

Received: 2005.11.15
Accepted: 2006.01.31
Published: 2006.02.17

Nowe metody oznaczania izoform transferyny w diagnostyce uzależnienia od alkoholu

New methods for the determination of transferrin isoforms in the diagnostics of alcohol abuse

Bogdan Cylwik, Lech Chrostek, Maciej Szmitkowski

Zakład Diagnostyki Biochemicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie

Nowym biochemicznym markerem przewlekłego nadużywania alkoholu są izoformy transferyny ze zmniejszoną ilością kwasu sialowego (asialo-, monosialo- i disialotransferyna) zwane transferyną desialowaną – CDT. W ciągu ostatnich lat jednoznacznie potwierdzono przydatność tego wskaźnika w diagnostyce uzależnienia od alkoholu. Czułość i swoistość CDT jako markera przewlekłego nadużywania alkoholu są większe od czułości i swoistości powszechnie stosowanych testów. Od 10 lat CDT jest rutynowo oznaczane w laboratoriach. Współczesne techniki pozwalają na oznaczanie całkowitego stężenia CDT (ilość bezwzględna i/lub względna) i dają możliwość badania jej izoform. W pracy przedstawiono strukturę cząsteczki transferyny i różne metody oznaczania CDT ze zwróceniem szczególnej uwagi na testy komercyjne. W tabeli podano swoistość analityczną i wartości prawidłowe w zależności od metod (elektroforetyczne i chromatograficzne) lub punkty odcięcia stężenia CDT w surowicy wskazujące na przewlekłe nadużywanie alkoholu. Metody elektroforetyczne cechują się większą rozdzielczością (odmiany genetyczne) i większą czułością niż techniki chromatograficzne. Do metod referencyjnych lub potwierdzających zalicza się ogniskowanie izoelektryczne, elektroforezę kapilarną i chromatografię jonowymienną wysokociśnieniową. Procedury komercyjne polegają na wysyceniu transferyny żelazem, frakcjonowaniu białka (oddzielenie CDT od nie-CDT) na mikrokolumnach metodą chromatografii jonowymiennej i ilościowym pomiarze izoform CDT metodami immunologicznymi (radioimmunologiczna, enzymoimmunoenzymatyczna i immunoturbidymetryczna). Z powodu występowania różnych metod analitycznych niezbędna jest dalsza standaryzacja oznaczeń CDT, a także redefinicja CDT.

Słowa kluczowe:

nadużywania alkoholu • transferyna desialowana • metody oznaczania

Summary

The new biochemical marker of chronic alcohol abuse are transferrin isoforms with a reduced number of sialic acids (asialo-, monosialo-, and disialotransferrin) called carbohydrate-deficient transferrins (CDTs). The usefulness of this indicator in the diagnostics of alcohol abuse has clearly been confirmed during the last years. The sensitivity and specificity of the CDT method as a marker of chronic alcohol abuse are higher than those found in commonly used tests. In routine analysis, CDTs have been assayed in the laboratories for ten years. Current CDT techniques allow for the determination of total CDT concentration (the absolute and/or relative amount) and provide the possibility of assaying its isoforms. In this paper the molecular structure of transferrin and different methods of CDT analysis are shown, with particular attention given to commercial tests. Analytical specificity and method-dependent (electrophoretic and chromatographic) reference values or cut-offs for serum CDT concentrations indicating chronic alcohol abuse are given

in a table. Electrophoretic methods are characterized by higher selectivity (genetic variants) and higher sensitivity than chromatographic techniques. Isoelectric focusing, capillary electrophoresis, and high-performance liquid chromatography are used as the reference methods. Commercial procedures are based on transferrin saturation with iron followed by fractionation of protein (separating CDTs from non-CDT forms) by ion-exchange chromatography using microcolumns and a quantitative determination of CDT isoforms by immunological methods (radioimmunoassay, enzyme immunoassay, and turbidimetric immunoassay). Due to the different existing analytical methods, further standardization of CDT analysis and a redefinition of CDTs are necessary.

Key words: alcohol abuse • desialylated transferrin • methods for the determination

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/8761.pdf

Word count: 4377

Tables: 2

Figures: 6

References: 68

Adres autora: dr n. med. Bogdan Cylwik, Zakład Diagnostyki Biochemicznej Akademii Medycznej, ul. Waszyngtona 15 A, 15-269 Białystok; e-mail: zdb@amb.edu.pl

WSTĘP

Narastający problem uzależnienia od alkoholu (etanolu), a co za tym idzie wysokie nakłady finansowe związane z jego leczeniem prowadzą do wzmożenia badań epidemiologicznych. Metody przesiewowe w kierunku wykrywania nadużywania alkoholu oparte na kwestionariuszach są mało wiarygodne, stąd większą uwagę przywiązuje się do bardziej obiektywnych testów laboratoryjnych. Wynika to z tego, iż szkodliwe oddziaływanie alkoholu na organizm zmienia poziom wielu parametrów biochemicznych krwi, wśród których poszukuje się potencjalnych wskaźników nadmiernego picia. Do standardowych markerów przewlekłego nadużywania alkoholu należą wskaźniki uszkodzenia funkcji wątroby, tj. γ -glutamylotransferaza (GGT), aminotransferaza asparaginianowa (AST), aminotransferaza alaninowa (ALT) oraz średnia objętość krwinki czerwonej (MCV). Ze względu na małą swoistość tych testów ich przydatność w diagnostyce alkoholizmu jest ograniczona.

Nowym, uznanym już testem w diagnostyce uzależnienia od alkoholu stała się transferyna desialowana (CDT), której swoistość wynosi 82–100%, a czułość 39–94% [12]. Zainteresowanie transferyną jako potencjalnym markerem przewlekłego nadużywania alkoholu sięga 1976 roku, kiedy to po raz pierwszy wykryto związek między budową cząsteczki tego surowiczego białka, a spożyciem alkoholu [53]. Stibler i wsp. w czasie rozdziału białek płynu mózgowo-rdzeniowego i surowicy u pacjentów z chorobami neurologicznymi, zwrócili uwagę na to, iż u niektórych chorych z alkoholową ataksją mózdzkową występują zmiany w strukturze transferyny. Polegały one na obecności silnie zaznaczonego pasma o punkcie izoelektrycznym (pI) równym 5,7. Zmiany te były odwracalne i ustępowały po 7–14 dniach po odstawieniu alkoholu [50,53]. Wykazano, iż istnieje zależność między obecnością patologicznej komponenty transferyny, a dzienną konsumpcją u osób nadużywających alkoholu. Stwierdzono, iż w grupie pacjentów pijących alkohol w dawce 20–60 g i powyżej 60 g na dobę w okresie tygodnia poprzedzającego badanie, odse-

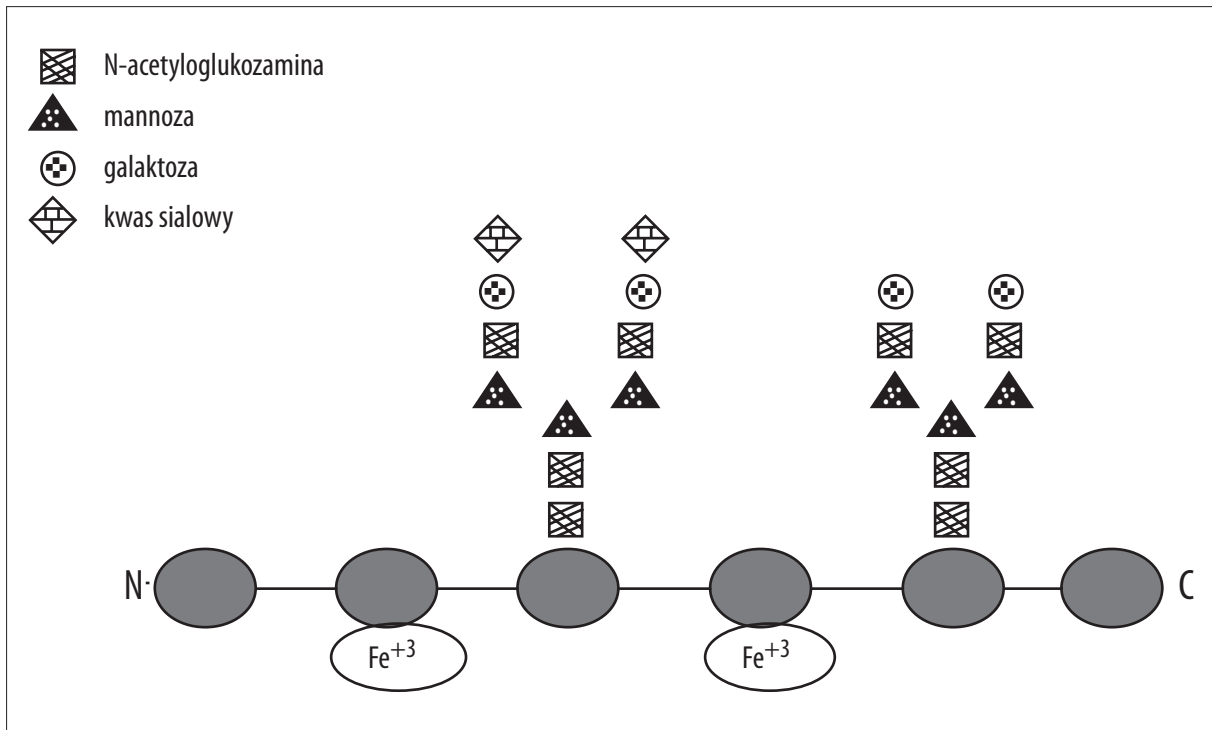
tek nieprawidłowej frakcji tego białka wynosił odpowiednio: 75 i 81%. W okresie abstynencji, trwającym przynajmniej 10 dni, zmiany te ustępowały. U chorych leczonych z powodu niealkoholowych chorób wątroby zmian takich nie wykryto [51]. Pomiarom densytometrycznym wykazano, iż u osób zdrowych odsetek tzw. „katodowej transferyny” wynosił 3,7%, a w grupie uzależnionych od alkoholu był istotnie podwyższony do 9,5% [54].

