

Primerjava metod za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov

Comparison of methods for measurement of carbohydrate deficient transferrin

Petra Finderle, Marija Prezelj

Povzetek: Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (CDT, carbohydrate deficient transferrin) se pojavlja v povečani koncentraciji pri škodljivi rabi etanola. CDT se običajno določa s kromatografskimi ali elektroforetskimi metodami. Pri našem delu smo primerjali tri metode za določanje odstotka CDT: ločevanje z ionsko izmenjevalnimi kolonami z imunoturbidimetrično detekcijo, kapilarno elektroforezo in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, high performance liquid chromatography). Statistično ovrednotenje rezultatov je pokazalo, da so vse tri metode primerljive, vendar smo z ionsko izmenjevalnimi kolonami dobili 10 % več povišanih rezultatov. S kapilarno elektroforezo in HPLC so rezultati podani z grafičnim izpisom ločenih transferinskih oblik, to nam omogoča, da ugotovimo ali so v vzorcu moteče snovi in genetske variante transferina. Iz našega dela in pridobljenih izkušenj pri določanju CDT sledi priporočilo, da so metode z ionsko izmenjevalnimi kolonami in druge metode, s katerimi dobimo le številčno vrednost CDT, primerne kot presejalni testi, HPLC in kapilarna elektroforeza pa se lahko uporabljata kot potrditveni metodi.

Ključne besede: CDT, transferin, etanol, HPLC, kapilarna elektroforeza

Abstract: Carbohydrate deficient transferrin (CDT) is elevated in harmful use of alcohol. Usually, CDT is determined with chromatographic or electrophoretic methods. In our work we compared three methods for CDT determination: separation on ion exchange columns with immunoturbidimetric detection, capillary electrophoresis, and high performance liquid chromatography (HPLC). Statistical evaluation of the results showed no difference between all three methods, but with ion exchange columns method 10 % more elevated results has been determined compared with HPLC and capillary electrophoresis. Capillary electrophoresis and HPLC has a graphical pattern output of separated transferrin isoforms. This enables to detect interfering substances or transferrin genetic variants in the sample. Based on this work and gained experiences in the determination of CDT, we recommend to use methods that give only a numerical CDT result (like ion exchange columns method) as a screening tests; HPLC and capillary electrophoresis methods can be used as confirmation tests in CDT determination.

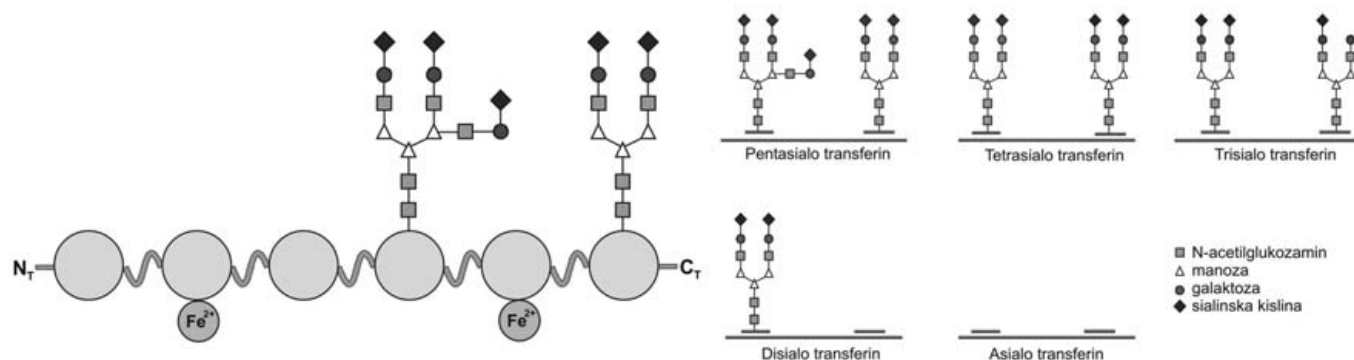
Keywords: CDT, transferrin, ethanol, HPLC, capillary electrophoresis

1 Uvod

Transferin (Tf) je globularni protein, ki prenaša železo v telesu. Je glikoprotein z molekulsko maso 79.750 Da in proteinskim ogrodjem s 679 aminokislinami. Sestoji iz ene same polipeptidne verige, na katero sta na N-koncu pripeti dve oligosaharidni verigi. Strukturno je molekula Tf sestavljena iz dveh globularnih domen (N-terminalne in C-terminalne), kateri neodvisno druga od druge vežeta po en atom železa. Normalno je okoli 30 % celotnega serumskega Tf nasičenega z železom. Celotna količina ogljikovih hidratov v molekuli Tf znaša okoli 6 %. Obe N-glikanski verigi se razlikujeta po stopnji razvejanosti (di-, tri- in tetraantenska struktura) in vsaka N-glikanska veriga se

konča z molekulo sialinske kisline (1, 2). Glede na stopnjo sialiniziranosti ločimo sedem glavnih izooblik transferina: od asialo (brez sialinskih kislin) do heksasialo (s šestimi sialinskimi kislinami) (2, 3). Najpogostejša izooblika je tetrasialotransferin (64–80 %), nizko sialinizirane izooblike (asialo-, monosialo- in disialotransferin) pa so le v sledih (do 5 %) (slika 1) (2 - 4).

