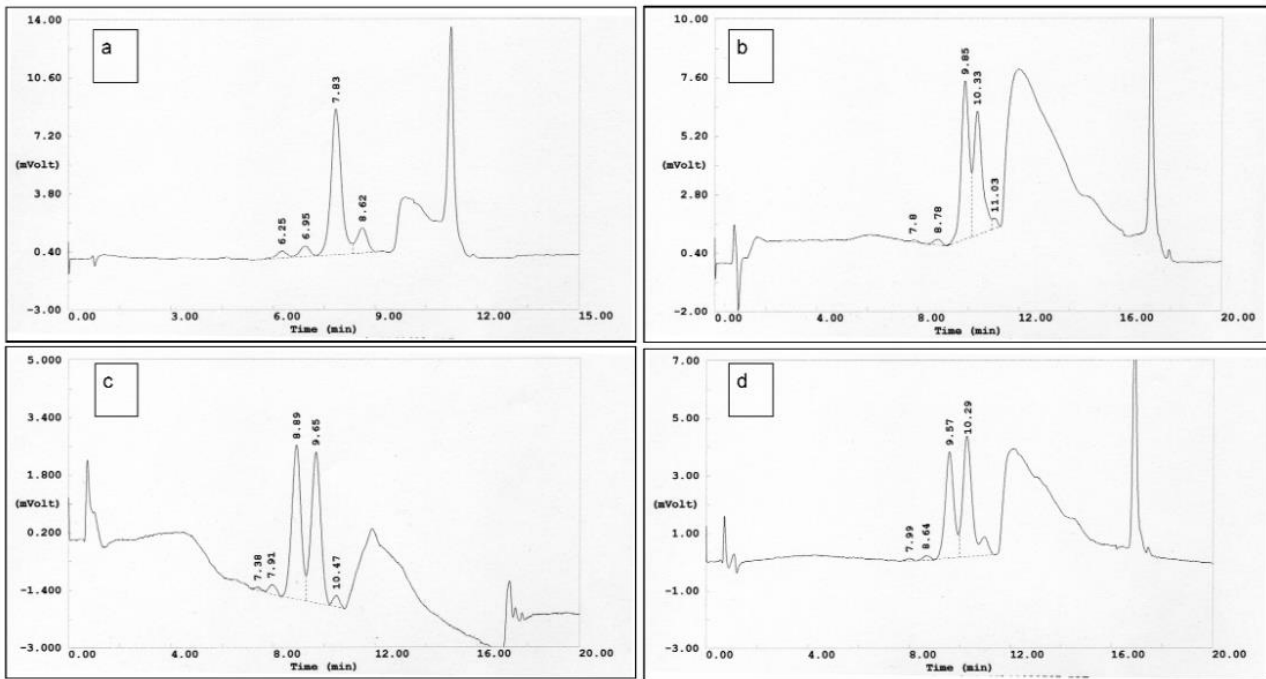


Figura 8. Esempi di tracciati cromatografici relativi allo studio effettuato.

In presenza di queste varianti congenite della CDT piuttosto rare è possibile ottenere falsi positivi o falsi negativi. Perciò i campioni che presentano questa mutazione non devono essere sottoposti a valutazione [18].

1.7 Utilizzo del CDT

La determinazione della CDT viene validamente impiegata in:

- Medicina di base: quando si vuole avere l'immediata identificazione di un bevitore problematico che non ha ancora sviluppato patologie correlate all'uso di alcol.
- Ospedale: numerosi pazienti vengono ricoverati per altre cause. Identificare precocemente un bevitore problematico può essere utile per implementare una terapia efficace. 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. 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. Riconoscere ed eventualmente disintossicare il paziente con importanti problemi alcol correlati prima di ogni intervento chirurgico riduce le complicanze e i costi di ospedalizzazione.
- 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 possibili ricadute, mentre potrebbe essere utile il dosaggio dell'etilglucuronide nelle urine e dal fosfatidiletanolo (PEth) nel sangue intero.
- Sorveglianza sanitaria sul luogo di lavoro: il D.Lgs 81 del 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 visite finalizzate alla verifica di assenza di condizioni della tossicodipendenza e dell'alcol dipendenza" [19]. 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 [20]

- 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 [20].

1.8 Scopo della tesi

Lo scopo di questa tesi è quello di effettuare un confronto fra due metodiche di analisi utilizzate per la quantificazione del CDT, ovvero la cromatografia liquida su colonna (HPLC) e l'elettroforesi capillare.

È importante sottolineare che ad oggi l'*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (IFCC) ha approvato come metodica ufficiale di riferimento per questo tipo di analisi l'HPLC. Questo confronto permetterà di valutare eventuali differenze sostanziali tra le due metodiche, a partire dai risultati ottenuti dalle analisi.

Sono stati analizzati 124 campioni di siero umano, ognuno di questi è stato analizzato con entrambe le metodiche, ma a differenza dell'elettroforesi capillare che non prevede una preparazione dei campioni, l'HPLC necessita della preparazione dei campioni almeno un giorno prima dell'analisi.

2. MATERIALI E METODI

Lo studio condotto nel laboratorio di analisi cliniche Bio Lab srl di Montecchio di Vallefoglia è stato sviluppato su un'analisi in doppio di 124 campioni di siero umano, utilizzando due differenti metodiche: cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) ed elettroforesi capillare.

2.1 Cromatografia liquida ad alta prestazione

L'HPLC rappresenta l'evoluzione strumentale della cromatografia in fase liquida su colonna classica e delle tecniche ad essa collegate. Le elevate prestazioni che se ne possono ottenere giustificano il suo nome: in pochi minuti si eseguono separazioni di miscele anche molto complesse ed è anche possibile, in certe condizioni, determinare automaticamente la composizione quantitativa ed ottenere decisive informazioni sulla natura delle sostanze analizzate.

In HPLC il flusso della fase mobile, un liquido a bassa viscosità, attraverso la colonna viene assicurato da un sistema di pompe che lavorano in sincronismo. All'uscita della colonna i vari componenti del campione vengono rivelati automaticamente.

Ogni sostanza raggiunge il rilevatore ben separata (risolta) dalle altre ed inoltre tutte le sostanze escono dalla colonna in breve tempo. Affinché ci sia, una buona separazione è necessario che la fase stazionaria sia sensibile alle differenze tra le varie specie chimiche che si trovano nel campione e perciò sia in condizione di effettuare una ritenzione selettiva fra di esse, trattenendole in colonna in modo differenziato. Quindi la colonna deve possedere un'adeguata selettività facendo in modo che ad ogni sostanza corrisponda un tempo di ritenzione sufficientemente diverso dalle altre. Inoltre è indispensabile che i picchi siano sufficientemente stretti

per non sovrapporsi, in questo caso si parla di risoluzione. La capacità di mantenere stretti i picchi è detta efficienza. Selettività ed efficienza determinano il grado di risoluzione fornito dal sistema cromatografico. La condizione necessaria affinché si realizzi la separazione è che la fase stazionaria possieda una certa affinità per le sostanze contenute nel campione, determinando così il fenomeno della ritenzione. La ritenzione di una sostanza e quindi il suo tempo di permanenza in colonna è denominato tempo di ritenzione (t_R), che dipende dalla diversa affinità che tale sostanza presenta nei confronti della fase mobile e della fase stazionaria; in altre parole, non è altro che il tempo trascorso dal componente all'interno della colonna. Viene definito invece tempo morto (t_0) il tempo che trascorre tra l'iniezione e l'uscita di una sostanza non trattenuta dalla colonna e che passa attraverso la colonna alla stessa velocità con cui fluisce la fase mobile [21].

Lo strumento utilizzato in laboratorio per l'analisi mediante cromatografia liquida è Y9100 HPLC SYSTEM. Si basa su un gradiente ternario, cioè costituito da tre differenti eluenti.

Il sistema è costituito da:

- Un sistema d'iniezione in cui attraverso una valvola il campione è introdotto a monte della colonna e trascinato in essa dalla fase mobile. La valvola d'iniezione dispone di un condotto (loop) nel quale viene iniettata la giusta quantità di campione mediante una siringa.
- Un sistema di degassaggio, il quale è necessario per eliminare eventuali bolle d'aria dagli eluenti. Infatti, prima dell'uso i solventi sono trattati a vuoto per rimuoverne l'aria disciolta.

Le bolle d'aria creano problemi nelle pompe, nelle colonne e nei rilevatori. L'ossigeno disciolto assorbe la radiazione ultravioletta nell'intervallo di lunghezza d'onda di 200-250 nm, interferendo con la rilevazione ultravioletta [22].

- Gli eluenti sono tre: un eluente A rappresentato da un tampone; un eluente B rappresentato da un tampone e da una soluzione fisiologica; un eluente C rappresentato da una soluzione di lavaggio.
- Un sistema di pompe, che spingono gli eluenti nella colonna.
- Una colonna, mantenuta in frigorifero. Questa contiene la fase stazionaria che andrà a reagire con le componenti del campione e ne permetterà la separazione.
- Un rilevatore, cioè uno spettrofotometro che assorbe radiazioni nel campo dell'UV ad una lunghezza d'onda di 470 nm. Lo spettrofotometro permetterà di ottenere il grafico con i picchi relativi dei differenti componenti del campione. Il grafico rappresenta sull'asse delle x il tempo (T) e sull'asse della y il voltaggio in Elettron-Volt (eV).
- Un computer per controllare il sistema e visualizzare i risultati.

2.1.1 Preparazione dei campioni

Alla base della preparazione dei campioni c'è l'impiego di specifici kit di reagenti CHROMSYSTEMS, questi consentono la determinazione del CDT nel siero.

I kit di reagenti per la determinazione HPLC della CDT sierica in gradiente ternario sono sufficienti per 100 analisi e contengono:

- Fase mobile A
- Fase mobile B
- Fase mobile C
- Neutralisation Buffer
- Stabilisation Buffer
- Precipitation Reagent 1, liofilizzato
- Precipitation Reagent 2
- Vial di reazione

L'analisi viene condotta su siero. Poiché gli anticoagulanti, soprattutto l'EDTA, creano interferenze nella preparazione del campione e nella separazione cromatografica, l'analisi non può essere condotta su plasma. I campioni devono essere trasportati in condizioni refrigerate. A +2 /+8 °C sono stabili per un massimo di una settimana. Per conservarli più a lungo è necessario congelarli a -20 °C.

- ✓ Per ogni siero da analizzare premiscelare i seguenti volumi dei reagenti per la preparazione dei campioni:
 - 25 µl NEUTRALISATION BUFFER
 - 25 µl STABILISATION BUFFER
 - 25 µl PRECIPITATION REAGENT 1
 - 25 µl PRECIPITATION REAGENT 2.
- ✓ Mettere 200 µl di siero in un vial di reazione opportunamente contrassegnato da un numero.
- ✓ Aggiungere 100 µl di miscela di reagenti e miscelare accuratamente (60 secondi mediante vortex).
- ✓ Incubare per 60/90 minuti a +2 / +8 °C.
- ✓ Centrifugare per 10 minuti ad almeno 9000 giri.
- ✓ Diluire 200 µl del surnatante con 400 µl di acqua distillata.
- ✓ Iniettare 200 µl nel sistema HPLC.

Per effettuare un controllo di qualità dell'analisi è necessario iniettare un controllo, per documentare la precisione e l'accuratezza dell'analisi, insieme a ciascuna serie di campioni. Per quanto riguarda il controllo, questo viene sottoposto a tutte le operazioni di preparazione del campione, al pari dei campioni del paziente.

2.1.2 Acquisizione e valutazione dei dati

La valutazione dei campioni si effettua con la modalità area percentuale, che calcola la superficie del CDT (asialo e disialo transferrina) come percentuale della superficie totale di tutti i picchi.

Per calcolare l'area dei picchi viene utilizzato il metodo per integrazione. Secondo questa modalità: asialo, monosialo e disialo transferrina vengono integrate in modalità "baseline", e trisialo, tetrasialo e pentasialo transferrina in modalità "valley-valley". Come mostra la **Figura 9**.