W ciągu ostatnich 30 lat, jakie minęły od pierwszych badań nad CDT, określono jej przydatność w diagnostyce uzależnienia od alkoholu oraz wprowadzono wiele testów komercyjnych, które od 10 lat są rutynowo stosowane w laboratoriach. Współczesne techniki pozwalają nie tylko na oznaczanie całkowitego stężenia CDT, ale dają możliwość badania poszczególnych izoform. Mimo wielu lat badań nadal wiele spraw wymaga uporządkowania np. standaryzacja metody, definicja CDT. Podstawowym celem pracy jest przedstawienie metod i zapoznanie się z aktualnymi problemami związanymi z oznaczaniem CDT, a zarazem wypełnienie luki dotyczącej tego tematu w piśmiennictwie polskim. Badanie CDT jako markera przewlekłego nadużywania alkoholu jest już od dawna stosowane na świecie, natomiast w Polsce tylko nieliczne laboratoria wykorzystują ten test, głównie do celów naukowych. Większe zainteresowanie tym badaniem mogłoby ułatwić wprowadzenie tego testu do rutynowego wykorzystania w laboratoriach diagnostycznych.

STRUKTURA CDT

Transferyna (Tf) – jest glikoproteiną transportującą żelazo (masa molekularna 79,6 kDa), głównie syntetyzowaną w wątrobie [7]. Cząsteczka Tf jest zbudowana z 3 podjednostek strukturalnych: pojedynczego łańcucha polipeptydowego (zawierającego dwa niezależne miejsca wiążące żelazo) oraz dwóch bocznych, rozgałęzionych łańcuchów oligosacharydowych (ryc.1).

Każda z tych podjednostek cechuje się zmiennością budowy, co jest powodem występowania wielu izoform (mikro-

Ryc. 1. Schemat struktury CDT (np. disialo- Fe_2 -transferyna)

heterogenność). Z punktu widzenia analitycznego, można więc stwierdzić, iż Tf nie jest homogenną cząsteczką, a stanowi grupę izoform zwanych wspólnie transferyną. Zmienność łańcucha polipeptydowego prowadzi do występowania 38 odmian genetycznych białka (np. Tf-B, Tf-C, Tf-D) [30]. Transferyna, mając 2 miejsca wiązania żelaza może tworzyć 4 następujące odmiany białka: Fe_0 -Tf (transferyna pozbawiona atomu Fe), Fe_{1N} -Tf (transferyna z jednym atomem Fe związanym z N-końcowym aminokwasem), Fe_{1C} -Tf (transferyna z jednym atomem Fe związanym z C-końcowym aminokwasem) i Fe_2 -Tf (transferyna z dwoma atomami Fe związanymi z N- i C-końcowymi aminokwasami). W związku z tym, iż u osób zdrowych jedynie 30–40% Tf jest wysyczone żelazem, w surowicy występują wszystkie jej odmiany (Fe_0 -Tf, Fe_1 -Tf, Fe_2 -Tf). Z punktu widzenia metodycznego, obecność żelaza w cząsteczce Tf jest bardzo ważna, gdyż wpływa na wartość punktu izoelektrycznego (pI) białka. Każdy przyłączony atom żelaza powoduje zmniejszenie pI o prawie 0,2 jednostki pH [17]. Zmienność budowy łańcuchów oligosacharydowych polega na różnym stopniu rozgałęzienia, tworząc struktury dwu-, trój- i czteroantenne. W skład łańcucha oligosacharydowego wchodzi N-acetyloglukozamina, mannoza, galaktoza i na końcu kwas sialowy (SA). W zależności od liczby przyłączonych reszt kwasu sialowego występuje 9 następujących izoform: asialo-Tf (transferyna pozbawiona kwasu sialowego), monosialo-Tf (transferyna z 1 resztą SA), disialo-Tf (transferyna z 2 resztami SA), trisialo-Tf (transferyna z 3 resztami SA), tetrasialo-Tf (transferyna z 4 resztami SA), pentasialo-Tf (transferyna z 5 resztami SA), heksasialo-Tf (transferyna z 6 resztami SA), heptasialo-Tf (transferyna z 7 resztami SA) oraz oktasialo-Tf (transferyna z 8 resztami SA) [41,60,61]. Reszty kwasu sialowego warunkują ujemny ładunek Tf i decydują o wartości punktu izoelektrycznego pI. Każda przyłączo-

na reszta SA obniża pI o około 0,1 jednostki pH. W tabeli 1 przedstawiono izoformy Tf wraz z ich punktami izoelektrycznymi i procentową zawartością we krwi. U osób zdrowych dominującą izoformą transferyny jest tetrasialo-Tf (64–80%). Isoformy transferyny ze zmniejszoną ilością kwasu sialowego (asialo-Tf, monosialo-Tf, disialo-Tf) nazwane transferyną desialowaną (ubogowęglowodanową) (CDT: carbohydrate-deficient transferrin), a ich zwiększone stężenie obserwowano w surowicy uzależnionych od alkoholu [49].

METODY OZNACZANIA CDT

Duża zmienność w budowie cząsteczki transferyny, strukturalne podobieństwo izoform CDT do izoform nie-CDT, a także dosyć małe stężenie CDT w surowicy (<2,5–2,7% u osób zdrowych i <20% u osób uzależnionych od alkoholu), powoduje, że metodom oznaczania CDT stawiane są duże wymagania swoistości i czułości analitycznej [7]. W związku z tym, iż nieznanne są bezpośrednie metody, ani swoiste przeciwciała do oznaczania CDT, w rutynowych badaniach laboratoryjnych niezbędna jest izolacja białka. Ma ona na celu oddzielenie CDT od izoform nie-CDT, a także od innych białek surowicy. Służą do tego metody chromatograficzne lub elektroforetyczne, w których podstawą rozdziału izoform jest wielkość ładunku elektrycznego i wartość punktów izoelektrycznych (pI), zależne od różnej liczby reszt kwasu sialowego. Należy też pamiętać, iż wartość pI zmienia się wraz z zawartością żelaza w cząsteczce transferyny, a chcąc usunąć te różnice należy wyrównać (wysycić) jego ilość we wszystkich izoformach do dwóch atomów metalu. Stąd pierwszym etapem oznaczania CDT jest saturacja transferyny żelazem (Fe^{+3}), która ma na celu przeprowadzenie izoform Fe_0 -Tf i Fe_1 -Tf do jednej – Fe_2 -Tf. Można więc stwierdzić, że proces wy-

Tabela 1. Izoformy transferyny we krwi [20]

Izoforma	Liczba reszt kwasu sialowego	Punkt izoelektryczny (pI)	Zawartość (%)
Heptasialotransferyna	7	5,1	<1,5
Heksasialotransferyna	6	5,2	1-3
Pentasialotransferyna	5	5,3	12-18
Tetrasialotransferyna	4	5,4	64-80
Trisialotransferyna	3	5,6	4,5-9,0
Disialotransferyna	2	5,7	<2,5
Monosialotransferyna	1	5,8	<0,9
Asialotransferyna	0	5,9	<0,5

sycania transferyny żelazem z jednej strony redukuje liczbę izoform występujących w natywnej surowicy (z 36 do 9 u homozygot i z 72 do 18 u heterozygot), a z drugiej – wyklucza występowanie obok siebie CDT i nie-CDT o pI o tej samej wartości [17]. Okazuje się bowiem, iż w punktach izoelektrycznych o tych samych lub zbliżonych wartościach występują obok siebie zarówno izoformy CDT i nie-CDT, czego przykładem jest disialo-Fe₂-Tf (główna izoforma CDT) oraz tetrasialo-Fe_{IN}-Tf (podstawowa izoforma nie-CDT), pentasialo-Fe_{IC}-Tf i heptasialo-Fe₀-Tf [7]. Niekompletnie przeprowadzona saturacja może być powodem zawyżenia wyników oznaczania CDT [27]. Po rozdziale CDT od innych białek surowicy i od nie-CDT przeprowadza się pomiary ilościowe (oznaczanie bezwzględnego lub względnego stężenia CDT i poszczególnych izoform CDT) w oparciu m.in. o techniki radioimmunologiczne (RIA), immunoenzymatyczne (EIA) lub turbidymetryczne. Rycina 2 przedstawia etapy postępowania związane z oznaczaniem CDT, a tabela 2 metody oznaczania CDT, ich swoistość analityczną i wartości prawidłowe lub punkty odcięcia dla chorych przewlekle nadużywających alkoholu.