Danes je transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (CDT, carbohydrate deficient transferrin) definiran kot delež disialo-, monosialo- in asialotransferina glede na celotno količino transferina. Do leta 2000 je bilo v CDT vključenih tudi 50 % trisialotransferina, vendar so študije pokazale, da ni medsebojne odvisnosti med



Slika 1: Shematski prikaz molekule Tf in pregled izooblik Tf glede na sialiniziranost.

Figure 1: Schematic representation of transferrin molecule and transferrin isoforms

škodljivim vnosom etanola in trisialotransferinom (3, 5, 6). Dokaz o transferinu z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (CDT) v serumu potrdi sum za povečan oziroma škodljiv vnos etanola v telo (3). Velja, da dnevno uživanje 60-80 g etanola 14 dni zaporedoma povzroči povečano serumsko vrednost CDT. Tako količino čistega etanola vsebujejo 3 politrške steklenice piva, 7 dL vina ali 2 dL žganja (7, 8, 9). Vrednosti CDT se normalizirajo v treh tednih abstinence (9). CDT-izooblike transferina nastanejo zaradi škodljivega učinka etanola oziroma njegovih metabolitov (predvsem acetaldehida) v telesu. Med drugim se aktivnost glikoziltransferaze v hepatocitih zmanjša in to moti normalno glikozilacijo beljakovinskih molekul, ki nastajajo v jetrnih celicah. Zato se ob povečanem vnosu etanola pojavijo nepopolnoma oziroma nizko sialinizirane izooblike Tf (3, 7).

CDT velja danes za najzaneslivejši pokazatelj škodljive rabe etanola. Različni viri navajajo različne vrednosti diagnostične občutljivosti in specifičnosti, glede na uporabljeno metodo in glede na obravnavano skupino preiskovancev (abstinenci, normalni in občasni pivci, alkoholisti). Definicija normalnega oziroma neškodljivega pitja etanola je subjektivna in težko določljiva, saj se posamezne države razlikujejo po kulturi pitja alkoholnih pijač. Zato v povprečju velja za CDT kot merilo škodljive rabe etanola, 85-odstotna (do 98-odstotne) diagnostična specifičnost in 65-odstotna (do 93-odstotne) diagnostična občutljivost (3, 5, 10).

Metode za določanje CDT so osnovane na kvantifikaciji ločenih izooblik transferina glede na njihov naboj in izoelektrično točko (pI od 5,2 do 5,9) (3, 11). Izooblike Tf se ločijo med seboj glede na stopnjo sialiniziranosti in glede na stopnjo nasičenosti z železom. Zato ločevanje izooblik glede na sialiniziranost vedno zahteva predpripravo vzorcev, da se nasitijo transferinske molekule z železom (3, 7, 5, 12).

Od leta 1976 se je CDT določal z izoelektričnim fokusiranjem (IEF), ki je do nedavnega veljalo za referenčno metodo. Po letu 1985 so se na tržišču začeli pojavljati reagenčni kompleti, ki so izooblike Tf ločevale na anionsko izmenjevalnih kolonah (mikrokolone) in z imunokemično (RIA, EIA, TIA) detekcijo Tf v eluatu. Po letu 1990 so se pojavile številne druge polavtomatizirane kromatografske in elektroforezne metode za določanje CDT (tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, high performance liquid chromatography), kapilarna

elektroforeza (CE, capillary electrophoresis)) (3, 7, 5). Leta 2005 je bila predstavljena na tržišču novost: reagenčni komplet za neposredno določanje CDT z imunonefelometrično detekcijo (13, 14). Danes velja, da je HPLC referenčna metoda, vendar samo dotlej, dokler ne bo na voljo metoda z masno spektroskopsko detekcijo izooblik Tf (15).

Naše delo je bilo usmerjeno v primerjavo med metodami za določanje CDT, ki se najpogosteje uporabljajo, z namenom podati mnenje o uporabnosti teh metod v kliničnem laboratoriju ter opozoriti na potrebno previdnost pri interpretaciji rezultatov CDT.

2 Materiali in metode

Pri našem delu smo primerjali tri metode za določanje CDT: ionskoizmenjevalno kromatografijo z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC, ion exchange columns), CE in HPLC. Analizirali smo 118 vzorcev seruma naključno izbranih preiskovancev, ki so imeli na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo redno naročeno analizo CDT. Vsem obravnavanim vzorcem smo določili CDT s testiranimi metodami ter aktivnosti encimov gama-glutamilttransferaza (GGT), aspartat-aminottransferaza (AST), alanin-aminottransferaza (ALT) in alkalna fosfataza (AP). Med vzorci smo ločeno obravnavali 12 gastroenteroloških bolnikov. Vsi vzorci so bili do analize shranjeni pod pogoji, ki zagotavljajo stabilnost izooblik Tf pri 4 °C največ 7 dni (16). Za primerjavo smo upoštevali priporočila National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) glede nabora vzorcev in vrednotenja rezultatov (10). Statistično oceno primerljivosti med metodami smo določili z metodo najmanjših kvadratov ter t-testom v programu Statistica for Windows.