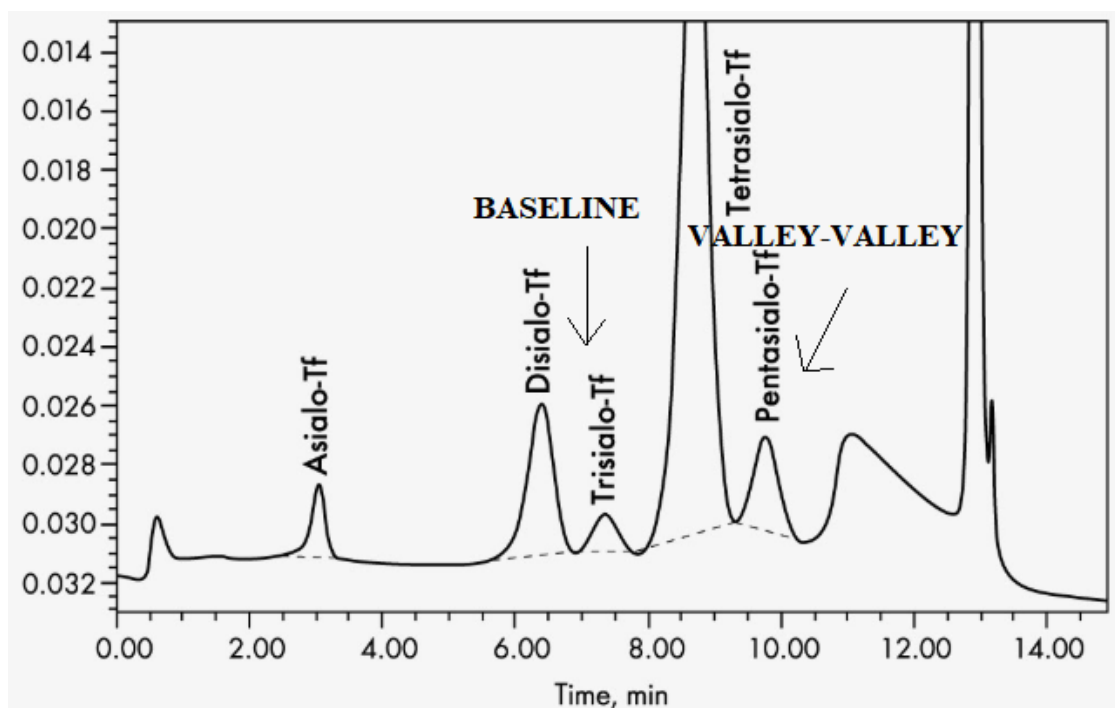


Figura 9. Cromatogramma rappresentante l'integrazione dell'area dei picchi.

2.1.3 Valori di riferimento

A seconda del metodo HPLC utilizzato e della popolazione osservata, la letteratura fornisce i seguenti valori di riferimento per gli adulti:

- CDT < 1,2% della transferrina totale = normale [23], [24].
- CDT > 2,5% della transferrina totale = patologico [25].

2.2 Elettroforesi capillare

L'elettroforesi capillare è una tecnica analitica nella quale gli analiti vengono separati sulla base delle loro differenti velocità di migrazione all'interno di un campo elettrico. Il campione viene prima caricato in un contenitore o supporto contenente un elettrolita di fondo (o tampone di corsa). Quando successivamente si applica un campo elettrico a questo sistema, gli ioni del tampone di corsa iniziano a fluire da un elettrodo all'altro fornendo la corrente necessaria per mantenere il voltaggio applicato. Allo stesso tempo, gli ioni carichi positivamente presenti nel campione si muoveranno verso l'elettrodo negativo (l'anodo), mentre gli ioni carichi negativamente si muoveranno verso l'elettrodo positivo (il catodo). Il risultato di questa migrazione è una separazione degli ioni sulla base della loro carica e delle loro dimensioni. Dal momento che numerosi campioni biologici sono caratterizzati da gruppi carichi o ionizzabili (come il DNA e le proteine), l'elettroforesi viene spesso utilizzata nei campi della ricerca biologica e medica. Tale approccio può essere adattato anche a ioni più piccoli (come Cl^- o NO_3^-) o a grandi particelle cariche (come i virus e le cellule).

Esistono diverse modalità di realizzare un'elettroforesi, una di queste prevede di separare i componenti di un campione utilizzando uno stretto capillare contenente il tampone di corsa e collocato all'interno di un campo elettrico, in questo caso si parla di elettroforesi capillare.

Nell'elettroforesi capillare tutti gli analiti devono percorrere la stessa distanza, dal punto di iniezione all'estremo opposto dove è posizionato il rilevatore. Gli analiti in questo caso vengono distinti in base al tempo impiegato a percorrere questa distanza, in maniera del tutto analoga a quanto accade nell'HPLC. Nell'elettroforesi capillare si misura il tempo di migrazione (t_m) di ciascun analita. Il risultante tracciato che descrive la risposta del rilevatore in funzione del tempo di migrazione prende il nome di elettroferogramma. I tempi di migrazione possono essere utili per l'identificazione

degli analiti, mentre l'altezza o le aree dei picchi permettono di determinare la loro concentrazione nel campione. Normalmente insieme al campione viene iniettato uno standard interno per correggere eventuali variazioni durante l'iniezione o piccole fluttuazioni delle condizioni sperimentali nel corso della separazione.

La separazione degli analiti si basa su due requisiti. Il primo è che ci deve essere qualche differenza nel modo in cui gli analiti interagiscono con il sistema di separazione. In altri termini, agli analiti devono essere associati tempi o distanze di migrazione differenti. Il secondo requisito è che le bande o i picchi degli analiti siano sufficientemente stretti da poter essere risolti. Nell'elettroforesi capillare la migrazione differenziale è il risultato dell'applicazione di un campo elettrico che determina differenti velocità di migrazione degli analiti in funzione della loro dimensione e della loro carica. La velocità complessiva di migrazione di un soluto carico dipende da due forze in opposizione. La prima (F_+) è costituita dall'attrazione che i soluti carichi sentono nei confronti dell'elettrodo di carica opposta alla loro. Tale forza dipende dall'intensità del campo elettrico applicato e dalla carica del soluto. La seconda forza che agisce sul soluto è la resistenza al suo movimento, dovuta al mezzo circostante. Questa forza di resistenza (F_-) dipende dalle dimensioni del soluto, dalla viscosità del mezzo e dalla velocità di migrazione del soluto. Quando si applica il campo elettrico, il soluto accelera verso l'elettrodo di carica opposta finché i valori assoluti delle forze non si equivalgono. A questo punto si raggiunge una fase stazionaria durante la quale il soluto si muove a velocità costante [26].

L'elettroforesi capillare è una tecnica di separazione elettroforetica degli analiti condotta all'interno di un capillare. I capillari hanno un diametro interno di 20-100 μm e una lunghezza di 20-100 cm. Grazie all'impiego di questi tubi di stretto calibro l'effetto Joule è praticamente nullo poiché il calore viene rapidamente dissipato nell'ambiente circostante. L'Effetto Joule consiste nel fenomeno di allargamento delle bande. Il processo di riscaldamento si verifica tutte le volte che un campo elettrico viene applicato ad un sistema. Il flusso della corrente genera un riscaldamento. Il calore determina un innalzamento della temperatura del sistema

elettroforetico, con un aumento della diffusione longitudinale e quindi dell'allungamento delle bande. Questo permette di ridurre l'allargamento delle bande e di ottenere quindi separazioni più veloci ed efficienti [26].

L'elettroforesi capillare richiede particolari requisiti di iniezione del campione a causa di due sue particolari caratteristiche. Innanzitutto è necessario considerare il volume limitato di un capillare per l'elettroforesi capillare. Un tipico capillare per elettroforesi lungo 25 cm e con un diametro interno di 50 μm conterrà un volume massimo di tampone di corsa di 0,5 μL . Il secondo aspetto da tenere in considerazione è l'elevata efficienza di questa tecnica. Entrambi questi fattori riducono il volume di campione che può essere iniettato senza che si verifichino significativi effetti di allargamento delle bande [26].

Per quanto riguarda il rilevamento degli analiti è necessario disporre di un sistema in grado di rilevare campioni anche molto piccoli. Tra questi vengono spesso utilizzati quelli ad assorbanza ultravioletto-visibile, a conduttanza e la spettrometria di massa [26].

Lo strumento utilizzato in laboratorio per l'analisi mediante elettroforesi capillare è il **CAPILLARYS 2 CDT SEBIA**.

Il test **CAPILLARYS CDT** è basato sul principio dell'elettroforesi capillare in fase libera. Le isoforme della transferrina sono separate all'interno di capillari in silice in base alla loro mobilità elettroforetica ed al flusso elettro-endosmotico in condizioni di alta tensione e tampone alcalino, e vengono rilevate direttamente durante la migrazione tramite assorbanza UV. Tutte le fasi analitiche vengono eseguite automaticamente. La diluizione del campione è effettuata utilizzando uno specifico diluente che consente la saturazione in ferro. Lo strumento possiede 8 capillari in silice. La migrazione avviene a temperatura accuratamente controllata grazie al dispositivo di regolazione Peltier brevettato da Sebia. Attraverso questo sistema è possibile analizzare 38 campioni all'ora.

Le apparecchiature richieste per questa tipologia di analisi sono:

- Strumento per elettroforesi capillare CAPILLARYS 2 SEBIA.
- Rack, forniti con lo strumento.
- Tanica per l'acqua distillata per il risciacquo dei capillari, flacone della soluzione di lavaggio e tanica per i reflui.
- Microprovetta da 1,5 ml.
- Provetta da emolisi da 75 mm di altezza e 13 mm di diametro.

2.2.1 Campioni per l'analisi

Per l'analisi sono raccomandati campioni di siero freschi. I campioni devono essere prelevati secondo le procedure utilizzate per le analisi cliniche di laboratorio. I campioni possono essere conservati in frigorifero (tra 2 e 8°C) fino ad un massimo di 10 giorni. Non devono essere conservati per più di 48 ore a temperatura ambiente. Per conservazioni più prolungate è necessario congelare rapidamente i campioni tra -18 e -30°C. I sieri congelati sono stabili per 12 mesi.

I campioni da sottoporre ad analisi devono essere non diluiti. Dopo la conservazione in frigorifero o il congelamento, alcuni sieri possono diventare viscosi o torbidi. In questo caso si dovrà effettuare una risospensione, dopodiché questi sieri possono essere analizzati tal quali. Anche per questa tipologia di analisi, così come per l'HPLC, è necessario utilizzare un controllo per documentare la precisione e l'accuratezza delle analisi.

I campioni da evitare per l'analisi sono:

- Campioni emolizzati. L'emolisi comporta la deformazione dei profili delle isoforme della transferrina, che rende impossibile la quantificazione del CDT.

- Campioni di siero vecchi o conservati in condizioni non ottimali.
- Campioni di plasma. Il fibrinogeno migra catodicamente rispetto all'asialotransferrina e determina una deformazione del profilo elettroforetico.
- Campioni contenenti EDTA o citrato. La deformazione del profilo elettroforetico rende impossibile la quantificazione del CDT.

2.2.2 Kit CAPILLARYS CDT

Il Kit necessario per l'esecuzione delle analisi contiene:

- ✓ Tampone
- ✓ Diluente del campione
- ✓ Soluzione di lavaggio
- ✓ Soluzione di lavaggio CDT
- ✓ Barretta di diluizione
- ✓ Barretta di lavaggio CDT
- ✓ Filtri

2.2.3 Standardizzazione

I risultati del CDT ottenuti con metodi diversi possono significativamente differire tra loro, rendendo soggetta ad errore la comparazione con risultati precedenti o intervalli di riferimento. Per medici, esperti forensi, avvocati e pazienti è preferibile comparare direttamente i risultati, indipendentemente dal metodo utilizzato. Questa incoerenza ha spinto l'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) a formare un gruppo di lavoro per la standardizzazione della misura del CDT (WG-CDT). Il lavoro sulla standardizzazione del CDT è iniziato nel 2005 e ha conseguito l'obiettivo di definire l'analita, selezionare e validare un metodo di riferimento (Reference Measurable Procedure) ed un materiale di riferimento, di proporre un cut-off utilizzando il RMP [27].