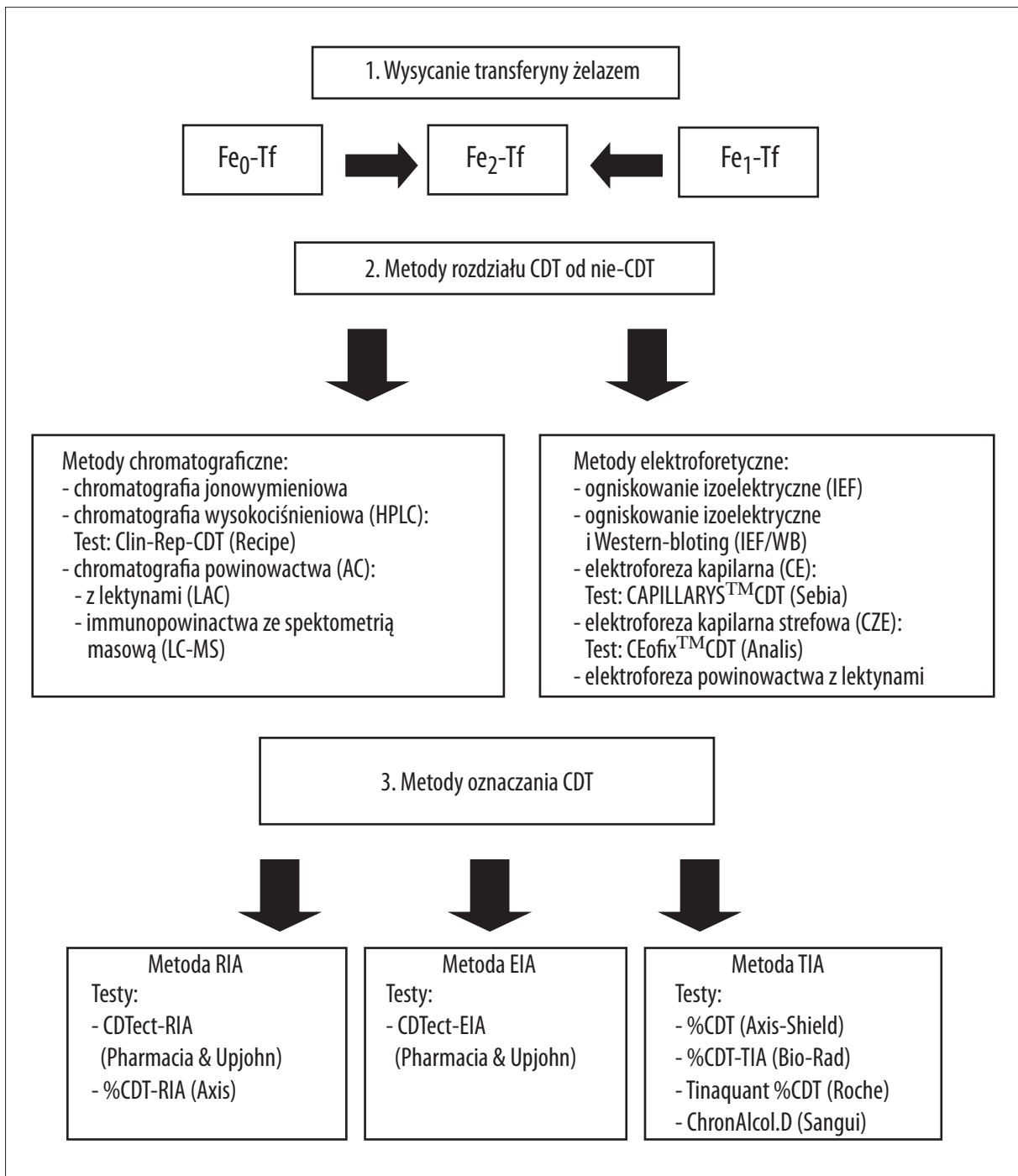
METODY ELEKTROFORYCZNE

Do metod elektroforetycznych zalicza się ogniskowanie izoelektryczne (IEF – isoelectric focusing), elektroforezę kapilarną (CE – capillary electrophoresis) i strefową elektroforezę kapilarną (CZE – capillary zone electrophoresis) [19,23]. Metody te cechują się dużą rozdzielczością i wysoką czułością.

Ogniskowanie izoelektryczne

Metodą referencyjną rozdziału transferyny na poszczególne frakcje jest ogniskowanie izoelektryczne, pozwalające na oddzielenie wszystkich izoform CDT, w tym również wariantów genetycznych [19,22,23]. W latach 80. ub.w. techniką IEF wykazano po raz pierwszy nieprawidłowe frakcje transferyny, jakie występowały w surowicy osób uzależnionych od alkoholu [51]. Pierwszy etap IEF polega na wysyceniu transferyny trójwartościowym żelazem. Następnie frakcje białkowe są rozdzielane na żelu poliakrylamidowym z odpowiednio dobranym gradientem pH do punktów izoelektrycznych izoform. Frakcje transferyny, dzięki swojemu ujemnemu ładunkowi wędrują do anody.

W miarę wzrostu pH środowiska, ujemnie naładowane grupy karboksylowe ulegają redysocjacji. Izoformy transferyny kończą swoją migrację w tych punktach żelu, w których pH jest równe ich punktom izoelektrycznym (pI). Identyfikacja frakcji elektroforetycznych odbywa się metodą immunofiksacji po nałożeniu na rozdziały przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej transferynie (przeciwciała poliklonalne klasy IgG) i powstaniu kompleksów Tf-anty-Tf (w tym CDT-anty-Tf), które są z kolei wybarwiane solami srebra. Izoformy transferyny (w tym CDT) oznacza się densytometrycznie [23]. W związku z tym, iż transferyna może zawierać 0-8 reszt kwasu sialowego, tworzy 8 i więcej izoform o różnych punktach izoelektrycznych (5,1–5,9) (tabela 1). U osób zdrowych około 80% izoform stanowi tetrasialotransferyna o pI 5,4. Z kolei w surowicy osób uzależnionych od alkoholu stwierdzono zwiększone stężenie asialo-, monosialo- i głównie disialo-Tf [2,49]. Po nałożeniu na żel wymaganej objętości materiału (1 µl surowicy rozcieńczony 400-krotnie) potrzebnej do detekcji izoform CDT, dochodzi do tzw. „przeładowania” podłoża tetrasialo-Fe₂-Tf, która nie koreluje z ilością transferyny zawartej w tym paśmie. Przejawia się to intensywnym zabarwieniem prążka i wysokim pikiem w obrazach elektroforetycznych. Utrudnia to w znacznym stopniu ilościowe oznaczanie tej, jak i pozostałych frakcji transferyny. Z analitycznego punktu widzenia problem ten można usunąć przez wprowadzenie wskaźników, które określałyby wzajemne relacje pomiędzy izoformami CDT, np. disialo-/asialo-Fe₂-Tf [9,22,46]. Jakkolwiek techniką IEF można także określić stężenia bezwzględne CDT używając krzywą kalibracyjną dla różnych ilości asialo-Fe₂-Tf [66]. Ogniskowanie izoelektryczne może być połączone z techniką Western blottingu (IEF/WB) [66]. Technika blottingu opiera się na wykonaniu rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym metodą IEF (amfolit o pH 5,0–8,0), a następnie przeniesieniu i trwałym związaniu rozdzielonego w procesie elektroforezy materiału ze stałym podłożem (filtry nitrocelulozowe). Utrwalone na podłożu stałym izoformy transferyny są wykrywane immunochemicznie przez przeciwciała skierowane przeciwko ludzkiej transferynie (przy pI 5,7–5,9). Obrazy densytometryczne odczytuje się poprzez komputerowe skanowanie immunoblotów i pomiar stężenia bezwzględnego CDT (mg/l). Wartości CDT wynosiły: u nadużywających alkoholu: 139±54, u uzależnionych od alkoholu w okresie abstinencji: 81±8 i u osób zdrowych: 68±16 mg/l, zaś korelacja metody IEF/WB z IEF/RIA (IEF



Ryc. 2. Etapy postępowania w oznaczeniach CDT

połączona z immunofiksacją, chromatografią jonowymieniową i odczytem immunoradiologicznym) była bardzo wysoka i wynosiła $r=0,962$ [66]. Cotton i wsp. opisali prostą i szybką metodę IEF z użyciem żelu agarozowego, która nie wymagała immunofiksacji, ani Western-blotingu [15]. W 1995 r. proces IEF poddano automatyzacji z użyciem tzw. PhastSystemu, który w następnych latach zmodyfikowano [10,22,23]. Rozdział białek prowadzono na żelu poliakrylamidowym (pH 5–6), który był umieszczony na plastikowym nośniku (GelBond™PAG film, Biozym-Diagnostik), a surowice aplikowano (jednocześnie nakładano 8 próbek

po 1 μ l) specjalnym ramieniem tzw. Sample Applicator™ (Pharmacia/LKB). Po IEF prowadzono immunofiksację, gdzie na żel nakładano przeciwciała poliklonalne klasy IgG skierowane przeciwko transferynie, dalej następowała 40 min inkubacja w temp. pokojowej. Białka, które nie uległy precipitacji (nie-Tf) były wypłukiwane solą fizjologiczną. Barwienie solami srebra wykonano z użyciem jednostki PhastSystem Development Unit™. Identyfikacja prążków (frakcji) transferyny odbywała się przez porównanie ich z obrazem elektroforetycznym płynu mózgowo-rdzeniowego. W warunkach fizjologicznych w roz-