2.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo

Na ionskoizmenjevalnih kolonah smo izooblike Tf ločili med seboj glede na njihovo izoelektrično točko oziroma glede na različno afiniteto do nasprotno nabitih funkcionalnih skupin v stacionarni fazi (17).

Za analizo smo uporabili reagenčni komplet Tina-quant® %CDT (Roche Diagnostics) ter biokemični analizator Hitachi 917 (Roche

Diagnostics). Predpripravo vzorcev in analizo smo opravili po proizvajalčevih navodilih. Serumski vzorec smo po inkubaciji z raztopino železa prenesli na ionsko izmenjevalno kolono ter spirali s pufrom (Bis-Tris, pH 6,5). V eluatu z višjo izoelektrično točko (nad 5,7) smo imunoturbidimetrično določili koncentracijo CDT-izoblik. Celotno koncentracijo Tf smo določili v vzorcu po nasičenju z raztopino železa. Vrednost CDT smo podali kot delež izoblik CDT glede na celotno koncentracijo Tf. Proizvajalčeva priporočena referenčna vrednost CDT po tej metodi je <3,0 %.

2.2 Kapilarna elektroforeza

To je tehnologija, pri kateri se molekule ločijo po velikosti in naboju znotraj tanke kapilare. Metoda temelji na delovanju dveh nasprotno usmerjenih tokov v kapilari: elektroosmoze in električnega polja.

Izoblike CDT smo določili z analizatorjem Capillarys 2 (Sebia, Francija) s pripadajočim reagenčnim kompletom. Postopek je popolnoma avtomatiziran, pri katerem se molekule Tf nasitijo z železom avtomatično v samem analizatorju. Nabiti delci se ločijo v stekleni kapilari s SiO₂, pri napetosti 9,2 kV, glede na njihovo elektroforezno gibiljivost v alkalnem pufru (pH 8,8) in elektroosmoznega toka pufra. Ločene izoblike Tf se zaznajo na katodnem delu kapilare pri 200 nm; tu je del kapilare detekcijska celica. Izoblike Tf so grafično prikazane kot ločene frakcije asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- in pentasialotransferina. Rezultati analize so na voljo po 20 minutah od začetka celotnega avtomatiziranega analiznega postopka. Ločevanje v kapilarah poteče v 8 minutah pri vseh 7 nanesenih vzorcih hkrati. V dobljenem elektroferogramu smo določili odstotek CDT iz deleža ločenih izoblik Tf. Referenčna vrednost za CDT, ki jo priporoča proizvajalec, je <1,3 %.

2.3 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

CDT smo določili z gradientnim HPLC-sistemom Variant (Bio-Rad, Nemčija) in ustreznim reagenčnim kompletom. Gradientna HPLC predstavlja modifikacijo klasičnega postopka HPLC s programiranim spreminjanjem elucijske moči mobilne faze.

Serumske vzorce smo pred nanosom v kolono nasitili z raztopino železovega (III) klorida ter oborjene lipoproteine odstranili s

centrifugiranjem. Izoblike Tf so se ločile v 6,30 minutah pri tlaku 10 kg/cm² in pretoku 1,4 mL/min, z anionsko izmenjevalno stacionarno fazo in pufrom Bis-Tris z različno ionsko močjo. Merjenje absorbance je potekalo pri valovni dolžini 460 nm, značilni za kompleks Tf-železo. V kromatogramu smo vrednost CDT določili iz izračunane količine posameznih ločenih izoblik Tf glede na celotni Tf, kot delež površine pod krivuljo. Po proizvajalčevih priporočilih je referenčna vrednost CDT <1,9 %.

3 Rezultati in razprava

Iz statističnega vrednotenja rezultatov smo izključili vzorec, ki je kazal genetsko varianto molekule Tf ter skupino vzorcev preiskovancev z gastroenterološke klinike Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana. Pri 105 analiziranih vzorcih (skupina I) smo izračunali enačbo regresijske premice in korelacijski koeficient za vse tri pare kombinacij. Rezultati CDT vseh treh analiznih tehnik so v medsebojni odvisnosti (metoda najmanjših kvadratov), statistična analiza s t-testom pa je pokazala signifikantno razliko med paroma CE in IEC (p<0,01), ter HPLC in IEC (p<0,01); med HPLC in CE ni signifikantne razlike (p>0,05).

Večja spremenljivost rezultatov se je pokazala v skupini gastroenteroloških bolnikov (skupina II); pri tej smo v vseh vzorcih ugotovili povišano aktivnost jetrnih encimov. Med vrednostmi CDT in aktivnostmi jetrnih encimov ni bilo nobene medsebojne odvisnosti. V tabeli 1 so zbrani rezultati opazovanih parametrov med obema obravnavanima skupinama.