Il primo obiettivo del gruppo di lavoro WG-CDT IFCC fu quello di definire l'analita ed il misurando. Inizialmente venne presa in considerazione anche la forma di trisialo-transferrina, ma solo in seguito si comprese che questa forma non era strettamente correlata all'abuso di alcol ed inoltre comportava problematiche per l'accuratezza del test, dal momento che i campioni di siero contenenti un alto livello di trisialo-transferrina, non correlato all'uso di alcol pesante, potevano generare falsi positivi. Inoltre, il livello di monosialo-transferrina, anche se di solito rappresentava solo una piccolissima proporzione della transferrina sierica totale, non è correlato all'uso di alcol, ma è correlato bene con il livello di trisialo-transferrina. Quindi, nei casi con una concentrazione di trisialo-transferrina sierica notevolmente elevata, l'inclusione di monosialo-transferrina nella definizione e nella misurazione del CDT potrebbe anche generare un risultato falso positivo. Asialo e disialo-transferrina, d'altra parte, sono entrambi causalmente e direttamente correlati al consumo di alcol pesante in modo dose-correlato. Tuttavia, l'asialo-transferrina non è misurabile nei campioni di siero di soggetti astinenti e bevitori saltuariamente con i metodi CDT di routine attualmente utilizzati, ma diventa elevata a causa di abuso di alcol cronico ed

è rilevabile solo quando la concentrazione di disialo-transferrina è già aumentata [28]. Inoltre, poiché il lavoro di standardizzazione dovrebbe concentrarsi sulle ragioni clinicamente più rilevanti e per semplicità su di un singolo analita, la disialo-transferrina sierica è stata scelta come obiettivo singolo per la standardizzazione del CDT [29].

Per quanto riguarda il misurando per la standardizzazione del CDT da parte del WG-CDT IFCC è stato definito la disialo-transferrina in percentuale, riferita alla frazione totale di transferrina nel siero, misurata mediante HPLC con misurazione spettrofotometrica di transferrina satura di ferro a 470 nm [29].

Un secondo importante obiettivo fu quello di selezionare un metodo di riferimento per il CDT. Tra i principi chimici e le tecniche di laboratorio utilizzate per la misurazione del CDT sierico, sono stati presi in considerazione i vantaggi specifici delle procedure di misurazione basate su HPLC ed elettroforesi capillare che includono la separazione e la quantificazione dell'intero spettro delle diverse forme della transferrina. Inoltre, con entrambe le metodiche è stato possibile rilevare potenziali interferenze analitiche, tra cui una serie di varianti genetiche della transferrina e cambiamenti acquisiti nella glicosilazione della transferrina causati da grave patologia epatica. Di queste due tecniche, l'HPLC con rilevamento spettrofotometrico è stato considerato il miglior candidato come metodo di riferimento, poiché l'identificazione e la misurazione si basano sull'assorbimento relativamente specifica della transferrina satura di ferro a 470 nm. Al contrario, l'elettroforesi capillare fa sì che non si riesca a misurare l'assorbimento UV del legame peptidico a 200 nm, rendendo tali metodi suscettibili di interferenze analitiche da parte di altre biomolecole con caratteristiche elettroforetiche simili. Inoltre, la sensibilità analitica (limite di rilevabilità) dell'elettroforesi capillare è risultata inferiore rispetto all'HPLC [28].

Il metodo HPLC è stato selezionato come procedura di misurazione di riferimento (RMP) per CDT sierico, fino a quando non sarà disponibile un potenziale metodo con prestazioni migliori [29]. Questa metodologia utilizza l'integrazione di base per tutti i

picchi da asialo fino all'esasialo-transferrina e la quantità di disialo-transferrina viene calcolata come la quantità relativa (%) rispetto alla transferrina totale, in base alle aree di picco, per cui la transferrina totale rappresenta la somma delle aree di picco per asialo fino all'esasialo-transferrina [28].

Sulla base degli obiettivi del WG-CDT, è stata organizzata una rete internazionale di laboratori CDT esperti che gestiscono la metodologia di riferimento HPLC, per garantire la stabilità a lungo termine dei servizi di misurazione di riferimento. I laboratori di rete stabiliscono i valori per i parametri di calibrazione che possono essere utilizzati per la preparazione di altri materiali di riferimento CDT. Al fine di migliorare ulteriormente l'accordo sulla misurazione del CDT tra i laboratori della rete, sono state introdotte procedure operative standard e di manutenzione tecnica estesa. Per verificare che i risultati della disialo-transferrina sulla frazione totale della transferrina (%) generati dall'HPLC mostrino un accordo riproducibile tra i laboratori di rete, è stato avviato uno schema di confronto tra laboratori con campioni in cieco che è stato eseguito durante gli eventi del WG-CDT. Dall'inizio della sperimentazione sono stati condotti diversi cicli che hanno coinvolto diversi gruppi di materiali sierici pronti all'uso e liofilizzati. In questo modo nel corso del lavoro di standardizzazione del WG-CDT, l'imprecisione tra i laboratori è stata ulteriormente migliorata [30].

In ultima battuta il WG-CDT IFCC pose l'attenzione sulla ricerca di un metodo di calibrazione. Un materiale di riferimento deve essere idoneo all'uso con il maggior numero possibile di procedure di misurazione, omogenee e stabili in stoccaggio. Nel lavoro di standardizzazione del CDT, sono stati testati vari materiali di riferimento candidati congelati e liofilizzati basati su campioni di siero umano contenenti diversi livelli di disialo-transferrina a livelli di transferrina totale (%) o su un basso pool di siero CDT arricchito con disialo-transferrina isolata. Tra questi candidati, il siero congelato è risultato il più adatto come materiale di riferimento per l'uso con tutti i test CDT di routine attualmente utilizzati. È stata trovata una calibrazione multi-

livello sull'intero intervallo di misurazione, per eliminare le differenze sistematiche tra i diversi metodi CDT [31].

Tutto ciò ha apportato miglioramenti per quanto riguarda le prestazioni diagnostiche della misurazione del CDT come biomarker di consumo cronico/eccessivo di alcool, la capacità di confrontare gli studi clinici e analitici sul CDT e, ultimo ma non meno importante, migliorare la cura del paziente [28].

2.2.4 Valori di riferimento

Nella tabella seguente sono riportati tutti i valori di cut-off della CDT, sia per quanto riguarda il valore standardizzato (CDT_{IFCC}) che per il valore normale (CDT) (**Tabella 1**) [27].

	CDT	CDT_{IFCC}
VALORI DI RIFERIMENTO	$\leq 1,3\%$: risultato normale >3 e $\leq 1,7\%$: zona grigia $>1,7\%$: risultato positivo	$\leq 1,7\%$: risultato normale $>1,7$ e $\leq 2\%$: zona grigia $>2\%$: risultato positivo

Tabella 1. Valori di riferimento per l'elettroforesi capillare.

2.3 Analisi statistica

Per poter effettuare un confronto tra le due metodiche di analisi del CDT è stato utilizzato il grafico a dispersione.

Il grafico permette di visualizzare, all'interno di un piano cartesiano, il modo in cui si distribuiscono due variabili. La coppia di coordinate x e y individua un punto sul piano cartesiano e l'insieme di tutti i punti mostra il comportamento del fenomeno statistico che si sta osservando. L'insieme dei punti si disporrà nello spazio del grafico assumendo varie forme. Se l'insieme dei punti tende verso l'alto, abbiamo una correlazione positiva, cioè significa che il fenomeno conferma le nostre previsioni. Se tende verso il basso, la correlazione è negativa, perché smentisce le previsioni. Se i punti si dispongono in modo casuale significa che tra le due variabili non c'è correlazione [32].

Secondo l'andamento del grafico potremo osservare se c'è una correlazione lineare tra le due metodiche di analisi prese in considerazione.

Inoltre per poter analizzare i dati ottenuti sono stati calcolati diversi parametri statistici:

- Lo scarto relativo in percentuale calcolato tra i valori ottenuti con l'HPLC e quelli con l'elettroforesi capillare, utilizzando la formula:

$$\text{scarto relativo in \%} = \frac{X(\text{HPLC}) - X(\text{elettro})}{X(\text{HPLC})} \cdot 100$$

Dove X(HPLC) indica il valore della forma di transferrina ottenuto mediante HPLC, mentre X(elettro) indica il valore della forma di transferrina ottenuto mediante elettroforesi capillare. Il confronto viene eseguito tra le due forme di disialo-transferrina, trisialo-transferrina, tetrasialo-transferrina e pentasialo-transferrina. In questo caso più il valore ottenuto è basso, meglio è.

- Il delta ovvero la differenza tra i valori ottenuti mediante HPLC ed i valori ottenuti mediante elettroforesi capillare. Questo viene calcolato per tutte e quattro le forme di transferrina [32].

Tutti i grafici ed i calcoli riportati sono stati eseguiti mediante il foglio elettronico Microsoft Excel 2010.

3. RISULTATI

Nella tabella seguente (**Tabella 2**) sono rappresentati tutti i risultati ottenuti dall'analisi dei campioni in laboratorio. Il campione viene indicato attraverso un codice identificativo, seguito dalla rispettiva data di arrivo del campione stesso in laboratorio. Successivamente sono indicati i valori ottenuti durante le analisi. Più precisamente la terza colonna indica il valore ottenuto dall'elettroforesi capillare secondo la metodica di standardizzazione approvata dal gruppo di lavoro WG-CDT IFCC. In questo caso è presente solamente il valore della disialo-transferrina, ovvero il parametro di misurazione scelto come riferimento. I valori seguenti, relativi alle cinque forme di transferrina più presenti nel siero, sono relativi all'analisi in elettroforesi capillare (priva di standardizzazione) e in HPLC.

Questi dati permetteranno di effettuare un confronto tra le due metodiche di analisi.

Numero Campione	Data	Elettroforesi capillare (valore standardizzato)	Elettroforesi capillare (valore normale)				Cromatografia liquida ad alta prestazione			
			Disialo	Trisialo	Tetrasialo	Pentasio	Disialo	Trisialo	Tetrasialo	Pentasio
		Disialo - transferrina								
2020613671	06/02/2019	1,3%	0,7%	4,1%	84,0%	11,2%	1,1%	4,4%	90,9%	3,6%
2021419871	14/02/2019	2,3%	1,8%	5,7%	82,3%	10,2%	2,3%	6,4%	87,1%	4,2%
2021428171	15/02/2019	1,3%	0,6%	3,7%	84,6%	11,1%	1,3%	3,9%	89,4%	5,5%
2021430871	15/02/2019	1,4%	0,8%	4,2%	84,7%	10,3%	1,2%	4,6%	89,9%	4,4%
2101103071	15/02/2019	1,1%	0,5%	1,8%	87,4%	10,3%	0,8%	2,3%	92,5%	4,4%
9021905471	19/02/2019	1,4%	0,8%	4,2%	83,3%	11,7%	1,0%	4,2%	89,7%	5,1%
9021905571	19/02/2019	1,5%	0,9%	2,2%	85,4%	11,5%	1,2%	2,5%	92,6%	3,7%
9021905671	19/02/2019	2,1%	1,5%	4,1%	83,7%	10,7%	2,2%	4,7%	88,4%	4,4%
9021905771	19/02/2019	1,2%	0,6%	4,2%	83,1%	12,1%	1,5%	4,6%	90,0%	3,9%
2021906171	19/02/2019	1,5%	0,9%	3,7%	83,2%	12,2%	1,1%	3,5%	92,1%	3,3%
2021906371	19/02/2019	1,2%	0,6%	5,7%	82,4%	11,3%	0,9%	6,1%	88,0%	5,0%
2021909271	19/02/2019	1,5%	0,8%	3,5%	83,9%	11,8%	1,0%	3,1%	92,1%	3,8%
1030101571	01/03/2019	1,7%	1,1%	5,4%	81,8%	11,7%	1,8%	5,1%	89,5%	3,6%
2030103371	01/03/2019	1,4%	0,8%	3,6%	81,4%	14,2%	1,2%	3,1%	90,0%	5,7%
2030103471	01/03/2019	1,7%	1,1%	2,3%	83,9%	12,7%	1,4%	2,5%	90,8%	5,3%
2030103571	01/03/2019	2,4%	1,8%	6,1%	78,6%	13,5%	2,4%	8,7%	83,9%	5,0%
1030407271	04/03/2019	1,4%	0,7%	2,2%	83,9%	13,2%	1,6%	2,6%	88,9%	6,8%
9030502571	05/03/2019	1,2%	0,6%	1,8%	86,8%	10,8%	1,0%	2,2%	93,3%	3,5%
9030502771	05/03/2019	1,2%	0,6%	3,7%	82,4%	13,3%	1,1%	5,0%	89,0%	4,9%
9030502871	05/03/2019	1,3%	0,6%	4,3%	83,5%	11,6%	1,1%	4,1%	90,5%	4,3%
1030524801	05/03/2019	1,6%	1,0%	2,2%	82,8%	14,0%	1,6%	2,2%	88,3%	7,9%
2030619171	06/03/2019	1,4%	0,8%	3,5%	79,0%	16,7%	1,1%	4,5%	89,7%	4,6%