Tabela 2. Charakterystyka metod oznaczania CDT

Metoda	Wartości prawidłowe/punkty odcięcia		Swoistość analityczna	Piśmiennictwo
	Kobiety	Mężczyźni		
Chromatografia jonowymienna z RIA (oryginalna metoda Stiblera)	74 mg/L	74 mg/L	asialo-, mono- i disialo-Tf	[52]
Chromatografia jonowymienna z RIA (CDTect-RIA; Pharmacia; zmodyfikowana metoda Stiblera)	26–28 U/L	18-20 U/L	asialo-, mono- i disialo-Tf	[11,49]
Chromatografia jonowymienna z EIA (CDTect-EIA; Pharmacia)	26–28 U/L	18-20 U/L	asialo-, mono- i disialo-Tf	[11,49]
CDTect/Tf	1,3/1,0%	1,3/0,6%	asialo-, mono- i disialo-Tf	[10,34]
Chromatografia jonowymienna z RIA (%CDT; Axis)	2,5%	2,5%	asialo-, mono- i disialo-Tf	instr. techn.
Chromatografia jonowymienna z TIA (%CDT-TIA lub %CDTri-TIA: Axis)	5-6%	5-6%	asialo-, mono-, disialo- i 50% trisialo-Tf	instr. techn.
Chromatografia jonowymienna z TIA (Tina-quant%CDT/transferrin; Roche)	6%	6%	asialo-, mono-, disialo- i 50% trisialo-Tf	instr. techn.
Chromatografia jonowymienna z TIA (ChronAlcol.D; Sangui)	2,5–2,7% 100–110 mg/L	2,5–2,7% 100–110 mg/L	asialo-, mono- i disialo-Tf	[8] [8]
CZE	3%	3%	asialo-, mono- i disialo-Tf	[43]
CZE	4,5%	4,5%	asialo-, mono-, disialo- i trisialo-Tf	[58]
CZE	3%(?)	3%(?)	asialo-, mono- i di-/trisialo-Tf	[65]
HPLC	80 mg/L	80 mg/L	asialo-, mono- i disialo-Tf	[44]
HPLC	0,8%	0,8%	asialo-, mono- i disialo-Tf	[29]
HPLC	?	?	asialo-, mono-, disialo- i trisialo-Tf	[24]
HPLC	1%	1%	asialo-, mono- i disialo-Tf	[63]
HPLC (Clin-Rep-CDT; Recipe)	1,75-2,5%	1,75-2,5%	asialo- i disialo-Tf	instr. techn.
IEF-immunobloting z densytometrią laserową	4 DU	4 DU	asialo-, mono- i disialo-Tf	[14]
IEF z immunofiksacją (IF)	4,4%	4,4%	asialo-, mono- i disialo-Tf	[46]
IEF z immunofiksacją (IF)	5%	5%	disialo-Tf	[19]
IEF-Western-bloting	100 mg/L	100 mg/L	asialo-, mono- i disialo-Tf	[66]
IEF bez IF	8,4%	8,4%	asialo-, mono- i disialo-Tf	[15]
Chromatografia powinowactwa z lektyną	1,4%	1,4%	CDT-Allo A	[68]
Chromatografia powinowactwa z lektyną	1,3%	1,3%	CDT-TIA	[68]
LC-MS	>5,>6,15%, odpowiednio	>5,>6,15%, odpowiednio	asialo-, mono- i disialo-Tf	[35]

dziale płynu mózgowo-rdzeniowego widoczne są frakcje transferyny, od asialo- do heksasialo-Fe₂-Tf (w tym izoformy CDT) [22]. Z powodu dużej rozdzielczości technika IEF może wykrywać genetyczne odmiany transferyny bez uprzedniego dodawania neuraminidazy [14,22]. Ma to swoje istotne znaczenie dlatego, iż warianty Tf-B („busy”) i Tf-D mogą interferować w oznaczaniu CDT, dając wyni-

ki fałszywie dodatnie. I tak, u osób będących heterozygotami Tf-CD i spożywających niewielkie ilości alkoholu, ze względu na podobieństwo punktów izoelektrycznych izoform Tf-D (nie-CDT) i Tf-C (CDT) obserwowano 2 prążki na nośniku, które były powodem podwyższonych wartości CDT [14]. W literaturze podawany jest przypadek osoby kierującej pojazdem, która spowodowała wypadek i po-

niosła pełne konsekwencje dlatego, że wynik testu CDT był u niej podwyższony. Jak się później okazało nie był to wynik uzależnienia od alkoholu (jak sądzono wcześniej), a jedynie wynik fałszywy spowodowany obecnością odmiany genetycznej Tf-D [47]. Można to było stwierdzić dopiero techniką IEF. W innej pracy IEF użyto do zróżnicowania CDT od wariantu D3 transferyny, który wędrował do tego samego punktu pI, co CDT [14]. Stąd IEF jest rekomendowana do weryfikacji wyników nieoczekiwanych i wątpliwych [9]. Ogniskowanie izoelektryczne jest odpowiednią techniką do wizualizacji i sprawdzania obrazów elektroforetycznych (na obecność izoform transferyny) w eluatach otrzymanych po przejściu przez kolumny jonowymienne przy opracowywaniu testów komercyjnych do oznaczania CDT. Jest podstawową metodą do sprawdzania skuteczności rozdziału izoform CDT od nie-CDT przy oznaczeniach CDT opartych na chromatografii jonowymiennej [9,22]. Proponuje się stosowanie IEF do walidacji innych metod i nowo wprowadzanych testów komercyjnych [22]. Technika IEF rozdziału izoform transferyny może być także przydatna w diagnostyce wrodzonych zaburzeń glikozylacji (CDG – congenital disorders of glycosylation) [28]. Do celów rutynowych ogniskowanie izoelektryczne jest techniką zbyt złożoną i pracochłonną.

Elektroforeza

Poza techniką IEF, do oznaczania CDT wykorzystuje się metody elektroforezy kapilarnej [31,42,58] i strefowej elektroforezy kapilarnej [16,43,57]. Po raz pierwszy ilościowe oznaczanie CDT metodą CE w technice ogniskowania izoelektrycznego przeprowadzono w 1989 r. [31]. Rozdział białek w elektroforezie kapilarnej zachodzi w wąskich rurkach wykonanych ze szkła krzemianowego. W środowisku buforu wypełniającego wnętrze kapilary jony krzemianowe dysocjują i oddają do roztworu dodatnie kationy. Wytwarza się podwójna warstwa elektryczna. W ruchomej warstwie buforu znajdują się uwodnione jony dodatnie, a nieruchoma ściana kapilary ma ładunek ujemny. Po przyłożeniu zewnętrznego pola elektrycznego przysięciana warstwa jonów dodatnich wraz z całą objętością buforu jako wypełnia kapilarę, przesuwa się w kierunku katody (przepływ elektroosmotyczny). Jednocześnie dochodzi do wędrowki białek zgodnie z wartościami ich ładunków elektrycznych i ruchliwości elektroforetycznych. Detektory UV wykrywają rozdzielone frakcje poprzez spektrofotometryczny pomiar absorpcji światła o charakterystycznej długości fali dla analizowanego białka. Sygnały dla poszczególnych izoform CDT są rejestrowane w postaci pików, a otrzymany elektroferogram pozwala na jakościowe i ilościowe oznaczanie CDT. Sprawność rozdzielania opisywana jest liczbą tzw. pólk teoretycznych. Jednym z głównych problemów tych technik, utrudniających rozdział, jest adsorpcja białek surowicy do wewnętrznej ściany kapilary [57]. Zjawisko to można ograniczać przez modyfikację wewnętrznych powierzchni ścian kapilary (permanent coating) lub przez zmianę właściwości buforu (dynamic coating), co jest rozwiązaniem bardziej korzystnym i częściej stosowanym. I tak, wykazano, iż dodanie do buforu prowadzącego (running buffer) np. diaminobutanu i wydłużenie kapilary, poprawia czułość analityczną i zdolność rozdzielczą elektroforezy kapilarnej strefowej [16]. Jednak czułość i wybiórczość elektroforezy były w dalszym ciągu mniejsze, aniżeli techniki IEF. Przy stężeniu