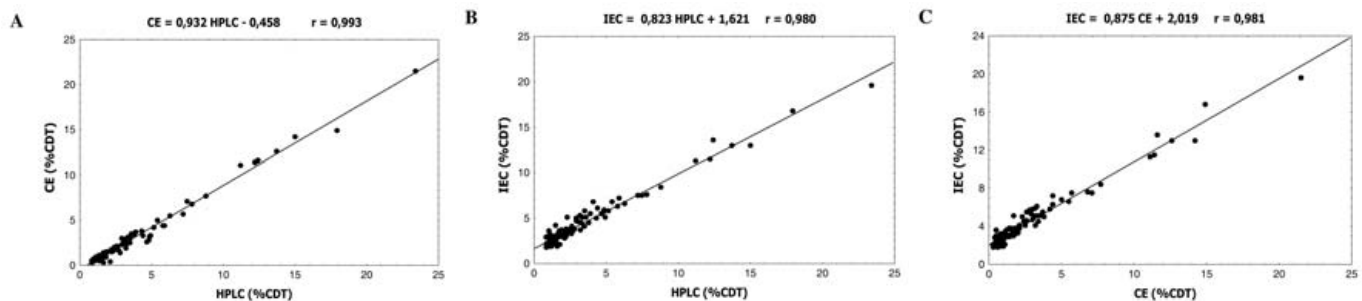
V opravljeni primerjalni študiji smo bili pozorni na vzorce s povišanim CDT. Med 105 vzorci smo s HPLC določili 52 %, s CE 53 % in z IEC 64 % vzorcev z vrednostmi CDT nad priporočeno referenčno vrednostjo. Ni znano kakšen vpliv ima pri zdravnikih razlaga rezultatov CDT, določenih z IEC metodo (10 % več pozitivnih rezultatov glede na ostali dve testirani metodi). Iz poznavanja kliničnega ozadja teh 10 % primerov bi lahko sklepali, da IEC daje lažno pozitivne rezultate. Vzrok bi lahko iskali v neznani specifičnosti reakcije antigen-protitelo ter v samem postopku kromatografskega ločevanja, na katerega vplivata okolje in ročno delo (5, 12, 18). Vendar so številne študije z izoelektričnim fokusiranjem in HPLC pokazale, da je ločevanje izoblik

Tabela 1: Pregled priporočenih referenčnih vrednosti, srednjih vrednosti ($\bar{x}$), standardnih deviacij (sd), najnižjih (min) in najvišjih (max) vrednosti za izmerjene odstotke CDT s testiranimi metodami (HPLC, CE in IEC) v kontrolni skupini 105 vzorcev (skupina I) in skupini 12 vzorcev gastroenteroloških bolnikov (skupina II) ter rezultati t-testa

Table 1: Review of recommended reference values, average values ($\bar{x}$), standard deviations (sd), minimum (min) and maximum (max) of CDT-percentage results measured with the three tested methods (HPLC, CE, and IEC) in the control group of 105 samples (group I) and in the group of 12 samples of gastroenterological patients (group II), and t-test results

CDT metoda	ref.vred. [%]	skupina I (N = 105)			skupina II (N = 12)		
		$\bar{x} \pm sd$	min	max	$\bar{x} \pm sd$	min	max
HPLC ^{a), b)}	1,9	3,4 $\pm$ 3,7	0,8	23,4	2,0 $\pm$ 0,7	1,1	3,0
CE ^{a), c)}	1,3	2,7 $\pm$ 3,5	0,3	21,5	1,1 $\pm$ 0,8	0,4	2,7
IEC ^{b), c)}	3,0	4,4 $\pm$ 3,1	1,8	19,6	3,9 $\pm$ 1,9	1,4	7,8

t-test: ^{a)}p>0,05 med paroma HPLC in CE; ^{b)}p<0,01 med paroma HPLC in IEC; ^{c)}p<0,01 med paroma CE in IEC



Slika 2: Medsebojna odvisnost med metodami A-HPLC/CE, B-HPLC/IEC, C-CE/IEC opisanimi z enačbo regresijske premice s Pearsonovim koeficientom korelacije

Figure 2: Method correlation between A-HPLC/CE, B-HPLC/IEC, and C-CE/IEC represented with the regression line equation and the Pearson correlation coefficient

Tf na kolonah ustrezno in da se med imunoturbidimetrično reakcijo zaznajo CDT-specifične frakcije (4, 11, 17, 19-22).