203061 9571	06/03/ 2019	1,9%	1,3 %	3,2 %	83,7%	11,8%	2,1%	3,2 %	90,7%	4,0%
203082 0271	08/03/ 2019	1,4%	0,7 %	4,1 %	82,4%	12,8%	1,1%	4,4 %	89,0%	5,5%
202260 0571	12/03/ 2019	1,2%	0,6 %	2,7 %	84,9%	11,8%	1,3%	2,8 %	91,2%	4,7%
203122 8371	13/03/ 2019	1,8%	1,3 %	2,8 %	80,1%	15,8%	1,4%	2,7 %	89,2%	6,7%
303142 6571	14/03/ 2019	1,5%	0,9 %	4,7 %	82,3%	12,1%	1,4%	6,0 %	87,8%	4,7%
103201 4501	20/03/ 2019	2,0%	1,4 %	4,7 %	80,3%	13,6%	2,0%	5,2 %	84,5%	8,4%
203202 9171	20/03/ 2019	1,1%	0,5 %	3,9 %	83,3%	12,3%	1,1%	5,0 %	87,9%	5,9%
203210 0371	21/03/ 2019	1,1%	0,4 %	2,2 %	80,0%	17,4%	1,1%	3,4 %	90,2%	5,4%
203210 0471	21/03/ 2019	1,3%	0,7 %	3,0 %	83,3%	13,0%	1,5%	3,7 %	91,1%	3,7%
211150 2071	22/03/ 2019	1,0%	0,4 %	2,1 %	76,8%	21,2%	1,2%	4,0 %	89,7%	5,1%
211150 2171	22/03/ 2019	1,2%	0,6 %	3,5 %	79,8%	16,1%	1,1%	4,0 %	89,8%	5,1%
211150 2371	22/03/ 2019	1,2%	0,6 %	3,4 %	83,0%	13,0%	1,1%	4,4 %	90,0%	4,5%
211150 2471	22/03/ 2019	1,4%	0,8 %	2,8 %	81,2%	15,2%	1,2%	3,0 %	91,1%	4,8%
203073 3371	22/03/ 2019	1,6%	1,0 %	3,5 %	83,4%	12,1%	1,3%	4,8 %	88,1%	5,7%
303231 5471	23/03/ 2019	1,4%	0,8 %	2,3 %	84,8%	12,1%	1,2%	2,6 %	91,4%	4,8%
203250 1071	25/03/ 2019	1,9%	1,3 %	4,3 %	75,3%	19,1%	1,9%	6,4 %	86,8%	4,9%
903260 1571	26/03/ 2019	1,4%	0,8 %	5,5 %	80,5%	13,2%	1,1%	5,9 %	87,0%	6,0%
203260 2271	26/03/ 2019	1,3%	0,6 %	4,4 %	84,4%	10,6%	1,1%	4,9 %	91,5%	2,5%
211150 2271	29/03/ 2019	1,3%	0,7 %	2,6 %	84,9%	11,8%	1,4%	3,3 %	90,8%	4,5%
204020 5571	02/04/ 2019	1,7%	1,1 %	2,9 %	83,2%	12,8%	1,2%	3,0 %	89,8%	6,0%
104040 3471	04/04/ 2019	1,5%	0,9 %	2,7 %	84,2%	12,2%	1,1%	2,6 %	91,6%	4,7%
204050 0471	05/04/ 2019	1,1%	0,4 %	2,6 %	85,7%	11,3%	1,0%	3,7 %	91,0%	4,3%
204050 0571	05/04/ 2019	1,2%	0,6 %	7,0 %	79,1%	13,3%	1,4%	7,8 %	83,6%	7,1%
204050 0671	05/04/ 2019	2,8%	2,3 %	5,2 %	82,3%	10,2%	2,6%	5,7 %	88,2%	3,6%
204012 6771	05/04/ 2019	1,3%	0,7 %	2,7 %	84,4%	12,2%	1,1%	3,0 %	90,8%	5,1%

204012 7071	05/04/ 2019	0,9%	0,2 %	6,0 %	83,4%	10,4%	1,0%	7,1 %	88,4%	3,5%
204012 7171	05/04/ 2019	1,3%	0,7 %	2,6 %	85,3%	11,4%	1,0%	3,3 %	91,8%	3,9%
204053 1371	05/04/ 2019	1,3%	0,7 %	2,1 %	84,2%	13,0%	1,1%	2,7 %	89,5%	6,6%
204100 0871	10/04/ 2019	1,2%	0,6 %	3,9 %	84,5%	11,0%	1,5%	5,2 %	88,5%	4,8%
204100 0971	10/04/ 2019	1,1%	0,5 %	5,1 %	82,0%	12,4%	1,1%	5,3 %	87,2%	6,4%
204100 1071	10/04/ 2019	1,2%	0,6 %	4,5 %	83,0%	11,9%	1,1%	4,7 %	90,7%	3,5%
204100 1171	10/04/ 2019	1,1%	0,4 %	3,5 %	83,7%	12,4%	1,3%	4,1 %	89,6%	5,0%
204111 4501	11/04/ 2019	2,8%	2,3 %	3,1 %	82,5%	12,1%	2,9%	3,4 %	88,8%	4,9%
204112 5071	11/04/ 2019	1,3%	0,6 %	2,8 %	84,0%	12,6%	1,5%	3,2 %	90,5%	4,7%
104123 7271	12/04/ 2019	1,3%	0,6 %	1,9 %	81,2%	16,3%	1,6%	3,0 %	90,9%	4,6%
304131 0071	13/04/ 2019	1,2%	0,5 %	4,6 %	85,2%	9,7%	1,1%	5,0 %	90,6%	3,3%
204093 4071	16/04/ 2019	1,3%	0,7 %	1,9 %	84,5%	12,9%	1,2%	1,6 %	89,8%	7,4%
204093 4271	17/04/ 2019	1,4%	0,7 %	3,1 %	80,0%	16,2%	1,5%	4,8 %	87,8%	5,9%
204180 0571	18/04/ 2019	1,1%	0,4 %	3,4 %	83,6%	12,6%	1,2%	4,6 %	89,5%	4,7%
204093 4371	18/04/ 2019	1,4%	0,8 %	4,3 %	82,7%	12,2%	1,4%	5,5 %	88,4%	4,7%
204172 9671	18/04/ 2019	1,1%	0,5 %	4,6 %	83,7%	11,2%	0,7%	5,5 %	87,6%	6,3%
204093 4901	19/04/ 2019	2,7%	2,2 %	2,2 %	83,9%	11,7%	2,6%	2,3 %	89,4%	5,6%
904230 1471	23/04/ 2019	3,9%	3,5 %	3,7 %	80,0%	12,6%	3,6%	5,0 %	83,7%	7,6%
304261 5401	26/04/ 2019	1,3%	0,7 %	4,3 %	84,6%	10,4%	1,4%	6,8 %	86,9%	4,9%
204291 0371	29/04/ 2019	1,3%	0,7 %	3,7 %	83,9%	11,7%	0,9%	3,9 %	89,9%	5,3%
205030 7271	03/05/ 2019	1,2%	0,5 %	4,9 %	81,9%	12,7%	1,4%	5,3 %	87,7%	5,7%
205061 5071	06/05/ 2019	1,2%	0,5 %	2,9 %	83,7%	12,9%	1,3%	3,5 %	89,2%	6,1%
305073 0471	07/05/ 2019	1,2%	0,6 %	3,5 %	84,1%	11,8%	1,5%	4,0 %	89,0%	5,5%
205080 4471	08/05/ 2019	1,6%	1,0 %	4,6 %	82,7%	11,7%	1,4%	5,1 %	89,0%	4,5%
205091 1971	09/05/ 2019	1,3%	0,7 %	5,1 %	84,0%	10,2%	1,1%	5,3 %	88,4%	5,2%

205091 3271	09/05/ 2019	1,2%	0,5 %	4,0 %	84,4%	11,1%	1,0%	4,6 %	88,7%	5,7%
205083 0871	09/05/ 2019	1,1%	0,5 %	6,8 %	80,5%	12,2%	1,2%	6,7 %	84,5%	7,5%
205083 0971	09/05/ 2019	1,4%	0,8 %	2,1 %	78,3%	18,8%	1,7%	2,5 %	88,5%	7,3%
205100 9771	10/05/ 2019	1,2%	0,5 %	2,6 %	85,1%	11,8%	1,1%	3,0 %	89,2%	6,8%
205101 8771	10/05/ 2019	1,3%	0,7 %	2,3 %	83,8%	13,2%	1,3%	3,0 %	89,2%	6,6%
205101 9571	10/05/ 2019	1,0%	0,3 %	4,4 %	74,6%	20,7%	1,2%	5,4 %	87,3%	6,1%
205140 2871	14/05/ 2019	1,4%	0,8 %	5,7 %	82,7%	10,8%	1,3%	6,0 %	85,7%	6,9%
205142 2371	14/05/ 2019	1,4%	0,8 %	3,2 %	84,8%	0,8%	1,1%	3,8 %	90,2%	4,9%
205150 9471	15/05/ 2019	1,4%	0,8 %	3,7 %	82,3%	13,2%	1,1%	4,2 %	87,8%	6,9%
205150 9571	15/05/ 2019	1,2%	0,5 %	3,9 %	82,7%	12,9%	1,4%	4,7 %	86,5%	7,4%
205090 7371	15/05/ 2019	1,5%	0,8 %	3,4 %	86,3%	9,5%	1,3%	3,6 %	91,0%	4,0%
205160 3671	16/05/ 2019	1,2%	0,6 %	5,3 %	83,6%	10,5%	1,5%	6,3 %	87,3%	4,9%
205163 7371	17/05/ 2019	1,3%	0,7 %	2,8 %	84,7%	11,8%	1,3%	3,6 %	90,0%	5,1%
205110 0371	17/05/ 2019	1,7%	1,1 %	2,9 %	82,7%	13,3%	1,6%	3,7 %	88,7%	6,1%
205163 7171	18/05/ 2019	1,1%	0,5 %	4,9 %	83,4%	11,2%	1,0%	6,4 %	88,4%	4,1%
205163 7071	18/05/ 2019	1,3%	0,7 %	3,0 %	85,4%	10,9%	1,1%	2,9 %	92,4%	3,5%
205163 7271	18/05/ 2019	1,3%	0,6 %	3,2 %	85,8%	10,4%	1,5%	3,6 %	90,0%	5,0%
205162 7871	20/05/ 2019	1,4%	0,8 %	3,1 %	83,7%	12,4%	1,5%	3,2 %	88,3%	7,0%
205162 7771	20/05/ 2019	1,4%	0,8 %	4,1 %	83,2%	11,9%	1,6%	4,0 %	90,2%	4,2%
205203 3471	21/05/ 2019	1,3%	0,7 %	4,0 %	85,1%	10,2%	0,7%	3,6 %	91,6%	4,1%
205070 1472	21/05/ 2019	1,3%	0,7 %	5,1 %	82,3%	11,9%	1,2%	6,2 %	88,4%	4,2%
205223 2371	24/05/ 2019	1,4%	0,8 %	2,8 %	85,4%	11,0%	1,1%	3,4 %	91,7%	3,8%
205223 2271	25/05/ 2019	1,4%	0,8 %	3,2 %	84,9%	11,1%	1,6%	3,4 %	90,7%	4,3%
205213 3871	25/05/ 2019	0,9%	0,3 %	2,9 %	83,5%	13,3%	1,1%	4,0 %	88,1%	6,8%
205213 4001	25/05/ 2019	1,3%	0,6 %	4,2 %	84,3%	10,9%	0,8%	4,6 %	89,4%	5,2%