CDT wynoszącym 61 U/l (wartość charakterystyczna dla przewlekłego nadużywania alkoholu), metoda starsza nie pozwalała na wykrycie izoform asialo- i monosialo-Tf [57], a ulepszona nie wykrywała już tylko asialo-Tf [16]. Dla porównania, technika IEF już przy wartości stężenia 25 U/l CDT wykrywała zarówno jedną, jak i drugą izoformę [10]. Celem osiągnięcia odpowiedniej rozdzielczości w jak najkrótszym czasie dokonuje się optymalizacji szybkości przepływu elektroosmotycznego. Można tego dokonać przez zmianę siły jonowej buforu i wartości pH, a także przez wprowadzenie podwójnej warstwy polimeru, który powoduje wzrost ładunku ujemnego na ściankach kapilary i zarazem wzrost przepływu [65]. Przed rozdziałem elektroforetycznym białka na ogół wymagane jest wstępne wysycenie transferyny żelazem. W nowszej metodzie CZE etap saturacji przebiega wspólnie z rozdziałem elektroforetycznym białka, gdyż żelazo umieszczono w buforze kapilary (CEofix CDT commercial buffer system, Analis, Belgia) [65]. Wprowadzony w ostatnich latach zestaw Ceofix™CDT (Analis, Belgia) pozwala na całkowite zautomatyzowanie procesu separacji i ilościowego oznaczania CDT w surowicy metodą CZE z użyciem aparatu Beckman-Coulter P/ACE 5000 (40 oznaczeń w zestawie) i MDQ (100 oznaczeń w zestawie) [36]. Zaletą elektroforezy kapilarnej jest szybki rozdział białek (w tym odmian genetycznych CDT), mała objętość próbki, oszczędność odczynników oraz możliwość automatyzacji. Wadą może być wysoki koszt aparatury. Ciągłe doskonalenie metod CE i CZE sprawia, iż stają się one wygodnym narzędziem do oznaczania CDT nie tylko w celach naukowych, ale również w rutynowej diagnostyce laboratoryjnej (badania kliniczne, medycyna sądowa, standaryzacja innych testów) [36,37,40,64]. Proponuje się także technikę CZE jako metodę referencyjną oznaczania CDT [64]. W 2005 r. pojawił się na rynku nowy zestaw przeznaczony do rozdziału, identyfikacji i ilościowego oznaczania CDT metodą CE o nazwie CAPILLARYS™ CDT test (245 oznaczeń) (Sebia, USA). Badanie jest w pełni zautomatyzowane (CAPILLARYS™2 system), a wydajność aparatu wynosi 38 oznaczeń na godzinę. Do metod elektroforetycznych można zaliczyć także elektroforezę powinowactwa z użyciem lektyn [27].

METODY CHROMATOGRAFICZNE

Do metod chromatograficznych zalicza się chromatografię jonowymienną, wysokociśnieniową (HPLC) i chromatografię powinowactwa (AC) [45, 46]. W porównaniu do IEF wymagają większej objętości surowicy (100–500 µl), są mniej czułe i mniej wybiórcze. Chromatografia jonowymienna stosowana zwykle w testach komercyjnych do oznaczania CDT nie wykrywa odmian genetycznych. Z kolei HPLC wykrywa warianty genetyczne transferyny i może być stosowana do weryfikacji wyników wątpliwych otrzymanych metodą chromatografii jonowymiennej [47]. Technika IEF ma jednak przewagę nad metodą HPLC w zakresie detekcji i fenotypowania odmian genetycznych transferyny, szczególnie tych wariantów, których wartość pI jest zbliżona do wartości pI frakcji tetrasialo-Fe₂-Tf (Tf-C1). Kolumnowa chromatografia powinowactwa z lektynami (LAC – lectin affinity chromatography) pozwala skutecznie rozdzielić frakcje disialo-Tf i asialo-Tf w surowicy [68]. W technice tej podłożem jest sefaroza związana ze swoistymi lektynami Allo A (*Allomyrina*

dichotomia) i TJA (*Trichosanthes Japonica*). Izoforma disialo-Tf ma powinowactwo do Allo-A (CDT-Allo A), a asialo-Tf do TJA (CDT-TJA). Wydajność diagnostyczna tej techniki była większa od wydajności testu %CDT-TIA (Axis), który obejmował również frakcję trisialo-Fe₂-Tf [68]. Inną techniką jest kolumnowa chromatografia immunopowinowactwa połączona ze spektrometrią masową (LC-MS: immunoaffinity liquid chromatography and mass spectrometry) [35]. Zaletą metody jest mała objętość surowicy (25 µl), krótki czas oznaczenia (około 10 min, po uprzednim przygotowaniu kolumny) i pełna automatyzacja (możliwość analizy powyżej 100 próbek dziennie). Metody chromatograficzne są czasochłonne, pracochłonne, dosyć drogie i wymagają specjalnej aparatury, stąd nie nadają się do pomiarów rutynowych.

TESTY KOMERCYJNE

W 1993 r. pojawił się pierwszy test komercyjny CDTECT-RIA (Pharmacia & Upjohn, Szwecja) do rutynowego oznaczania CDT, a w latach następnych kolejne: %CDT (Axis, Norwegia), CDTECT-EIA (Pharmacia & Upjohn, Szwecja), %CDT-TIA (Axis-Shield, Norwegia), %CDTri-TIA (Bio-Rad, USA), Tinaquant-%CDT/transferrin (Roche, Niemcy), ChronAlcol.D (Sangui, USA) oraz Clin-Rep-CDT-HPLC (Recipe, Niemcy) (tabela 2). Procedury komercyjne polegają na frakcjonowaniu białka (oddzielenie CDT od nie-CDT) na mikrokolumnach, głównie metodą chromatografii jonowymiennej i ilościowym pomiarze izoform CDT w eluacie metodami immunologicznymi (np. RIA, EIA, turbidymetria). Metodą rozdziału w teście Clin-Rep-CDT (jako jedynym) jest HPLC. Przed nałożeniem materiału na kolumnę przeprowadza się wysycenie transferyny żelazem (usunięcie form Fe₁- i Fe₀-Tf). Testy komercyjne pozwalają na oznaczenie 3 izoform CDT: asialo-, monosialo- i disialo-Tf (CDTECT-RIA, %CDT, CDT-EIA, ChronAlcol.D, Clin-Recipe-CDT) lub 4: asialo-, monosialo-, disialo- i około 50% trisialo-Tf (%CDT-TIA, %CDTri-TIA, Tinaquant%CDT/transferrin). Zaletą testów komercyjnych jest możliwość prowadzenia oznaczeń w rutynowym laboratorium, łatwość wykonania, automatyzacja (półautomatyzacja) badań (np. w teście %CDT-TIA pomiary turbidymetryczne mogą być prowadzone na analizatorach biochemicznych Cobas Mira S, Hitachi 911, Dade Behring BN II, Kone Optima, IL 1800), co skraca czas analizy i obniża koszty badania.

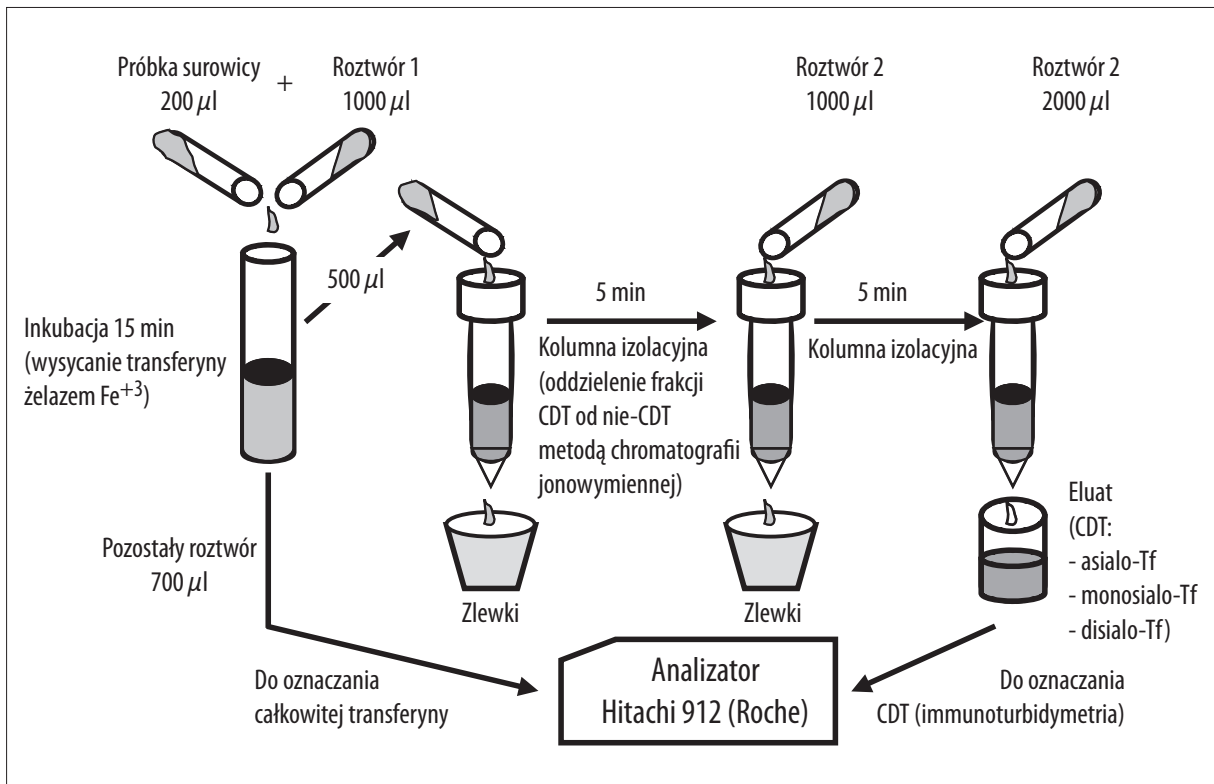
CDTECT

CDTECT był pierwszym testem komercyjnym do oznaczania CDT wprowadzonym przez firmę Pharmacia & Upjohn (Szwecja) na początku lat 90. XX w. Test CDTECT-RIA (wprowadzony w 1993 r.) polegał na rozdziale frakcji CDT od nie-CDT na mikrokolumnach (chromatografia jonowymienna) i ilościowym oznaczaniu izoform CDT (asialo-, monosialo-, disialo-Tf) metodą radioimmunologiczną (kompetycyjna, z użyciem podwójnych przeciwciał) [34]. Wkrótce na rynku pojawił się zestaw CDTECT-EIA z metodą immunoenzymatyczną (na mikropłytkach), który stopniowo zaczął wypierać RIA [11]. Międzylaboratoryjna analiza porównawcza testów CDTECT-RIA i CDTECT-EIA wykazała, iż oba mają podobną powtarzalność (odpowiednio: WZ=5,2 i 6,2%) oraz odtwarzalność (odpowiednio: 9,8 i 10,9%) i mogą być stosowane zamiennie w oznacza-