Odstopanje rezultatov testirane metode od referenčne metode nam v kliničnem laboratoriju poda primerljivost med rezultati obeh metod. Običajno se razlike razpršijo okoli abscise, kar kaže, da metodi dajeta primerljive rezultate. Če imata primerjani metodi različne referenčne vrednosti, se rezultati odstopanja razpršijo okoli vrednosti razlike med referenčnima vrednostma; to se je tudi pokazalo pri našem delu. Različne referenčne vrednosti ovirajo primerjanje rezultatov CDT med laboratoriji. Danes se je pokazala potreba po uskladitvi metod za določanje CDT. Nekateri poskusi so bili usmerjeni v uvedbo različnih faktorjev (izračun razmerja med disialo- in tetrasialotransferinom ter med disialotransferinom in celokupno koncentracijo transferina v serumu), vendar so le-ti uporabni samo pri metodah, s katerimi lahko določimo posamezne izooblike Tf (HPLC, CE). Kontrolni reagenti so pripomogli k verodostojnemu podajanju rezultatov CDT, vendar danes še vedno ostaja potreba po mednarodnem standardu CDT (3, 4, 23, 24). Leta 2007 je skupina znanstvenikov v okviru Mednarodnega združenja klinične kemije in laboratorijske medicine (IFCC, International federation of clinical chemistry and laboratory medicine) objavila smernice za standardno določanje CDT (15).

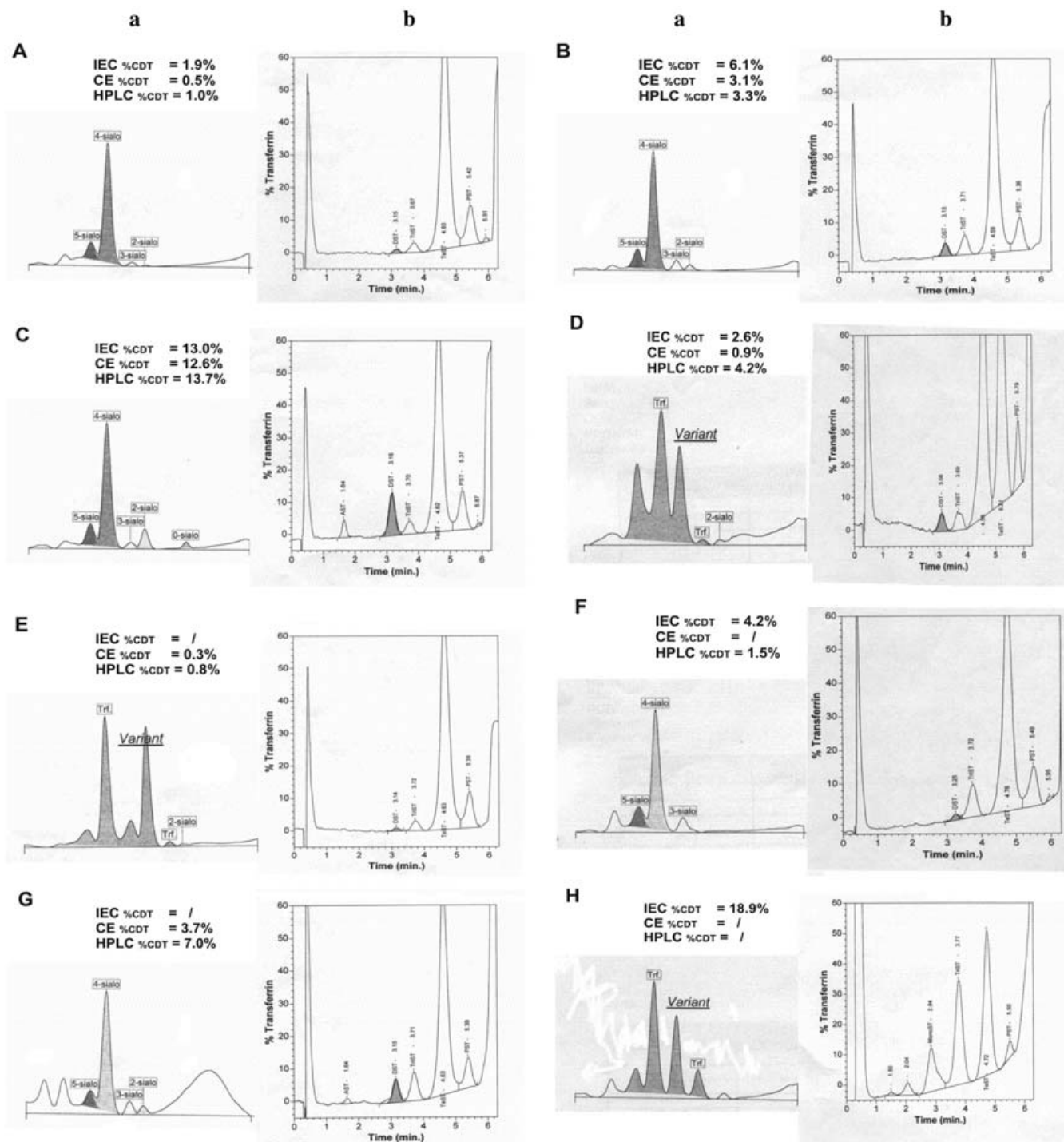
Na sliki 3 so predstavljeni elektroferogrami in kromatogrami testiranih vzorcev. Slika vzorca z vrednostjo CDT znotraj referenčnih mej (slika 3A) predstavlja normalno razporeditev izooblik Tf. Pri povečanem vnosu etanola se vrednost CDT poviša zaradi povišanega deleža disialotransferina (slika 3B) in asialotransferina (slika 3C). Znano je, da je asialotransferin prisoten le v izredno redkih primerih, povezanih s kroničnim alkoholizmom (5, 25). Pri našem delu smo asialotransferin določili 22 odstotkom vzorcev s HPLC in 14,8 odstotkom vzorcev s CE. Ta razlika je verjetno posledica spodnje meje detekcije, ki jo navajata proizvajalca CE do 0,4 % in HPLC do 0,3 %. Na prvi pogled sta obe meji detekcije podobni, vendar ob upoštevanju priporočenih referenčnih vrednosti (CE do 1,3 % in HPLC do 1,9 %) lahko sklepamo, da ima HPLC nižjo mejo detekcije. Razlike v rezultatih pri vzorcih z asialotransferinom niso imele večjega vpliva na klinično interpretacijo izvida, saj je bil CDT v vseh primerih povišan in primerljiv.