205142 8171	25/05/ 2019	1,4%	0,7 %	0,9 %	86,3%	12,1%	1,0%	1,9 %	90,2%	7,0%
205271 0771	27/05/ 2019	1,2%	0,6 %	3,4 %	85,4%	10,6%	1,4%	4,6 %	87,7%	6,3%
206040 0671	04/06/ 2019	2,7%	2,2 %	4,7 %	80,1%	13,0%	2,8%	5,0 %	85,4%	6,8%
106072 3171	07/06/ 2019	1,1%	0,5 %	2,9 %	79,6%	17,0%	1,5%	4,5 %	86,2%	7,8%
206080 4371	08/06/ 2019	2,2%	1,6 %	3,5 %	78,8%	16,1%	1,8%	2,5 %	88,5%	7,2%
206073 5201	08/06/ 2019	4,5%	4,2 %	5,7 %	78,7%	10,7%	4,5%	5,2 %	85,9%	4,4%
205203 3371	12/06/ 2019	1,4%	0,7 %	4,1 %	82,7%	12,5%	1,7%	4,5 %	88,2%	5,6%
206073 5401	15/06/ 2019	2,6%	2,1 %	4,3 %	81,2%	12,4%	2,3%	5,1 %	87,8%	4,8%
106170 9571	17/06/ 2019	1,3%	0,6 %	3,5 %	84,2%	11,7%	1,1%	4,0 %	90,2%	4,7%
206180 8071	18/06/ 2019	1,2%	0,6 %	3,5 %	82,9%	13,0%	1,0%	3,3 %	89,3%	6,4%
206190 3371	19/06/ 2019	1,6%	1,0 %	4,4 %	82,6%	12,0%	1,4%	5,0 %	87,8%	5,9%
205110 0271	19/06/ 2019	1,3%	0,7 %	4,4 %	83,7%	11,2%	1,0%	4,6 %	90,1%	4,2%
206200 2371	20/06/ 2019	1,5%	0,9 %	4,3 %	83,3%	11,5%	1,2%	4,3 %	90,7%	3,8%
106210 2201	21/06/ 2019	1,6%	1,0 %	3,5 %	86,8%	8,7%	1,3%	3,3 %	93,6%	1,8%
206220 0671	21/06/ 2019	1,7%	1,1 %	1,5 %	84,9%	12,5%	1,5%	1,8 %	90,5%	6,2%
205310 3671	25/06/ 2019	1,6%	1,0 %	3,3 %	82,0%	13,7%	1,5%	4,2 %	88,6%	5,7%
206150 0471	26/06/ 2019	1,4%	0,8 %	3,5 %	83,4%	12,3%	1,1%	4,4 %	90,8%	3,6%
207040 4171	04/07/ 2019	1,3%	0,6 %	2,8 %	86,3%	10,3%	1,3%	3,9 %	88,1%	6,8%
207010 3101	06/07/ 2019	1,9%	1,3 %	4,9 %	82,5%	11,3%	1,9%	5,0 %	87,9%	5,3%
207010 3201	06/07/ 2019	2,3%	1,8 %	6,1 %	81,5%	10,6%	2,1%	6,5 %	86,7%	4,8%
107090 9701	09/07/ 2019	1,4%	0,8 %	3,9 %	83,4%	11,9%	1,4%	5,0 %	87,8%	5,8%
207031 9171	09/07/ 2019	3,3%	2,8 %	4,1 %	81,0%	11,8%	3,2%	5,3 %	89,3%	2,1%
207033 0371	09/07/ 2019	1,4%	0,8 %	2,3 %	84,2%	12,7%	1,5%	2,9 %	89,8%	5,8%
207033 0471	09/07/ 2019	1,4%	0,7 %	3,1 %	85,2%	11,0%	1,6%	4,1 %	88,7%	5,6%
207100 5571	10/07/ 2019	1,0%	0,4 %	4,7 %	83,6%	11,3%	0,9%	5,9 %	88,4%	4,8%

207101 0071	10/07/ 2019	1,2%	0,6 %	3,9 %	84,8%	10,7%	1,1%	5,6 %	88,6%	4,7%
203121 8171	12/03/ 2019	mutazione //	//	//	//	//	//	//	//	//

Tabella 2. Risultati ottenuti mediante le due metodiche di analisi del CDT.

Il risultato più sorprendente è stata la presenza, tra i 124 campioni, di una mutazione della transferrina, mutazioni che solitamente sono piuttosto rare nella popolazione. È da precisare che la mutazione è stata riscontrata con entrambe le metodiche di analisi, ma in questo caso non è stato possibile confermare alcun risultato, per evitare falsi positivi.

Nella **Figura 10** sono rappresentati i grafici ottenuti dall'analisi dello stesso campione con la mutazione. Nella parte superiore è presente il grafico ottenuto dall'HPLC, di seguito quello ottenuto dall'elettroforesi capillare.

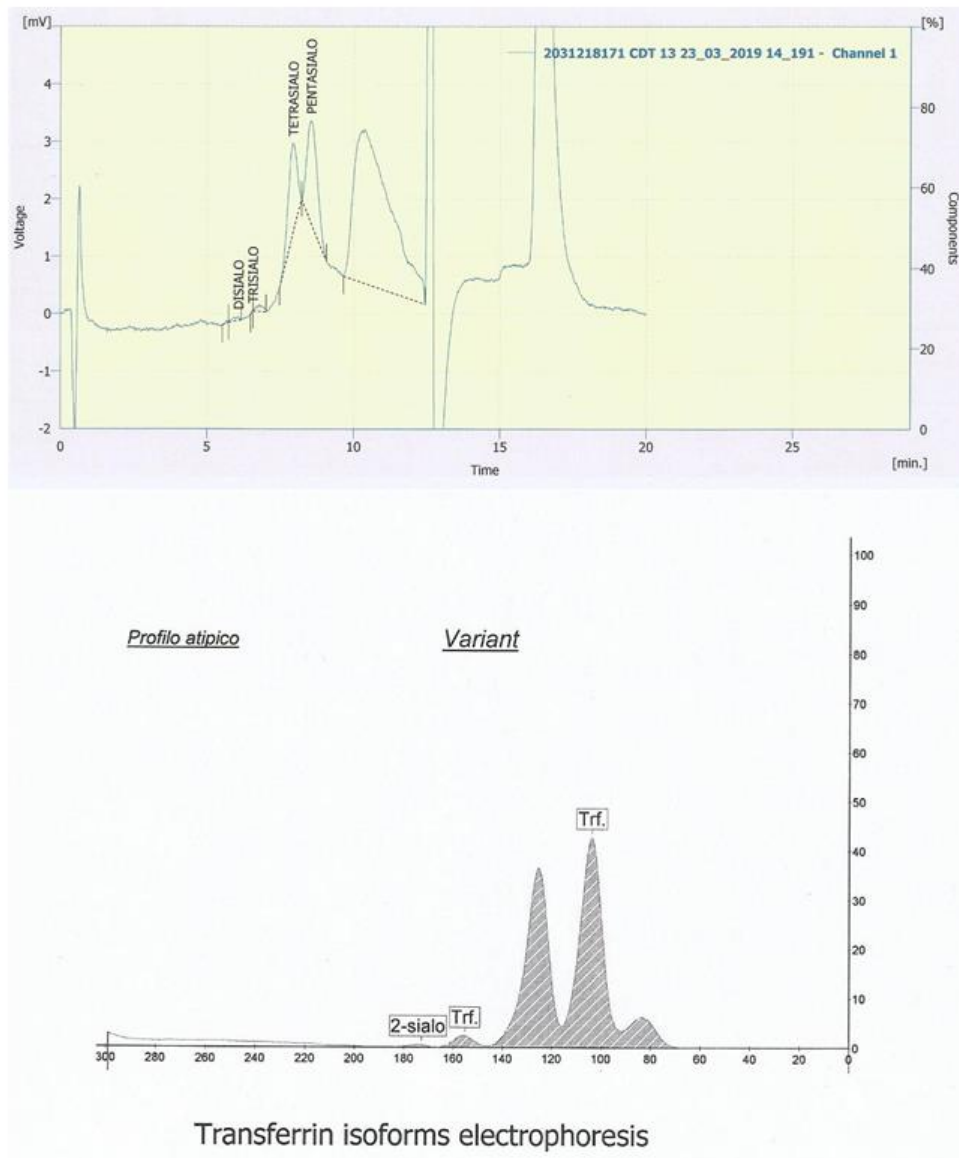


Figura 10. Rappresentazione grafica della mutazione. In alto è rappresentato il grafico ottenuto mediante HPLC, in basso quello ottenuto mediante elettrodoresi capillare.

Di seguito sono raffigurati alcuni esempi di grafici ottenuti dalle due metodiche di analisi.

Nella **Figura 11** è raffigurato il grafico relativo ad un campione risultato negativo al test del CDT.

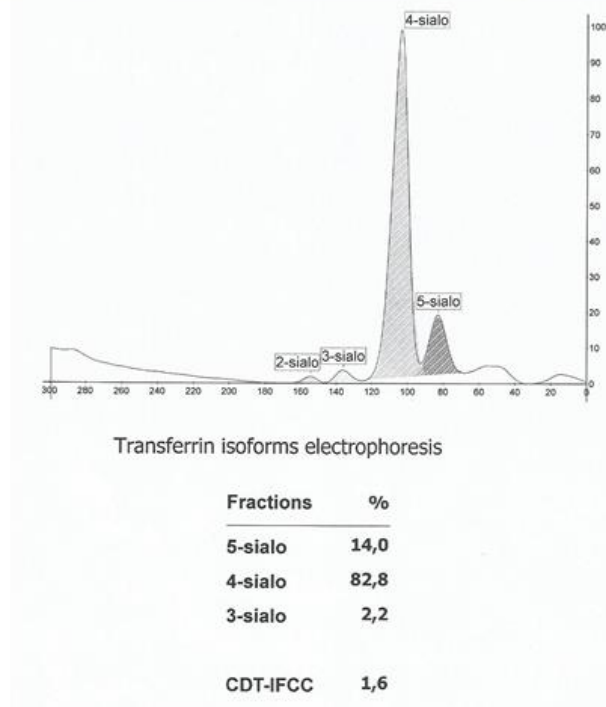
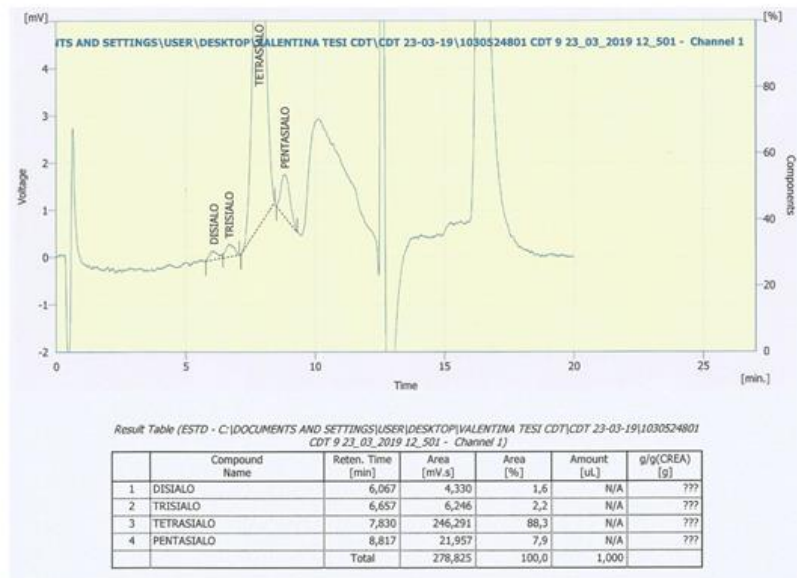


Figura 11. Rappresentazione grafica di un campione risultato negativo all'analisi. In alto è presente il grafico ottenuto mediante HPLC, in basso quello ottenuto mediante elettroforesi capillare.

Nella **Figura 12** è raffigurato un campione risultato positivo al test. Inoltre essendo il valore del CDT_{IFCC} (valore ottenuto con la standardizzazione) piuttosto elevato è possibile notare la presenza anche dell'asialo-transferrina, forma che normalmente non mai presente.

