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: Vincenza Bianchi[1], Roberta Pacifici[2], Ilaria Palmi[2], Simona Pichini[2], Arialdo Vernocchi[3], Gianpaolo Merlini[4], Ferruccio Ceriotti[5], Mario Plebani[6]

Gruppo di lavoro GFTI-SIMLA: Franco Tagliaro[7], Marzia Bernini[8], Federica Bortolotti[7], Marina Caligara[9], Paola Cassandro[10], Nadia De Giovanni[11], Rossella Snenghi[12], Elisabetta Bertol[13]

[1]Laboratorio di Tossicologia, Azienda Ospedaliera Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria
[2]Farmacodipendenza, Tossicodipendenza e Doping, Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma
[3]Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale di Treviglio (BG)
[4]Laboratori di Ricerca in Biotecnologie, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Dipartimento di Biochimica, Università degli Studi, Pavia
[5]Diagnostica e Ricerca San Raffaele, Istituto Scientifico Universitario San Raffaele, Milano
[6]Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera-Universitaria, Padova
[7]Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina Legale e Medicina del Lavoro, Università degli Studi, Verona
[8]Dipartimento di Specialità Chirurgiche, Radiologiche e Medico Forensi, Unità Operativa di Medicina Legale, Università degli Studi, Brescia
[9]Dipartimento di Fisiologia Umana, Sezione di Tossicologia Forense, Università degli Studi, Milano
[10]Dipartimento di Medicina Pubblica Clinica e Preventiva, Seconda Università degli Studi, Napoli
[11]Istituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma
[12]Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Università degli Studi, Padova
[13]Dipartimento di Anatomia, Istologia, Medicina Legale, Struttura di Tossicologia Forense, Università degli Studi, Firenze

ABSTRACT

Carbohydrate-deficient transferrin (CDT): analytical and interpretative strategies. This document presents a comprehensive overview of biochemistry and physiology of transferrin (Tf) and carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and on the role of CDT as alcohol abuse marker. It discusses the characteristics of the available analytical methodologies for CDT determination and finally presents a set of recommendations. CDT measurements should be performed only in accredited laboratories, having a quality system in place and regularly performing IQC and participating in EQAS. Unequivocal patient identification and a documented chain of custody are needed. Non hemolysed serum is the preferred sample and, if it has to be stored for more than 8 h, freezing at -20 °C is recommended. Immunological methods are acceptable only as first level testing. A confirmation of positive findings with analytical methods based on different physico-chemical principles is recommended. The result should be expressed as percentage of disialo-Tf on total Tf. Each laboratory should establish its own decision limit based on the characteristics of the analytical method used and on the scope for which the measurement is performed. The employed analytical method should be indicated in the final report.

INTRODUZIONE

L'abuso di alcol è un problema di grande attualità, non solo per le implicazioni cliniche e sociali, ma anche per i risvolti medico-legali, che stanno assumendo un ruolo di crescente importanza. L'Europa è il continente con il più elevato consumo di alcol (15 L/anno pro capite) e inoltre il numero di consumatori cresce ogni anno (1), mentre l'Italia presenta l'età più bassa in Europa in relazione al primo contatto con le bevande alcoliche (2). Dai dati della Società Italiana di Alcologia emerge che in Italia sono circa 32 milioni le persone che bevono regolarmente, mentre sono 3,5 milioni coloro che bevono in maniera inadeguata, cioè che arrivano a manifestare sintomi da intossicazione acuta. Gli alcolisti, ovvero i soggetti alcol dipendenti con patologie correlate, sono circa un milione, mentre i decessi per cause alcol correlate sono circa 30.000 all'anno, dato significativo se paragonato ai 1000 decessi/anno per tossicodipendenza. L'uso di alcol in Italia rappresenta la quarta causa di morte. Tra gli indicatori di danno indiretto prodotto dall'alcol, la mortalità per incidente stradale dovuta all'uso di etanolo nel nostro Paese viene stimata tra il 30% ed il 50% (2). Il 10% degli assistiti dai medici di Medicina Generale presenta una patologia alcol correlata e il 10% dei ricoveri negli ospedali è legato al consumo di bevande alcoliche (3).

La diagnosi oggettiva di abuso alcolico, pertanto, assume un rilievo fondamentale in diverse aree della medicina clinica e legale. Oltre all'approccio diagnostico tradizionale basato sulle informazioni anamnestiche, sull'esame clinico, sull'uso di questionari, nonché sull'impie-

go di alcuni indicatori biochimici non specifici [enzimi epatici, volume corpuscolare medio (MCV)], negli anni più recenti l'attenzione si è spostata su nuovi indicatori di abuso alcolico, tra i quali la transferrina carboidrato-carente o "carbohydrate-deficient transferrin" (CDT). La CDT viene considerata dalle linee guida internazionali una indagine diagnostica con livello di raccomandazione A e nella realtà italiana un indicatore affidabile ed estremamente specifico di abuso alcolico cronico.