Metode, ki podajo grafični izpis rezultatov, omogočajo določitev genetskih variant Tf; to smo potrdili tudi z našim delom (slika 3D). Iz

samih rezultatov CDT, dobljenih z IEC metodo ne moremo določiti genetskih variant, lahko le posumimo vanje, ko je rezultat CDT (z metodo IEC) izredno visok, jetrni encimi pa ne kažejo na patofiziološke poškodbe jeter. V takih primerih je nenadomestljiva analiza CDT z metodo, ki omogoča določanje posameznih izooblik transferina (HPLC ali CE). Genetske variante Tf so bile najprej odkrite leta 1957 z izoelektričnim fokusiranjem. Poleg najpogostejše skupine variante TfC (common) so bile odkrite še anodne (nizka pI) variante TfB in katodne (visoka pI) variante TfD (4, 12, 25). TfC je najpogostejša varianta Tf pri kavkaški populaciji; pri tej je poznanih okoli 16 podtipov (1). Najpogostejše se v naravi pojavljajo mešane (heterozigotne) genetske variante Tf. Švedska študija (Beckman et al. 1998) je pokazala, da se varianta BC pojavlja v približno 0,7 %, varianta CD v približno 0,2 % ter varianta C2C3 v približno 0,6 % (2, 4). Pri našem delu smo določili 1 genetsko varianto BC (slika 3D), kar se sklada z navedeno razširjenostjo genetskih variant Tf.

Variante BC in CD imajo značilne kromatografske slike, z značilnimi retencijskimi časi in višinami pikov C, B ali D, zato jih ni težko določiti. Vrednosti CDT, izmerjene z metodami, ki omogočajo določanje posameznih izooblik transferina, so pri BC visoke glede na CDT, izmerjene z metodo IEC, pri variantah CD pa je ravno obratno (4). Pri redki genetski varianti C2C3 ne pride do ločitve med disialotransferinom in trisialotransferinom; ta varianta je opisana z nizko vrednostjo CDT, določeno s CE in HPLC ter z visokimi vrednostmi CDT z IEC (4, 12, 16). Vendar je pri tem potrebna previdnost, saj so primeri neločenih pikov disialotransferina in trisialotransferina pogosti, kljub nizki pogostnosti genetske variante C2C3 (~0,6 %). Tak primer vidimo na sliki 3F, kjer nizka celotna količina Tf v vzorcu ter klinično ozadje preiskovanca z ustreznimi vrednostmi aktivnosti jetrnih encimov (GGT, AST, ALT) kažejo na cirozo jeter. Med vsemi 118 vzorci se v 5 primerih frakciji disialotransferina in trisialotransferina nista ločili.

Meritev CDT se danes lahko uporablja tudi kot presejalni test v diagnostiki CDG-sindroma (congenital disorder of glycosilation, prirojena motnja glikozilacije). Pri tem ne gre za spremembe v proteinski strukturi Tf, ampak za moteno glikozilacijo vseh beljakovin, ki se tvorijo in glikozilirajo v jetrih. Zaradi motene gradnje glikozidnih verig se količina tetrasialotransferina zmanjša na račun povečanja deleža trisialo- in ostalih nizkosialiniziranih izooblik Tf (slika 3H) (26).



Slika 3: Elektroferogrami (a) in kromatogrami (b) vzorcev: A-normalen CDT, B-povišan CDT, C-povišan CDT z vsebovanim asialotransferinom, D-genetska varianta Tf, E-sum za genetsko varianto Tf, F-združena trisialo- in disialotransferin (ciroza jeter), G- imunoglobulini zakrivajo asialotransferin, H-CDG sindrom tip II

Figure 3: Electropherograms (a) and chromatograms (b) of samples: A-normal CDT, B-high CDT, C-high CDT with asialotransferrin, D-genetic variant of Tf, E-possible genetic variant of Tf (not defined), F-associated threesialo- and disialotransferrin (hepatic cirrhosis), G- immunoglobulins are covering asialotransferrin, H-CDG sindrom type II