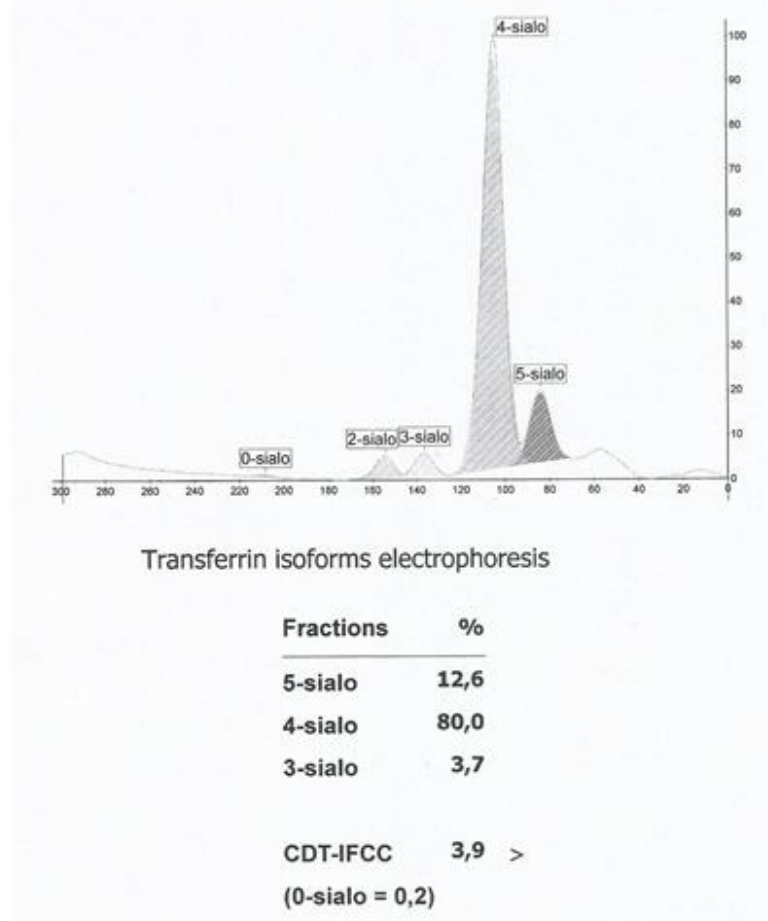
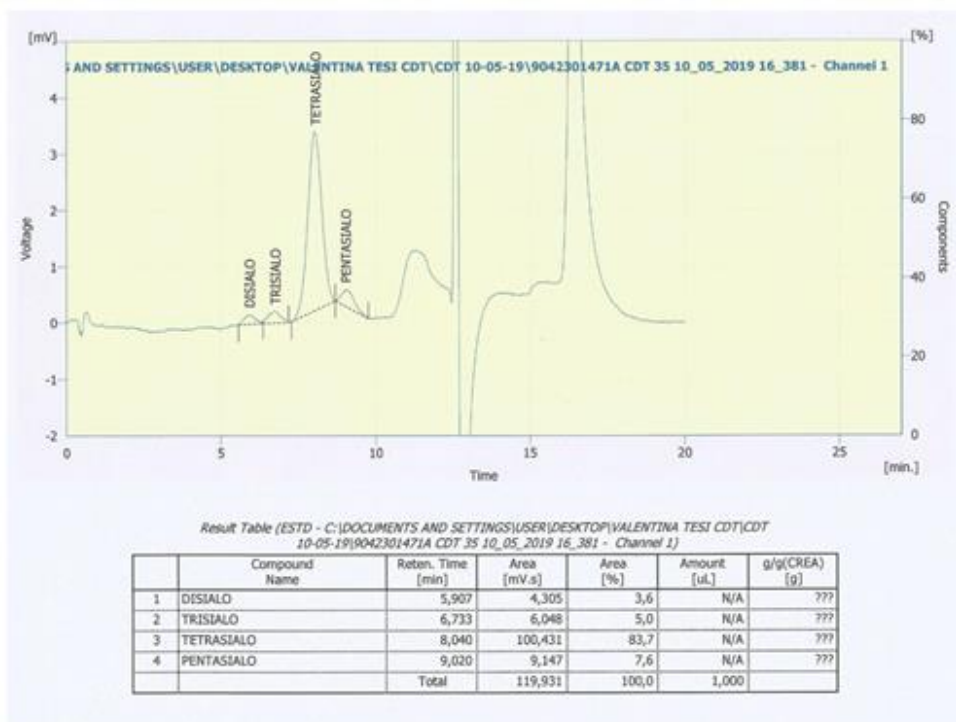


Figura 12. Rappresentazione grafica di un campione risultato positivo all'analisi. In alto è presente il grafico ottenuto mediante HPLC, in basso quello ottenuto mediante elettroforesi capillare.

4. DISCUSSIONE DEI RISULTATI

Lo scopo della tesi è quello di effettuare un confronto tra le due metodiche di analisi utilizzate per determinare il livello del CDT nel siero. Di seguito verranno evidenziate le principali somiglianze e differenze.

È importante sottolineare che in questo confronto non è stato preso in considerazione il campione che ha presentato la mutazione in quanto non è possibile dare un risultato sicuro. Inoltre l'oggetto di maggiore attenzione sarà la forma di disialo-transferrina, l'analita scelto come riferimento per la determinazione del CDT sierico.

Innanzitutto è stato calcolato lo scarto relativo in percentuale, che permette di valutare la dispersione dei valori ottenuti, confrontando i dati relativi allo stesso parametro con entrambe le metodiche (**Tabella 3**).

Disialo (HPLC-elettro)	Disialo (HPLC-elettroIFCC)	Trisialo (HPLC-elettro)	Tetrasialo (HPLC-elettro)	Pentasio (HPLC-elettro)
36,36	-18,18	6,82	7,59	-211,11
21,74	0,00	10,94	5,51	-142,86
53,85	0,00	5,13	5,37	-101,82
33,33	-16,67	8,70	5,78	-134,09
37,50	-37,50	21,74	5,51	-134,09
20,00	-40,00	0,00	7,13	-129,41
25,00	-25,00	12,00	7,78	-210,81
31,82	4,55	12,77	5,32	-143,18
60,00	20,00	8,70	7,67	-210,26
18,18	-36,36	-5,71	9,66	-269,70
33,33	-33,33	6,56	6,36	-126,00

20,00	-50,00	-12,90	8,90	-210,53
38,89	5,56	-5,88	8,60	-225,00
33,33	-16,67	-16,13	9,56	-149,12
21,43	-21,43	8,00	7,60	-139,62
25,00	0,00	29,89	6,32	-170,00
56,25	12,50	15,38	5,62	-94,12
40,00	-20,00	18,18	6,97	-208,57
45,45	-9,09	26,00	7,42	-171,43
45,45	-18,18	-4,88	7,73	-169,77
37,50	0,00	0,00	6,23	-77,22
27,27	-27,27	22,22	11,93	-263,04
38,10	9,52	0,00	7,72	-195,00
36,36	-27,27	6,82	7,42	-132,73
53,85	7,69	3,57	6,91	-151,06
7,14	-28,57	-3,70	10,20	-135,82
35,71	-7,14	21,67	6,26	-157,45
30,00	0,00	9,62	4,97	-61,90
54,55	0,00	22,00	5,23	-108,47
63,64	0,00	35,29	11,31	-222,22
53,33	13,33	18,92	8,56	-251,35
66,67	16,67	47,50	14,38	-315,69
45,45	-9,09	12,50	11,14	-215,69
45,45	-9,09	22,73	7,78	-188,89
33,33	-16,67	6,67	10,87	-216,67
23,08	-23,08	27,08	5,33	-112,28
33,33	-16,67	11,54	7,22	-152,08
31,58	0,00	32,81	13,25	-289,80

27,27	-27,27	6,78	7,47	-120,00
45,45	-18,18	10,20	7,76	-324,00
50,00	7,14	21,21	6,50	-162,22
8,33	-41,67	3,33	7,35	-113,33
18,18	-36,36	-3,85	8,08	-159,57
60,00	-10,00	29,73	5,82	-162,79
57,14	14,29	10,26	5,38	-87,32
11,54	-7,69	8,77	6,69	-183,33
36,36	-18,18	10,00	7,05	-139,22
80,00	10,00	15,49	5,66	-197,14
30,00	-30,00	21,21	7,08	-192,31
36,36	-18,18	22,22	5,92	-96,97
60,00	20,00	25,00	4,52	-129,17
54,55	0,00	3,77	5,96	-93,75
45,45	-9,09	4,26	8,49	-240,00
69,23	15,38	14,63	6,58	-148,00
20,69	3,45	8,82	7,09	-146,94
60,00	13,33	12,50	7,18	-168,09
62,50	18,75	36,67	10,67	-254,35
54,55	-9,09	8,00	5,96	-193,94
41,67	-8,33	-18,75	5,90	-74,32
53,33	6,67	35,42	8,88	-174,58
66,67	8,33	26,09	6,59	-168,09
42,86	0,00	21,82	6,45	-159,57
28,57	-57,14	16,36	4,45	-77,78
15,38	-3,85	4,35	6,15	-108,93
2,78	-8,33	26,00	4,42	-65,79

50,00	7,14	36,76	2,65	-112,24
22,22	-44,44	5,13	6,67	-120,75
64,29	14,29	7,55	6,61	-122,81
61,54	7,69	17,14	6,17	-111,48
60,00	20,00	12,50	5,51	-114,55
28,57	-14,29	9,80	7,08	-160,00
36,36	-18,18	3,77	4,98	-96,15
50,00	-20,00	13,04	4,85	-94,74
58,33	8,33	-1,49	4,73	-62,67
52,94	17,65	16,00	11,53	-157,53
54,55	-9,09	13,33	4,60	-73,53
46,15	0,00	23,33	6,05	-100,00
75,00	16,67	18,52	14,55	-239,34
38,46	-7,69	5,00	3,50	-56,52
27,27	-27,27	15,79	5,99	83,67
27,27	-27,27	11,90	6,26	-91,30
64,29	14,29	17,02	4,39	-74,32
38,46	-15,38	5,56	5,16	-137,50
60,00	20,00	15,87	4,24	-114,29
46,15	0,00	22,22	5,89	-131,37
31,25	-6,25	21,62	6,76	-118,03
50,00	-10,00	23,44	5,66	-173,17
36,36	-18,18	-3,45	7,58	-211,43
60,00	13,33	11,11	4,67	-108,00
46,67	6,67	3,13	5,21	-77,14
50,00	12,50	-2,50	7,76	-183,33
0,00	-85,71	-11,11	7,10	-148,78

41,67	-8,33	17,74	6,90	-183,33
27,27	-27,27	17,65	6,87	-189,47
50,00	12,50	5,88	6,39	-158,14
72,73	18,18	27,50	5,22	-95,59
25,00	-62,50	8,70	5,70	-109,62
30,00	-40,00	52,63	4,32	-72,86
57,14	14,29	26,09	2,62	-68,25
21,43	3,57	6,00	6,21	-91,18
66,67	26,67	35,56	7,66	-117,95
11,11	-22,22	-40,00	10,96	-123,61
6,67	0,00	-9,62	8,38	-143,18
58,82	17,65	8,89	6,24	-123,21
8,70	-13,04	15,69	7,52	-158,33
45,45	-18,18	12,50	6,65	-148,94
40,00	-20,00	-6,06	7,17	-103,13
28,57	-14,29	12,00	5,92	-103,39
30,00	-30,00	4,35	7,10	-166,67
25,00	-25,00	0,00	8,16	-202,63
23,08	-23,08	-6,06	7,26	-383,33
26,67	-13,33	16,67	6,19	-101,61
33,33	-6,67	21,43	7,45	-140,35
27,27	-27,27	20,45	8,15	-241,67
53,85	0,00	28,21	2,04	-51,47
31,58	0,00	2,00	6,14	-113,21
14,29	-9,52	6,15	6,00	-120,83
42,86	0,00	22,00	5,01	-105,17
12,50	-3,13	22,64	9,29	-461,90

46,67	6,67	20,69	6,24	-118,97
56,25	12,50	24,39	3,95	-96,43
55,56	-11,11	20,34	5,43	-135,42
45,45	-9,09	30,54	4,29	-127,66

Tabella 3. Valori relativi al calcolo dello scarto relativo in percentuale.