INQUADRAMENTO BIOCHIMICO DELLA TRANSFERRINA

Struttura e funzioni

La trasferrina (Tf) è una β_1-globulina con un PM che varia da 75,37 a 79,61 kDa. E' costituita da una sola catena di 679 amminoacidi (aa) ed è separata in due domini globulari (N-terminale aa 1-336 e C-terminale aa 337-679). Questi domini possono legare ciascuno uno ione Fe^{3+}, indipendentemente uno dall'altro. Il dominio C-terminale porta due catene glucidiche legate all'azoto delle asparagine 413 e 611 (4). La Tf lega reversibilmente numerosi cationi come ferro (Fe), rame, zinco, cobalto e calcio, ma solo il legame con il Fe ed il rame sembra avere significato fisiologico. Ciascuna molecola di Tf ha la capacità di legare al massimo due ioni Fe e associare in un processo pH-dipendente un'anione (per bilanciare la carica dei cationi) che *in vivo* è rappresentato sostanzialmente dal bicarbonato (4). Il complesso Fe-Tf ha un'assorbanza massima a 470 nm.

La Tf è sintetizzata principalmente dal fegato ed in piccola quantità dal sistema reticolo endoteliale e dalle ghiandole endocrine (testicoli ed ovaie) con un'emivita di circa 7 giorni (5).

Le concentrazioni plasmatiche sono regolate principalmente dalla disponibilità di Fe: in condizioni ferrocarenziali le concentrazioni plasmatiche di Tf aumentano, mentre dopo somministrazione di Fe ritornano a livelli fisiologici.

Eterogeneità

La Tf è una molecola che presenta diversi livelli di eterogeneità (4, 6). Il primo livello di eterogeneità è dovuto al carico di Fe. Infatti, possono essere identificate quattro forme di Tf: l'apotransferrina (pI Fe_0 = 6,1), le Tf monoferriche, dove il Fe è legato nei domini N- o C-terminali (pI Fe_{1N} = 5,8 e pI Fe_{1C} = 5,7) e la Tf diferrica (pI Fe_2 = 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 pI di 0,3 unità. Il secondo livello di eterogeneità è determinato dalla presenza e dalla composizione delle catene glicaniche (7). Queste sono costituite da residui di N-acetilglicosammina, mannoso e galattosio e possono essere bi-, tri- e tetrantennate. Ciascuna antenna termina con una molecole di acido sialico che crea una carica negativa alla terminazione della catena. In linea teorica sono possibili Tf con residui di acido sialico da 0 ad 8 (da 0 a 2 catene, cioè da 0 ad 8 antenne). Le forme asialo, monosialo e ottasialo non sono fisiologicamente rilevabili nel siero. La tetrasialo-Fe_{1N}-Tf, la glicoforma più rappresentata nel siero umano, contiene due N-glicani biantennari 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-Tf (pI 5,7), la trisialo-Tf, (pI 5,6), la pentasialo-Tf (pI 5,2) e la esasialo-Tf, (pI 5,0). Per ogni residuo di acido sialico si osserva una variazione approssimativa del pI di 0,1 unità per molecola (8-10). Studi di spettrometria di massa hanno evidenziato che la disialo-Tf 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 (11). Il terzo livello di eterogeneità è situato a livello della struttura primaria della proteina (12-15). Si conoscono almeno 38 varianti genetiche che differiscono per uno o più amminoacidi, anche se tre sono i tipi di Tf che si possono trovare con una prevalenza >1%. La Tf C è la più comune nella popolazione caucasica: di questa si conoscono almeno 16 varianti (C1-C16). La variante 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 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. A queste si aggiungono le associazioni eterozigoti tra le varie C, B e D.

DEFINIZIONE DI TRANSFERRINA CARBOIDRATO-CARENTE

Le glicoforme di Tf CDT-correlate, sulla base di un ampio consenso scientifico, comprendono le glicoforme con un pI ≥5,7 e quindi asialo-Tf, monosialo-Tf e disialo-Tf, che rappresentano complessivamente, nei soggetti non abusatori di alcol, meno del 2% della Tf totale. Alcuni metodi immunometrici per la determinazione della CDT hanno incluso nel passato quote di trisialo-Tf. Questo ha rappresentato l'oggetto di un dibattito che si è concluso con la decisione di escludere la trisialo-Tf dalla definizione della CDT, non mostrando questa correlazione con l'abuso alcolico (5,16). Con le tecniche analitiche attualmente disponibili ("isoelectrofocusing" (IEF), elettroforesi capillare (CE) e HPLC), la disialo-Tf è determinabile anche nei soggetti che non bevono alcol, mentre le frazioni asialo- e monosialo-Tf usualmente non sono identificabili in tali soggetti. Tuttavia, in presenza di un netto incremento della disialo-Tf, si assiste di norma alla comparsa di concentrazioni determinabili di asialo-Tf. Per quel che riguarda la monosialo-Tf ricordiamo che, nonostante la sua formale inclusione nella definizione originale di CDT, essa non è mai stata chiaramente e sistematicamente associata all'abuso alcolico.