niu CDT, np. w tzw. badaniach podłużnych (longitudinal study) [11]. Prawidłowy poziom CDT mierzony testami CDTECT wynosił zwykle poniżej 20 U/l u mężczyzn i poniżej 26 U/l u kobiet [32]. Niektóre dane producentów testów były wyższe i punkty odcięcia zawierały się w zakresie 20–23 U/l u mężczyzn i 26–29 U/l u kobiet [20]. W medycynie sądowej istotne znaczenie miała wartość 30 U/l i powyżej, uznawana za patologiczną [26]. Czulość diagnostyczna testów CDTECT zawierała się w zakresie od 20 (przy konsumpcji alkoholu 44 g/dobę) do 85% (spożycie alkoholu 60 g/dobę) u mężczyzn i od 26 (spożycie 20 g/dobę) do 71% (80 g alkoholu/dobę) u kobiet, przy swoistości diagnostycznej odpowiednio: 90 i 83% u mężczyzn oraz 96 i 87% u kobiet [32]. Z kolei swoistość diagnostyczna testów CDTECT była w zakresie 69–100% (czulość odpowiednio: 55 i 43%) u mężczyzn oraz 80–99% (czulość odpowiednio: 45 i 50%) u kobiet [32]. Walidacja testu CDTECT techniką IEF potwierdziła: całkowite wysycenie transferyny żelazem, wystarczającą stabilność kompleksu w czasie pasażu przez kolumnę, skuteczny rozdział frakcji CDT od nie-CDT oraz częściową retencję disialo-Tf, co może dawać wyniki fałszywie ujemne w górnych granicach normy [9]. Na podstawie oznaczeń disialo-Tf metodą HPLC i zestawem CDTECT-RIA, wykazano, iż HPLC jest lepszą techniką do wykrywania osób nałogowo spożywających etanol (czulość wynosiła odpowiednio: 63 i 33%, przy swoistości 90%) [59]. Pod koniec 2003 r. w większości krajów europejskich zaniechano dystrybucji testów CDTECT [20].

%CDT

W 1995 r. firma Axis (Norwegia) wprowadziła na rynek test %CDT-TIA, który w USA był znany pod nazwą CDT UltraQuant [12]. Separacja frakcji CDT od nie-CDT odbywała się na mikrokolumnach podobnych do kolumn z zestawu CDTECT firmy Pharmacia & Upjohn (Szwecja). Izoformy CDT (asialo-, monosialo-, disialo- i 50% frakcji trisialo-Tf) w eluatach, po dodaniu przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej transferynie, oznaczano metodą turbidymetryczną (manualnie lub z użyciem analizatora Hitachi), a wyniki podawano jako odsetek izoform CDT do transferyny całkowitej (stężenia względne) [12,13]. Wartości CDT powyżej 6% w tym teście świadczą o dużej konsumpcji alkoholu (60 g/dobę) [13]. Nowszą wersją testu %CDT-TIA, wprowadzoną w 1999 r., jest zestaw %CDTri-TIA firmy Bio-Rad (USA), w którym wartości CDT były niższe w stosunku do testu poprzedniego (2,6% dla kobiet i mężczyzn) ze względu na to, iż jako CDT oznaczano sumę 3 izoform (asialo-, monosialo- i disialo-Tf) [1]. W innym teście, %CDT-RIA (Axis, dostępnym do roku 1999) (z pomiarem radioimmunologicznym), górny limit dla CDT (suma tych samych izoform co w teście poprzednim) wynosił 2,5% [25]. Analiza porównawcza zestawów %CDT-TIA (Axis) i CDTECT-RIA (Pharmacia & Upjohn) wykazała, iż w wykrywaniu problemów alkoholowych (osoby uzależnione od alkoholu w różnym stadium picia z/bez objawów uszkodzenia wątroby) test CDTECT-RIA był bardziej czuły od %CDT-TIA (czulość odpowiednio 86 i 61%) [62]. Wydajność diagnostyczna CDTECT-RIA była lepsza od wydajności testu %CDT-TIA dla mężczyzn (wielkość pola pod krzywą ROC wynosiła odpowiednio: 0,99 vs. 0,94), natomiast dla kobiet różnica ta była nieistotna statystycznie (odpowiednio: 0,92 vs. 0,90) [62]. Jednak %CDT-TIA jest bardziej swoisty u pa-



Ryc. 3. Zasada testu Tina-quant%CDT drugiej generacji (Roche) do oznaczania CDT i całkowitej transferyny

cientów z dużym stężeniem transferyny w surowicy [62]. Zmodyfikowana wersja testu %CDT-TIA (Axis) (z wykluczeniem frakcji trisialo-Tf) może mieć większą wartość diagnostyczną w wykrywaniu problemów alkoholowych u kobiet, osób pijących z chorobami wątroby oraz pacjentów z dużym stężeniem transferyny w surowicy, w porównaniu z zestawem CDTECT-RIA [4]. Badania ostatnich lat wykazują, iż %CDT-TIA (Axis) może mieć lepszą czułość diagnostyczną od testu CDTECT-RIA (a także od GGT, AST i MCV), u osób uzależnionych od alkoholu w chwili przyjęcia ich do szpitala [5]. Wykazano również, iż korelacja między oznaczeniami CDT, a ilością spożytego alkoholu w miesiącu poprzedzającym badanie była silniejsza w teście %CDT-TIA, niż CDTECT-RIA [5]. W okresie abstynencji (hospitalizacja) szybszą dynamikę spadku CDT zanotowano w teście CDTECT-RIA [5]. Oznaczanie GGT i CDT z wykorzystaniem odpowiedniej formuły, tzw. metoda γ -%CDT-TIA (Axis), pozwala na poprawę dokładności diagnostycznej w rozpoznawaniu nadmiernego spożywania alkoholu u pijących z chorobami wątroby [3]. Porównanie zestawów %CDT-TIA i %CDT-HPLC firmy Axis (oba testy mierzą asialo-, monosialo-, disialo- i 50% trisialo-Tf) z metodą IEF/IB/LD (technika IEF połączona z immunoblottingiem oraz laserową densytometrią dokonująca pomiaru tylko frakcji asialo- i disialo-Tf) wykazało, iż oba testy komercyjne mają większą wydajność diagnostyczną niż procedura IEF/IB/LD [13]. Porównanie testu %CDT-RIA (Axis) i CDTECT-RIA (Pharmacia), które wykorzystują ten sam pomiar radioimmunologiczny, wykazało jednakową przydatność obu testów w wykrywaniu przewlekłego nadużywania alkoholu (60 g/dobę) u starszych mężczyzn (średnia wieku 41 lat) (czułość odpowiednio: 78 i 83% oraz swoistość 94 i 88%), natomiast oba zestawy

okazały się nieskuteczne w rozpoznaniu picia mniejszych ilości alkoholu u kobiet i mężczyzn w młodszym wieku (średnia 21 lat) (przy swoistości powyżej 83%, czułość odpowiednio 44 i 43%) [55]. Sądzi się, iż CDTECT-RIA jest bardziej czułym testem w wykrywaniu przewlekłego picia, jednak wzrost stężenia transferyny w surowicy, może znacząco obniżać jego swoistość [48].

Tinaquant- % CDT/transferrin

Tinaquant-%CDT/transferrin (Roche, Niemcy). Test immunoturbidymetryczny do ilościowego oznaczania CDT w surowicy (50 oznaczeń w zestawie, stężenia względne) z wykorzystaniem analizatorów biochemicznych (np. Hitachi, Modular). W teście pierwszej generacji mianem CDT określano sumę 4 izoform: asialo-, monosialo-, disialo- i 50% trisialo-Tf (wartości dla kobiet i mężczyzn powyżej 6%), a w drugiej generacji – jedynie sumę 3 frakcji: asialo-, monosialo- i disialo-Tf (wartości powyżej 2,6%). Zasadę testu przedstawiono na rycinie 3.

ChronAlcol.D

ChronAlcol.D (Sangui, USA). Wyniki oznaczeń CDT podawane są jednocześnie w stężeniach bezwzględnych i względnych (CDT/całkowita transferyna). Mianem CDT określono sumę 3 izoform: asialo-, monosialo- i disialo-Tf zgodnie z tradycyjną definicją Stibler i wsp. [30]. Wartości prawidłowe podano w tabeli 2. W teście wyróżniamy następujące etapy: saturacja transferyny żelazem, separacja CDT od nie-CDT metodą chromatografii jonowymiennej na mikrokolumnach, pomiar immunoturbidymetryczny z użyciem czynnika [46]. Test ten był walidowany analitycznie i klinicznie [22,33].