Il primo grafico di dispersione che è stato analizzato è quello relativo ai valori di diasialo-transferrina ottenuti mediante HPLC ed elettroforesi capillare IFCC, ovvero secondo le procedure di standardizzazione (**Figura 13**).

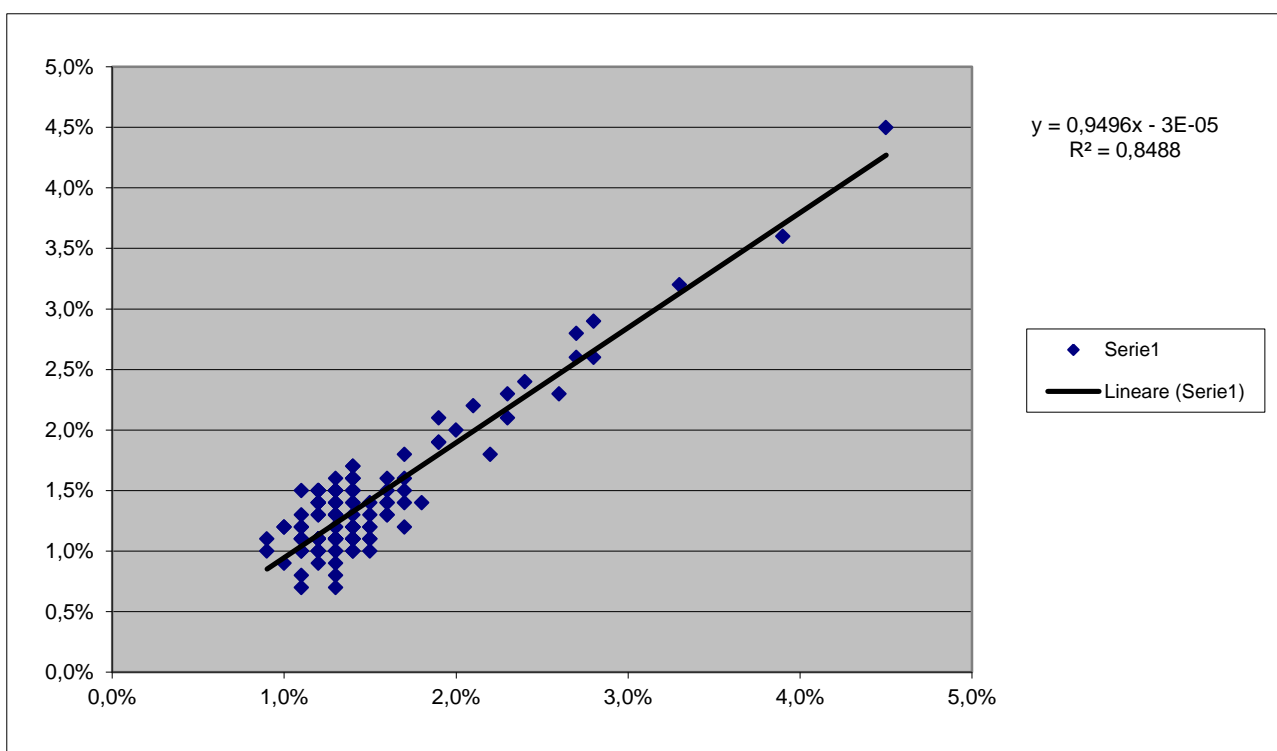


Figura 13. Grafico di dispersione x;y tra i valori di diasialo-transferrina ottenuti con HPLC ed elettroforesi capillare con procedura standardizzata.

Il grafico mostra una buona linearità nella zona di maggiore interesse, cioè valori di CDT compresi tra 1,9 e 2,9, range in cui sono presenti i valori positivi. La linearità è

peggiore per valori piuttosto bassi di disialo-transferrina, cioè i valori inferiori all'1,9, che rappresentano tutti i negativi al test.

Prendendo in considerazione il valore di R^2 , ovvero del coefficiente di determinazione, possiamo affermare che risulta essere soddisfacente, in quanto è di 0,84. Il coefficiente di determinazione indica la relazione tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato. R^2 varia tra 0 e 1, dove 0 indica che manca correlazione tra il modello statistico ed i dati, mentre 1 indica che c'è una perfetta correlazione [32].

Nella Figura 13 si può notare che vengono rappresentati un numero di punti sul grafico inferiore rispetto all'effettivo numero dei campioni analizzati, questo è spiegato dal fatto che molti campioni presentano gli stessi valori di disialo-transferrina perciò in questo caso i punti si sovrappongono.

Un secondo grafico è stato analizzato confrontando i valori di disialo-transferrina ottenuti mediante HPLC ed elettroforesi capillare con procedura non standardizzata (**Figura 14**).

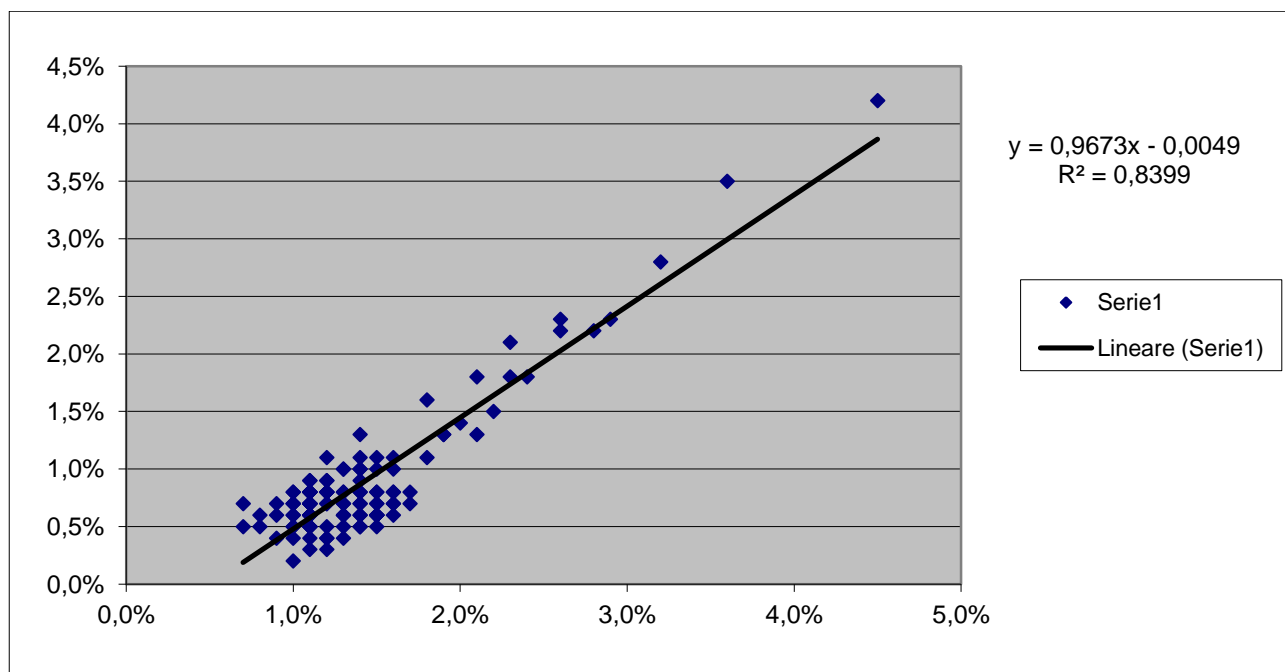


Figura 14. Grafico di dispersione x;y tra i valori di diasialo-transferrina ottenuti con HPLC ed elettroforesi capillare con procedura non standardizzata.

Il grafico è molto simile al precedente, simile è anche l' $R^2 = 0,83$ che anche in questo caso può essere considerato un buon valore. Da questo si può dedurre che la standardizzazione della metodica non è così particolarmente significativa ai fini della linea di tendenza.

Una differenza che è emersa tra i due grafici è che l'elettroforesi capillare senza la standardizzazione è comunque lineare ma assume valori sempre più bassi rispetto alla metodica standardizzata.

Un'ulteriore differenza emerge anche dal calcolo dei delta tra i valori di disialo-transferrina tra HPLC ed elettroforesi capillare standardizzata e quelli tra HPLC ed elettroforesi capillare non standardizzata (**Tabella 4**).

Delta Disialo-Tf HPLC-elettro IFCC	Delta Diasialo-Tf HPLC-elettro
-0,4%	1,0%
-0,3%	0,9%
-0,3%	1,0%
-0,3%	0,9%
-0,3%	0,9%
-0,3%	1,0%
-0,3%	0,9%
-0,3%	0,9%
-0,2%	0,9%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,9%
-0,2%	0,9%
-0,2%	0,9%
-0,2%	0,9%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,9%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,8%
-0,2%	0,9%
-0,2%	0,9%
-0,1%	0,6%
-0,1%	0,7%
-0,1%	0,7%

-0,1%	0,8%
-0,1%	0,8%
-0,1%	0,8%
-0,1%	0,7%
-0,1%	0,6%
-0,1%	0,7%
-0,1%	0,8%
-0,1%	0,7%
-0,1%	0,7%
-0,1%	0,7%
-0,1%	0,7%
0,0%	0,5%
0,0%	0,7%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,7%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,0%	0,3%
0,0%	0,7%
0,0%	0,6%
0,0%	0,6%
0,1%	0,5%
0,1%	0,5%
0,1%	0,5%
0,1%	0,5%
0,1%	0,5%

0,1%	0,5%
0,1%	0,6%
0,1%	0,5%
0,1%	0,6%
0,1%	0,5%
0,1%	0,6%
0,1%	0,5%
0,1%	0,5%
0,1%	0,5%
0,1%	0,4%
0,1%	0,5%
0,1%	0,5%
0,1%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,3%
0,2%	0,3%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,5%
0,2%	0,5%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,2%	0,5%
0,2%	0,5%
0,2%	0,4%
0,2%	0,5%
0,2%	0,4%

0,2%	0,4%
0,2%	0,4%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,4%
0,3%	0,3%
0,3%	0,2%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,3%
0,3%	0,1%
0,4%	0,2%
0,4%	0,2%
0,4%	0,2%
0,4%	0,3%
0,4%	0,2%
0,4%	0,2%
0,4%	0,2%
0,4%	0,1%
0,5%	0,2%
0,5%	0,2%
0,5%	0,1%
0,6%	0,0%

Tabella 4. Delta tra Disialo-Tf HPLC ed elettro IFCC e Disialo-Tf tra HPLC ed elettro non IFCC.

Come si può notare, il delta tra i valori di disialo-transferrina dell'HPLC e dell'elettroforesi capillare priva di standardizzazione risulta sempre più alto del primo.

Ma ciò che colpisce è che la deviazione standard dei due delta è la stessa, quindi anche sebbene i loro delta siano differenti, c'è una buona correlazione tra le metodiche, soprattutto tra le forme di elettroforesi capillare standardizzata e non (**Tabella 5**).

Deviazione standard Delta Disialo-Tf HPLC-elettro IFCC	Deviazione Standard Delta Diasialo-Tf HPLC-elettro
0,2%	0,2%

Tabella 5. Deviazione Standard dei delta della Tabella 3.

Un ultimo grafico è stato analizzato ponendo in correlazione i valori di disialo-transferrina ottenuti entrambi dall'elettroforesi capillare, di cui uno sarà corrispondente alla metodica standardizzata (IFCC), l'altro sarà relativo all'elettroforesi capillare senza la standardizzazione (**Figura 15**).