Testirane analizne metode so več ali manj avtomatizirane in so primerne za rutinsko uporabo v kliničnih laboratorijih. Danes je vedno pogostejše povpraševanje po določanju CDT, zato morajo biti metode hitre, zanesljive in z nizkim časom analize vzorca (TAT, turnaround time) ter morajo omogočati sledenje in neposredno dokumentiranje rezultatov. Glede tega ima prednost popolnoma avtomatiziran postopek določanja CDT s kapilarno elektroforezo na Capillarys 2, kjer lahko analiziramo 38 vzorcev na uro; predpriprava vzorcev se izvede v samem analizatorju ter omogoča grafični pregled ločenih izooblik Tf. Pri HPLC prav tako dobimo grafični izpis ločenih izooblik Tf, vendar je tu predpriprava vzorcev ročna, a nezahtevna. S to metodo smo lahko analizirali 6 vzorcev na uro. Postopek z IEC zahteva več ročnega dela – inkubacijo vzorcev, elucijo na anionsko izmenjevalnih kolonah, redčenje vzorcev ter še končno računanje vrednosti odstotka CDT. Poleg tega pri IEC nimamo vpogleda na ločevanje izooblik Tf, ampak se s protitelesi (antiserum proti humanemu transferinu) ugotavljajo različne izooblike Tf hkrati, zato ne dobimo nobenih podatkov o prisotnih izooblikah ali variantah Tf. Specifičnost reakcije protitelo-transferin je neznana, kar lahko vodi v lažne rezultate (lažno pozitivne, lažno negativne), in sicer v primerih, ko so v vzorcu snovi, ki se nespecifično vežejo na protitelesa proti transferinu. S tega stališča predstavlja nedvomno prednost določanje CDT z metodami, ki omogočajo detekcijo posameznih izooblik transferina (HPLC, CE).

Pri CE in HPLC se meri CDT pri različnih valovnih dolžinah. Pri 200 nm ima absorpcijski maksimum peptidna vez, zato lahko pri tem zaznamo vse beljakovine. Kompleks transferin-železo selektivno absorbira pri 460 nm (11). Zato je pričakovano, da je več snovi, ki lahko motijo zaznavanje in kvantifikacijo izooblik Tf pri CE. Upoštevati moramo predvsem elektroforezno gibljivost Tf v območju beljakovin beta-2, kjer lahko vsebnost monoklonskih protiteles ali visoko poliklonsko ozadje onemogoči ustrezno določitev CDT (slika 3G). Tudi v primeru, kot je prikazan na sliki 3E, ne moremo z gotovostjo trditi, da gre za genetsko varianto. Zato je nujna previdnost pri razlagi odstotka in izdajanju izvida CDT.

4. Sklepi

Laboratorijska diagnostika škodljive rabe etanola zahteva obširno anamnezo in ustrezen izbor laboratorijskih testov. V te namene se običajno uporabljajo serumske encimske aktivnosti gama-glutamilttransferaze (GGT), aspartat-aminotransferaze (AST) in alanin-aminotransferaze (ALT), De Ritisov koeficient (AST/ALT) ter povprečni volumen eritrocitov (MCV). Vsak posamezni test ima v te namene nizko diagnostično občutljivost, vendar so ti parametri v kombinaciji z vrednostjo CDT učinkovit pripomoček v diagnostiki in spremljanju škodljive rabe etanola (24, 23, 4, 7).

Povišan rezultat CDT ima velik socialni vpliv, zato določanje CDT zahteva zanesljive postopke preanalize, analize in interpretacije rezultatov (23).

Vse tri metode, ki smo jih testirali pri našem delu, so se pokazale kot zanesljive in med seboj primerljive za uporabo v kliničnih laboratorijih. Nedvomno imajo prednost metode, ki omogočajo določanje posameznih izooblik transferina (HPLC in CE), ker lahko spremljamo ločevanje izooblik Tf in lahko ugotavljamo vsebnost variant Tf. Pri vseh

metodah, s katerimi dobimo kot rezultat samo številčno vrednost CDT (IEC, direktna imunonefelometrija), je potrebna večja previdnost pri navajanju rezultatov s povišanim CDT. Vedno moramo upoštevati vpliv motečih snovi, genetskih variant, hudih poškodb jeter, ki niso nastale zaradi škodljive rabe etanola in onemogočajo pravilno interpretacijo rezultatov. Zato morajo zdravniki oceniti celotno klinično sliko in ozadje preiskovancev (4, 5, 23, 18).

Iz našega dela sledi ugotovitev, da je določanje CDT z aparatom Capillarys 2 (Sebia) primerno za vsakdanje, rutinsko delo v kliničnih laboratorijih in ustreza kot zamenjava za metodo IEC. Vendar poudarjamo, da HPLC velja danes za referenčno metodo (začasno, dokler ne bo na voljo metoda z masno spektroskopijo) pri določanju CDT. Priporočamo, da se vsi vzorci s CDT nad referenčno vrednostjo pri preiskovancih, pri katerih ni škodljive rabe etanola, ponovno analizirajo z začasno referenčno metodo (HPLC) v laboratoriju, ki ima izkušnje z vsemi omenjenimi metodami. To velja predvsem za primere, če CDT ni bil določen z metodami, ki omogočajo določitev posameznih izooblik transferina (HPLC ali CE).