Clin-Rep-CDT-HPLC

Clin-Rep-CDT-HPLC (Recipe, Niemcy). Pierwszy komercyjny test do oznaczania CDT z rozdziałem izoform techniką HPLC (100 oznaczeń w zestawie). Pozwala na eliminację wyników fałszywie dodatnich (np. wpływ odmian genetycznych transferyny) i fałszywie ujemnych (np. zespół CDG). Wartości testu znajdują się w tabeli 2. Wyniki podawane są w stężeniach względnych: CDT (suma asialo-, monosialo- i disialo-Tf)/całkowita transferyna.

Do dostępnych na rynku testów komercyjnych do oznaczania CDT należą zestawy %CDT (Axis-Shield, Norwegia, 50 oznaczeń), %CDT-TIA (Bio-Rad, USA, 50 oznaczeń) i Tinaquant-%CDT/transferrin (Roche, Niemcy, 50 oznaczeń).

PODSUMOWANIE

W ciągu ostatnich lat zwiększyła się dostępność oznaczania CDT w rutynowych laboratoriach diagnostycznych w wyniku opracowania i wprowadzenia wielu nowych testów komercyjnych. Pozwoliło to jednocześnie na zwiększenie liczby badań i utwierdzenie znaczenia CDT jako swoistego markera przewlekłego nadużywania alkoholu. Nadal jednak nie rozwiązano podstawowego problemu jakim jest definicja CDT. Większość badaczy mianem CDT określa sumę 3 izoform transferyny, tj.: asialo-, monosialo- i disialo-Tf [30] (tabela 2). Część testów oznacza jednak 4 frakcje, tj. asialo-, monosialo-, disialo- i 50% trisialo-Tf (są to tzw. „trisialo-testy”, tabela 2). Sądzi się, iż izoforma trisialo-Tf nie ma wartości diagnostycznej i nie powinna być zaliczana do

CDT [18,33]. Sugeruje się również, iż badaniem alternatywnym do CDT mogłaby być sama frakcja asialo-Tf [6]. Inny problem to wybór jednostek stężenia CDT: czy wyrażać je w stężeniach względnych (%CDT) (CDT/całkowita transferyna), czy w stężeniach bezwzględnych (mg/l) (U/l)? [21]. W metodach referencyjnych lub potwierdzających (np. IEF, HPLC, CZE) stosowane są jednostki względne, a w testach komercyjnych względne i/lub bezwzględne. Wielu autorów wskazuje na lepszą wydajność kliniczną oznaczeń CDT, gdy wyniki podawano w postaci stężeń względnych, chociażby ze względu na eliminację wpływu zmiennego stężenia transferyny [38,39,56,67]. Z powodu różnych metod oznaczania CDT stosowanych w laboratoriach (tabela 2) zachodzi potrzeba standaryzacji badania. Dotąd nie opracowano międzynarodowego wzorca CDT, ani też odpowiedniego materiału kontrolnego. W rozwiązaniu tych problemów może się okazać pomocna redefinicja CDT, jak i zastosowanie odpowiedniej metody oznaczania. Na konferencji w Berlinie (maj 2000) dotyczącej standaryzacji oznaczeń CDT, wskazano na HPLC, jako wysoce czułą technikę, która może być standardową procedurą używaną np. do kalibracji testów CDT na analizatorach biochemicznych.

W czasie oznaczania CDT należy pamiętać, iż nie jest on badaniem przesiewowym w kierunku wykrycia zwiększonego picia, ale swoistym markerem przewlekłego nadużywania alkoholu, a diagnostyka przewlekłego nadużywania alkoholu powinna zawsze opierać się jednocześnie na badaniach klinicznych (wywiad, kwestionariusz) i laboratoryjnych (CDT, GGT), a nigdy na pojedynczym teście CDT.

PIŚMIENICTWO

- Anton R.F., Dominick C., Bigelow M., Westby C., CDTest Research Group: Comparison of Bio-Rad%CDT TIA and CDTest as laboratory markers of heavy alcohol use and their relationship with gamma-glutamyltransferase. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 1769–1775
- Anton R.F., Moak D.H.: Carbohydrate-deficient transferrin and γ -glutamyltransferase as markers of heavy alcohol consumption: gender differences. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1994; 18: 747–754
- Anttila P., Jarvi K., Latvala J., Blake J.E., Niemela O.: A new modified gamma-%CDT method improves the detection of problem drinking: studies in alcoholics with or without liver disease. *Clin. Chim. Acta*, 2003; 338: 45–51
- Anttila P., Jarvi K., Latvala J., Blake J.E., Niemela O.: Diagnostic characteristics of different carbohydrate-deficient transferrin methods in the detection of problem drinking: effects of liver disease and alcohol consumption. *Alcohol Alcohol.*, 2003; 38: 415–420
- Anttila P., Jarvi K., Latvala J., Niemela O.: Method-dependent characteristics of carbohydrate-deficient transferrin measurements in the follow-up of alcoholics. *Alcohol Alcohol.*, 2004; 39: 59–63
- Arndt T.: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) – should this isoenzyme group be replaced by asialo-Fe2-transferrin and thus standardized? (Abstract). *Alcohol Alcohol.*, 1999; 34: 447
- Arndt T.: Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 13–27
- Arndt T., Behnken J., Martens B., Hackler R.: Evaluation of the cut-off for serum carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse determined by the ChronAlcoL.D.TM assay. *J. Lab. Med.*, 1999; 23: 507–510
- Arndt T., Hackler R., Kleine T.O., Gressner A.M.: Validation by isoelectric focusing of the anion-exchange isotransferrin fractionation step involved in determination of carbohydrate-deficient transferrin by the CDTest assay. *Clin. Chem.*, 1998; 44: 27–34
- Arndt T., Hackler R., Muller T., Kleine T.O., Gressner A.M.: Increased serum concentration of carbohydrate-deficient transferrin in patients with combined pancreas and kidney transplantation. *Clin. Chem.*, 1997; 43: 344–351
- Arndt T., Kropf J., Brandt R., Gressner A.M., Hackler R., Herold M., van Pelt J., Martensson O., Salzmann K., Velmans M.H.: CDTest-RIA and CDTest-EIA for determination of serum carbohydrate-deficient transferrin compared. *Alcohol Alcohol.*, 1998; 33: 639–645
- Bean P.: Carbohydrate-deficient transferrin in the assessment of harmful alcohol consumption: diagnostic performance and clinical significance. *Addict. Biol.*, 1999; 4: 151–161
- Bean P., Liegmann K., Lovli T., Westby C., Sundrehagen E.: Semiautomated procedures for evaluation of carbohydrate-deficient transferrin in the diagnosis of alcohol abuse. *Clin. Chem.*, 1997; 43: 983–989
- Bean P., Peter J.B.: Allelic D variants of transferrin in evaluation of alcohol abuse: differential diagnosis by isoelectric focusing immunoblotting-laser densitometry. *Clin. Chem.*, 1994; 40: 2078–2083
- Cotton F., Adler M., Dumon J., Boeynaems J.M., Gulbis B.: A simple method for carbohydrate-deficient transferrin measurements in patients with alcohol abuse and hepato-gastrointestinal diseases. *Ann. Clin. Biochem.*, 1998; 35: 268–273
- Crivellente F., Fracasso G., Valentini R., Manetto G., Riviera A.P., Tagliaro F.: Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2000; 739: 81–93
- de Jong G., van Dijk J.P., van Eijk H.G.: The biology of transferrin. *Clin. Chim. Acta*, 1990; 190: 1–46
- Dibbelt L.: Does trisialo-transferrin provide valuable information for the laboratory diagnosis of chronically increased alcohol consumption by determination of carbohydrate-deficient transferrin? *Clin. Chem.*, 2000; 46: 1203–1205
- Dumon M.F., Nau A., Hervouet M., Paccalin J., Clerc M.: Isoelectric focusing (IEF) and immunofixation for determination of disialotransferrin. *Clin. Biochem.*, 1996; 29: 549–553