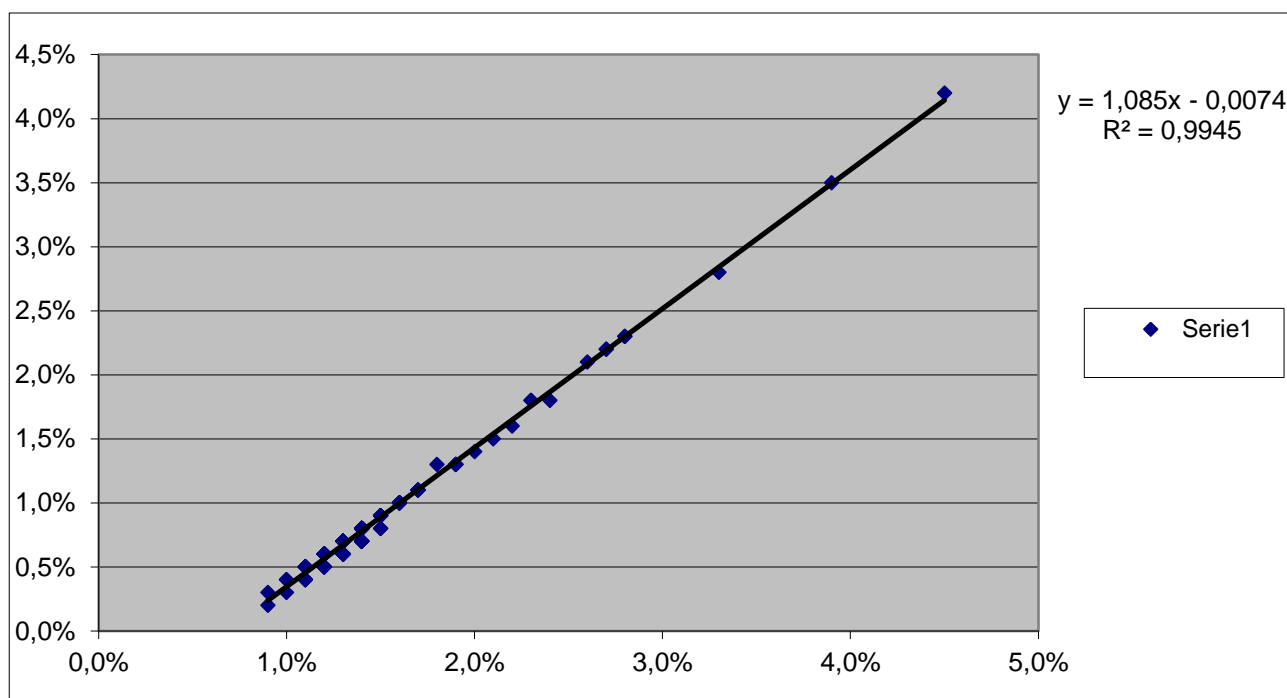


Figura 15. Grafico di dispersione x;y tra i valori di disialo-transferrina ottenuti mediante elettroforesi capillare standardizzata e non standardizzata.

In questo caso c'è molta linearità. Possiamo addirittura dedurre la presenza di un valore fisso, dato dall'equazione della retta: $y = 1,085x - 0,0074$. È come se si debba sempre sommare 0,7 al valore dato dall'elettroforesi capillare senza la standardizzazione per ottenere il valore di CDT standardizzato. Infatti l'elettroforesi capillare priva di standardizzazione sottostima sempre di 0,74 il valore di CDT_{IFCC} . Questo è visibile anche dal fatto che il grafico è lineare, ma la linea di tendenza non va mai a 0, bensì arriva a 0,7. Ciò si può notare anche nei primi due grafici, nei quali le linee di tendenza sono molto simili, ma l'unica differenza è che nel secondo caso la linea è traslata di 0,74.

5. CONCLUSIONI

Dalle analisi riscontrate in laboratorio è possibile affermare che con entrambe le metodiche di analisi, elettroforesi capillare ed HPLC, sono stati ottenuti buoni risultati, tenendo a precisare che l'elettroforesi capillare non rappresenta la metodologia di analisi di riferimento.

Una similitudine che emerge dai dati ottenuti dalle due metodiche è la buona linearità dei valori positivi, a differenza della maggiore dispersione dei dati nell'area riferita ai valori negativi. Per questo motivo si potrebbe affermare che la standardizzazione non è particolarmente significativa ai fini della linea di tendenza.

La differenza sostanziale emerge nel paragone tra l'elettroforesi capillare standardizzata e quella priva di standardizzazione. In questo caso è stato notato che l'elettroforesi capillare priva di standardizzazione presenta valori sempre più bassi rispetto alla metodica standardizzata. Infatti, oltre all'ottima linearità, è possibile notare come la retta sia traslata di 0,74. Ed è proprio questo 0,74 che potrebbe essere il valore fisso da sommare al dato ottenuto dall'elettroforesi capillare non standardizzata per ottenere il valore di CDT derivante dalla metodica standardizzata.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Siliprandi & Tettamanti “*Biochimica medica strutturale, metabolica e funzionale*”. Padova, Piccin (2014), IV Edizione.
- [2] Istituto Nazionale di Statistica, 15 Maggio 2019.
- [3] Global status report on alcohol and health, 2018, World Health Organization.
- [4] Ministero della Salute, Alcol. Data pubblicazione: 21 Febbraio 2013, Ultimo aggiornamento: 7 Maggio 2019.
- [5] ACI. Articolo 186 e 186 bis del Codice della Strada.
- [6] Polizia Locale di Rimini. Art.379 del Codice della Strada.
- [7] Mancinelli R., Guiducci M.S.; La donna e l'alcol: vulnerabilità biologica?; Ann.Ist. Super Sanità 2004;40(1):19-23.
- [8] Fetal Alcohol Spectrum Disorders Program (2018 American Academy of Pediatrics).
- [9] Ministero della Salute, Alcolismo. Data pubblicazione: 22 Febbraio 2013, Ultimo aggiornamento: 7 Maggio 2019.

[10] Alba Rocco, Debora Compare, Debora Angrisani, Marco Sanduzzi Zamparelli, and Gerardo Nardone; “*Alcoholic disease: Liver and beyond*”. World J Gastroenterol. 2014 Oct 28; 20(40): 14652–14659.

[11] Denooz R, Deville M, Charlier C; “*Biological markers of alcohol consumption*”. Rev Med Liege. 2019 May;74(5-6):268-273.

[12] Transferrina carboidrato-carente (CDT): strategie analitiche ed interpretative Documento di consenso delle Società Scientifiche SIBioC e Gruppo Tossicologi Forensi Italiani afferente alla Società Italiana di Medicina Legale e delle Assicurazioni (GTFI-SIMLA) Gruppo di lavoro SIBioC: V. Bianchi, R. Pacifici, I. Palmi, S. Pichini, A. Vernocchi, G. Merlini, F. Ceriotti, M. Plebani. Gruppo di lavoro GFTI-SIMLA: F. Tagliaro, M. Bernini, F. Bortolotti, M. Caligara, P. Cassandro, N. De Giovanni, R. Snenghi, E. Bertol (2010), vol.34, 128-138.

[13] Cozzani I.; Dainese E. “*Biochimica degli alimenti e della nutrizione*”. Padova, Piccin (2006).

[14] Transferrina carboidrato-carente e abuso alcolico; Vincenza Bianchi. Laboratorio di Riferimento Regionale di Tossicologia, Azienda Ospedaliera SS Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria (2015), vol.39, 17-24.

[15] A. Helander, M. Fors, B. Zakrisson, Alcohol & Alcoholism (2001) 36 (5), 406-412.

[16] Gruppo Tossicologi Forensi Italiani-SIMLA. Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT). Linee guida analitiche ed interpretative. F. Tagliaro, M. Bernini, F. Bortolotti, M. Caligara, P. Cassandro, N. De Giovanni, R. Snenghi (2009), 277-289.

[17] Bernini M.; Ruffini D. Dipartimento di Specialità Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Medico Forensi, Cattedra di Medicina Legale; Università degli Studi di Brescia. “Studio delle varianti genetiche della transferrina nella popolazione bresciana con un metodo HPLC” (2008), vol.32, 55-56.

[18] Clin Chem. 2001 Jan; 47(1), 13-27. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. Arndt T.

[19] Decreto legislativo 9 Aprile 2018, n. 8. Testo unico sulla salute e sicurezza sul lavoro.

[20] V. Bianchi; “Transferrina-Carboidrato carente (CDT): Updating sul marcatore biochimico più studiato ed utilizzato in ambito alcolologico”. Laboratorio di Riferimento Regionale di Tossicologia (2014), 1-19.

[21] R. Cozzi, P. Protti, T. Ruaro “Analisi chimica – moderni metodi strumentali”. Milano, ESU.

[22] D. C. Harris, “Chimica analitica quantitativa”, Edizione II, Zanichelli. Bologna, 2015.

[23] A. Helander, M. Fors, B. Zakrisson, Alcohol & Alcoholism (2001), vol.36, n.5, 406-412.

[24] A. Helander, G. Eriksson, H. Stibler, J.-O. Jeppson, Clin. Chem. (2001), vol.47, n.7, 1225-1233.

[25] T. Arndt, Clin Chem (2001), 13-27.

[26] D.S. Hage; J.D. Carr. “Chimica analitica e analisi quantitativa”. Piccin. Padova, 2012.

[27] IFCC approved HPLC reference measurement procedure for the alcohol consumption biomarker carbohydrate- deficient transferrin (CDT): Its validation and use. François Schellenberg, Jos Wielders, Raymond Anton, Vincenza Bianchi, Jean Deenmamode, Cas Weykamp, John Whitfield, Jan-Olof Jeppsson, Anders Helander Clin Chim Acta, 2017 Feb; 465:91-100.

[28] Reprint of Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT) Anders Helander, Jos Wielders, Raymond Anton, Torsten Arndt, Vincenza Bianchi, Jean Deenmamode, Jan-Olof Jeppsson, John B. Whitfield, Cas Weykamp, François Schellenberg, on behalf of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardisation of Carbohydrate-Deficient Transferrin (IFCC WG-CDT) (2017), 15-20.

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

[30] C. Weykamp, J.P. Wielders, A. Helander, et al., 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. 51 (2013) 991–996.

[31] C. Weykamp, J. Wielders, A. Helander, et al., Harmonization of measurement results of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin by use of the toolbox of technical procedures of the International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results, *Clin. Chem.* 60 (2014) 945–953.

[32] Rocchi M.B.L., *Statistica e metodologia della ricerca per le discipline biomediche e psicocomportamentali*, Ed. Goliardiche, Trieste.

RINGRAZIAMENTI

Non sono mai stata brava con le parole, ma vorrei poter ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine e vorrei far capire quanto la loro presenza sia stata e continui ad essere fondamentale.

Inizio con il ringraziare il Prof. Mauro Formica per aver concesso la disponibilità nell'affiancarmi nella stesura di questa tesi.

Ringrazio il Dott. Michele Calcinari per aver trascorso insieme a me tutti questi mesi in laboratorio e per avermi accolto nella grande famiglia del Bio Lab, a cui va un ringraziamento speciale.

Grazie ai miei genitori per avermi permesso di intraprendere questo lungo percorso, per avermi sopportato nei miei periodi di ansia, anzi vi chiedo scusa se a volte sono stata troppo pesante. Grazie per essere sempre al mio fianco, per risollevarmi nei brutti periodi, per farmi sentire sempre amata e protetta.

Grazie a Michele, meglio dire “Santo Michele” (:D) perché per tanto tempo ha dovuto sopportare le mie ansie, addirittura l’ho persino obbligato ad interrogarmi prima degli esami. Grazie perché è sempre il primo a credere in me.

Grazie alla mia famiglia che è una parte essenziale della mia vita. Grazie ai miei nonnini Gianna, Maria e Renato per avermi cresciuta, per aver trascorso insieme a loro un’infanzia speciale tra orto, galline e tacchini. Sono ricordi che non dimenticherò mai. Grazie ai miei zii che mi fanno sentire come una figlia. Grazie a Federica che considero una sorella maggiore da cui prendere ispirazione. Grazie al piccolino di casa Leonardo per farmi tornare bambina ogni giorno.

Grazie ai miei amici, quelli sempre presenti e quelli con cui ci si vede meno, per aver trascorso giornate di risate e spensieratezza. Grazie ad Elisa, l'amica con la quale basta un semplice sguardo per capirsi.

Grazie alle mie speciali compagne di avventura Chiara, Giorgia, Naomi, Silvia e Valentina che per cinque anni hanno condiviso con me ansie e gioie. Non dimenticherò mai le chiamate al telefono di un'ora con la Vale per ripassare in vista degli esami e per aggiornarci sullo stato di ansia.

Grazie alla mia squadra di pallavolo che dopo anni di lontananza mi hanno fatto ritrovare persone speciali e soprattutto la passione che ho sempre avuto per questo sport.

Grazie, grazie a tutti. Finito questo percorso inizierà quello più difficile perché si entra nel "mondo dei grandi", quello di responsabilità, di preoccupazioni, ma sono sicura che arriveranno altri importanti traguardi e soddisfazioni. Non vedo l'ora!

Valentina