5. Literatura

1. Das SK, Vasudevan DM. Should we use carbohydrate deficient transferrin as a marker for alcohol abusers? *Indian J Clin Biochem* 2004; 19 (2): 36-44.
2. De Jong G, van Dijk J P, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 1990; 190: 1-46.
3. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation. *Clin Chem* 2001; 47 (1): 13-27.
4. Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson JO. Interference of Transferrin Isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin Quantification in the Identification of Alcohol Abuse. *Clin Chem* 2001; 47:1225-1233.
5. Bortolotti F, De Paoli G, Tagliaro F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: A critical review of the literature 2001–2005. *J Chromatogr B*. 2006; 841: 96–109.
6. 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.
7. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991; 37: 2029 - 2037.
8. Prezelj M, Zorec Karlovšek M. Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov v diagnostiki škodljive rabe alkohola. *Farm Vestn* 2002; 53: 41-49.
9. Storey EL, Mack U, Powell LW, Halliday JW. Use of chromatofocusing to detect a transferrin variant in serum of alcoholic subjects. *Clin Chem* 1985; 31: 1543-1545.
10. NCCLS approved guideline EP9-A2: Method comparison and bias estimation using patient samples. Clinical and laboratory standards institute, 2002; 22(19).
11. Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 1993; 39: 2115-2120.

12. Wuyts B, Delanghe JR, Kasvosve I, Wauters A, Neels H, Janssens J. Determination of Carbohydrate-deficient Transferrin Using Capillary Zone Electrophoresis. *Clin Chem* 2001; 47: 247-255.
13. Dade Behring (P. Overstreet-Miller): Dade Behring Launches N Latex CDT for Use on Its BN Systems; First Direct Immunoassay to Identify Chronic Alcohol Abuse. Dade Behring home page, Journalists, Press Release Article 2005; <http://media.dadebehring.com/phoenix.zhtml?c=194559&p=irol-newsArticle&ID=778467&highlight=>
14. Delanghe JR, Helander A, Wielders JPM, Pekelharing JM, Roth HJ, Schellenberg F, Born C, Yagmur E, Gentzer W, Althaus H. Development and Multicenter Evaluation of the N Latex CDT Direct Immunonephelometric Assay for Serum Carbohydrate-Deficient Transferrin. *Clin Chem* 2007; 53:1115-1121.
15. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JP, Anton RF, Whitfield JB, Helander A; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardization of Carbohydrate-deficient Transferin (IFC-WG-CDT). Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2007; 45: 558-562.
16. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC Method for Carbohydrate-deficient Transferrin in Serum. *Clinical Chemistry*. 2003; 49: 1881-1890.
17. Schwarz MJ, Domke I, Helander A, Janssens PMW, van Pelt J, Springer B, Ackenheil M, Bernhardt K, Weigl G, Soyka M. Multicentre evaluation of a new assay for determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Alcohol* 2003; 38: 270 - 275.
18. Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Trevisan MT, Floreani M, Tagliaro F. Analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin: Comparative Evaluation of Turbidimetric Immunoassay, Capillary Zone Electrophoresis, and HPLC. *Clin Chem* 2005; 51: 2368-2371.
19. Turpeinen U, Methuen T, Alfthan H, Laitinen K, Salaspuro M, Stenman UH. Comparison of HPLC and Small Column (CDTect) Methods for Disialotransferrin. *Clin Chem* 2001; 47:1782-1787.
20. Legros F et al. Carbohydrate-deficient Transferrin Isoforms Measured by Capillary Zone Electrophoresis for Detection of Alcohol Abuse. *Clin Chem* 2002; 48: 2177-2186.
21. Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, Kropf J, Steinmetz A, Schaefer JR. 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 ChronAlcol.D. Assay. *Clin Chem* 2000; 46: 483-492.
22. Arndt T, Hackler R, Kleine TO, Gressner AM. Validation by isoelectric focusing of the anion-exchange isotransferrin fractionation step involved in determination of carbohydrate-deficient transferrin by the CDTect assay. *Clin Chem* 1998; 44: 27 - 34.
23. Arndt T, Kropf J: Alcohol Abuse and Carbohydrate-deficient Transferrin Analysis: Are Screening and Confirmatory Analysis Required? *Clin Chem* 2002; 48: 2072-2074.
24. Das SK, Nayak P, Vasudevan DM. Biochemical markers for alcohol consumption. *Indian J Clin Biochem* 2003; 18: 111-118.
25. Arndt T. Asialotransferrin—An Alternative to Carbohydrate-deficient Transferrin? *Clin Chem* 2003; 49: 1022-1023.
26. Helander A, Bergström J, Freeze HH. Testing for Congenital Disorders of Glycosylation by HPLC Measurement of Serum Transferrin Glycoforms. *Clin Chem* 2004; 50: 954-958.