- [20] Golka K., Wiese A.: Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) – a biomarker for long-term alcohol consumption. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 2004; 7: 319–337
- [21] Grimsrud K., Sundrehagen E.: Units, mg/l or % CDT for detection of harmful alcohol consumption? *Addict. Biol.*, 1997; 2: 229–231
- [22] Hackler R., Arndt T., Helwig-Rolig A., Kropf J., Steinmetz A., Schaefer J.R.: Investigation by isoelectric focusing of the initial carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and non-CDT transferrin isoform fractionation step involved in determination of CDT by the ChronAlcoID assay. *Clin. Chem.*, 2000; 46: 483–492
- [23] Hackler R., Arndt T., Kleine T.O., Gressner A.M.: Effect of separation conditions on automated isoelectric focusing of carbohydrate-deficient transferrin and other human isotransferrins using the PhastSystem. *Anal. Biochem.*, 1995; 230: 281–289
- [24] Heggli D.E., Aurebekk A., Granum B., Westby C., Lovli T., Sundrehagen E.: Should tri-sialo-transferrins be included when calculating carbohydrate-deficient transferrin for diagnosing elevated alcohol intake? *Alcohol Alcohol.*, 1996; 31: 381–384
- [25] Helander A.: Absolute or relative measurement of carbohydrate-deficient transferrin in serum? Experiences with three immunological assays. *Clin. Chem.*, 1999; 45: 131–135
- [26] Iffland R.: CDT, γ -GT und Methanol als Alkoholismusindikatoren in Blutproben alkoholauffälliger Kraftfahrer. *Fortschr. Diagn. Praxis Rep.*, 1993; 5: 17–22
- [27] Inoue T., Yamauchi M., Ohkawa K.: Structural studies on sugar chains of carbohydrate-deficient transferrin from patients with alcoholic liver disease using lectin affinity electrophoresis. *Electrophoresis*, 1999; 20: 452–457
- [28] Jaeken J., Carchon H.: The carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: an overview. *J. Inher. Metab. Dis.*, 1993; 16: 813–820
- [29] Jeppsson J.O., Kristensson H., Fimiani C.: Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin. Chem.*, 1993; 39: 2115–2120
- [30] Kamboh M.I., Ferrell R.E.: Human transferrin polymorphism. *Hum. Hered.*, 1987; 37: 65–81
- [31] Kilar F., Hjerten S.: Fast and high resolution analysis of human serum transferrin by high performance isoelectric focusing in capillaries. *Electrophoresis*, 1989; 10: 23–29
- [32] Koch H., Meerkerk G.J., Zaat J.O., Ham M.F., Scholten R.J., Assendelft W.J.: Accuracy of carbohydrate-deficient transferrin in the detection of excessive alcohol consumption: a systematic review. *Alcohol Alcohol.*, 2004; 39: 75–85
- [33] Korzec A., Arndt T., Bar M., Koeter M.W.: Trisialo-Fe2 –transferrin does not improve the diagnostic accuracy of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic excessive alcohol intake. *J. Lab. Med.*, 2001; 25: 407–410
- [34] Kwok-Gain I., Fletcher L.M., Price J., Powell L.W., Halliday J.W.: Desialylated transferrin and mitochondrial aspartate aminotransferase compared as laboratory markers of excessive alcohol consumption. *Clin. Chem.*, 1990; 36: 841–845
- [35] Lacey J.M., Bergen H.R., Magera M.J., Naylor S., O'Brien J.F.: Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 513–518
- [36] Lanz C., Kuhn M., Deiss V., Thormann W.: Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. *Electrophoresis*, 2004; 25: 2309–2318
- [37] Lanz C., Thormann W.: Capillary zone electrophoresis with a dynamic double coating for analysis of carbohydrate-deficient transferrin in human serum: impact of resolution between disialo- and trisialotransferrin on reference limits. *Electrophoresis*, 2003; 24: 4272–4281
- [38] Lesch O.M., Walter H., Freitag H., Heggli D.E., Leitner A., Mader R., Neumeister A., Passweg V., Pusch H., Semler B., Sundrehagen E., Kasper S.: Carbohydrate-deficient transferrin as a screening marker for drinking in a general hospital population. *Alcohol Alcohol.*, 1996; 31: 249–256
- [39] Liegmann K., Westby C., Bean P.: First and second generation procedure for quantitation of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in alcohol abusers. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1996; 20: 804
- [40] Martello S., Trettene M., Cittadini F., Bortolotti F., De Giorgio F., Chiarotti M., Tagliaro F.: Determination of carbohydrate deficient transferrin (CDT) with capillary electrophoresis: an inter laboratory comparison. *Forensic Sci. Int.*, 2004; 141: 153–157
- [41] Martensson O., Harlin A., Brandt R., Seppa K., Sillanaukee P.: Transferrin isoform distribution: gender and alcohol consumption. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1997; 21: 1710–1715
- [42] Oda P.R., Prasad R., Stout R.L., Coffin D., Patton W.P., Kraft D.L., O'Brien J.F., Landers J.P.: Capillary electrophoresis-based separation of transferrin sialoforms in patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Electrophoresis*, 1997; 18: 1819–1826
- [43] Prasad R., Stout R.L., Coffin D., Smith J.: Analysis of carbohydrate deficient transferrin by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 1997; 18: 1814–1818
- [44] Renner F., Kanitz R.D.: Quantification of carbohydrate-deficient transferrin by ion-exchange chromatography with an enzymatically prepared calibrator. *Clin. Chem.*, 1997; 43: 485–490
- [45] Schellenberg F., Martin M., Caces E., Benard J.Y., Weill J.: Nephelometric determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Clin. Chem.*, 1996; 42: 551–557
- [46] Sillanaukee P., Lof K., Harlin A., Martensson O., Brandt R., Seppa K.: Comparison of different methods for detecting carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1994; 18: 1150–1155
- [47] Simonsson P., Lindberg S., Alling C.: Carbohydrate-deficient transferrin measured by high-performance liquid chromatography and CDTest immunoassay. *Alcohol Alcohol.*, 1996; 31: 397–402
- [48] Sorvajarvi K., Blake J., Israel Y., Niemela O.: Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol abuse are significantly influenced by alterations in serum transferrin: comparison of two methods. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1996; 20: 449–454
- [49] Stibler H.: Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin. Chem.*, 1991; 37: 2029–2037
- [50] Stibler H., Allgulander C., Borg S., Kjellin K.G.: Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Med. Scand.*, 1978; 204: 49–56
- [51] Stibler H., Borg S., Allgulander C.: Clinical significance of abnormal heterogeneity of transferrin in relation to alcohol consumption. *Acta Med. Scand.*, 1979; 206: 275–281
- [52] Stibler H., Borg S., Joustra M.: Micro anion exchange chromatography of carbohydrate-deficient transferrin in serum in relation to alcohol consumption (Swedish Patent 8400587-5). *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1986; 10: 535–544
- [53] Stibler H., Kjellin K.G.: Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF protein in tremor of different origins. *J. Neurol. Sci.*, 1976; 30: 269–285
- [54] Stibler H., Sydow O., Borg S.: Quantitative estimation of abnormal microheterogeneity of serum transferrin in alcoholics. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1980; 13(Suppl.1): 47–51
- [55] Stowell L.I., Fawcett J.P., Brooke M., Robinson G.M., Stanton W.R.: Comparison of two commercial test kits for quantification of serum carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Alcohol.*, 1997; 32: 507–516
- [56] Sundrehagen E., Westby C., Axis Biochemicals SA: %CDT or units CDT? Proceedings of the Laboratory Medicine '95, 11th IFCC European Congress of Clinical Chemistry, Tampere, Finland, 2–7 July, 863
- [57] Tagliaro F., Crivellente F., Manetto G., Puppi I., Deyl Z., Marigo M.: Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998; 19: 3033–3039
- [58] Trout A.L., Prasad R., Coffin D., DiMartini A., Lane T., Blessum C., Khatter N., Landers J.P.: Direct capillary electrophoretic detection of carbohydrate-deficient transferrin in neat serum. *Electrophoresis*, 2000; 21: 2376–2383
- [59] Turpeinen U., Methuen T., Alfthan H., Laitinen K., Salaspuro M., Stenman U.H.: Comparison of HPLC and small column (CDTest) methods for disialotransferrin. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 1782–1787
- [60] van Eijk H.G., van Noort W.L.: The analysis of human serum transferrins with the PhastSystem: quantitation of microheterogeneity. *Electrophoresis*, 1992; 13: 354–358
- [61] van Eijk H.G., van Noort W.L., de Jong G., Koster J.F.: Human serum sialo transferrins in diseases. *Clin. Chim. Acta*, 1987; 165: 141–145
- [62] Viitala K., Lahdesmaki K., Niemela O.: Comparison of the Axis %CDT TIA and the CDTest method as laboratory test of alcohol abuse. *Clin. Chem.*, 1998; 44: 1209–1215
- [63] Werle E., Seitz G.E., Kohl B., Fiehn W., Seitz H.K.: High-performance liquid chromatography improves diagnostic efficiency of carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Alcohol.*, 1997; 32: 71–77
- [64] Wuyts B., Delanghe J.R.: The analysis of carbohydrate-deficient transferrin, marker of chronic alcoholism, using capillary electrophoresis. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2003; 41: 739–746

- [65] Wuyts B., Delanghe J.R., Kasvosve I., Wauters A., Neels H., Janssens J.: Determination of carbohydrate-deficient transferrin using capillary zone electrophoresis. *Clin. Chem.*, 2001; 47: 247–255
- [66] Xin Y., Lasker J.M., Rosman A.S., Lieber C.S.: Isoelectric focusing/western blotting: a novel and practical method for quantitation of carbohydrate-deficient transferrin in alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, 1991; 15: 814–821
- [67] Yamauchi M., Hirakawa J., Maezawa Y., Nishikawa F., Mizuhara Y., Ohata M., Nakajima H., Toda G.: Serum level of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol.*, 1993; 1B: 3–8
- [68] Yoshikawa K., Umetsu K., Shinzawa H., Yuasa I., Maruyama K., Ohkura T., Yamashita K., Suzuki T.: Determination of carbohydrate-deficient transferrin separated by lectin affinity chromatography for detecting chronic alcohol abuse. *FEBS Lett.*, 1999; 458: 112–116