MECCANISMI FISIOPATOLOGICI DELL'INCREMENTO ALCOL-INDOTTO DELLA CDT

Vi è attualmente un generale accordo sul fatto che

deve considerarsi critica, ai fini di abuso alcolico, una quantità di alcol pari a 60-80 g/die assunta per 10-15 giorni, quantità considerata critica anche per le cirrosi alcol correlate. Tuttavia, ad oggi, l'esatto meccanismo mediante il quale l'uso eccessivo di alcol etilico determini l'aumento delle glicoforme carboidrato-carenti della Tf 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 della glicosilazione piuttosto che la sintesi della catena proteica (17). Vi sono inoltre evidenze secondo cui la concentrazione di CDT aumenta, pur rimanendo entro i comuni limiti fisiologici, anche in caso di moderato consumo di bevande alcoliche (18).

La concentrazione sierica di CDT si riduce a seguito dell'astinenza da alcol etilico con un'emivita media di circa 14 giorni. Non è ancora chiarita la variabilità individuale dei meccanismi fisiopatologici che sottendono all'incremento in ragione del 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 (19).

STANDARDIZZAZIONE DELLA DETERMINAZIONE DELLA CDT

Dalla sua scoperta nel 1978 (20), la CDT è presto divenuta oggetto di ricerca sia in area preclinica che clinica. Una recente ricerca effettuata in PubMed e relativa al periodo 1986-2007 (parola chiave: "carbohydrate-deficient transferrin") ha permesso di evidenziare 587 articoli.

Nel 2007 un gruppo di lavoro afferente all'IFCC [Working Group on Standardization of Carbohydrate-Deficient Transferrin (IFCC-WG-CDT)] ha pubblicato un documento contenente indicazioni relative alla standardizzazione metodologica della determinazione della CDT (21). Attualmente, lo sviluppo di numerosi metodi per la misura della CDT sta favorendo l'uso di questo biomarcatore d'abuso alcolico, sebbene le caratteristiche e le prestazioni dei vari metodi siano differenti. Anche un'indagine italiana condotta nei laboratori pubblici ha ampiamente dimostrato questa disomogeneità metodologica (22). Per questo motivo il documento dell'IFCC-WG-CDT (21) è particolarmente prezioso in quanto definisce:

- le caratteristiche dell'analita,
- il misurando e la nomenclatura da utilizzare,
- il metodo di riferimento,
- le modalità di espressione del risultato.

Definizione dell'analita

Sia l'asialo- che la disialo-Tf sono chiaramente correlabili al consumo alcolico cronico, sebbene le due molecole mostrino differenti sensibilità e specificità (20, 23-25). Il gruppo IFCC ha identificato nella disialo-Tf l'analita "target" per la CDT cui far riferimento per la standardizzazione della misurazione della molecola in qualità di biomarcatore dell'abuso alcolico. Infatti, pur essendo la asialoforma più specifica della disialo-Tf nell'identificare l'abuso alcolico, essa è rilevabile solo quando la forma disialo- è già aumentata e pertanto, al momento, è quest'ultima forma ad avere la più elevata sensibilità diagnostica. A questo proposito, si deve tuttavia sottolineare che questa proposta, che pur presenta giustificazioni pratiche, non trova il consenso di altri Autori che sottolineano comunque il grande valore diagnostico della asialo-Tf soprattutto in termini di specificità (26).

Nella definizione dell'analita è importante tenere conto del livello di saturazione del Fe poiché questo influenza non solo il pI, la struttura e quindi le proprietà chimico-fisiche della Tf, ma probabilmente anche le sue proprietà antigeniche. Per quei metodi che si basano sulla diversa carica delle glicoforme (pI) la misura dovrebbe essere effettuata solo dopo completa saturazione del Fe.

La Tf è una molecola complessa. Tale complessità è data dall'avere differenti numeri di residui di acido sialico. Pertanto, quando ci si riferisce a strutture che differiscono per il numero di tali residui è raccomandabile utilizzare la parola "glicoforma" al posto della generica "isoforma": asialo-, monosialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo-, ecc. sono differenti glicoforme della Tf.

Proposta di un metodo analitico di riferimento

È auspicabile che il metodo analitico di riferimento non sia proprietario, sia individuato da un organismo scientifico autorevole e fornisca risultati affidabili in tutti i campioni oggetto di analisi (ad es. anche quelli con eventuali varianti genetiche della Tf). La spettrometria di massa associata a metodi separativi cromatografici e/o elettroforetici potrebbe diventare la migliore tecnica analitica di riferimento, ma al momento la comunità scientifica non dispone di un metodo che sfrutti tale tecnologia. L'IFCC-WG-CDT ritiene che la HPLC sia il metodo candidato a divenire riferimento *ad interim* per la misura della CDT. Con il termine *ad interim* l'IFCC-WG-CDT fa riferimento al possibile futuro sviluppo di un metodo definitivo in spettrometria di massa.

I quattro punti che permettono di identificare la HPLC come tecnica di base per lo sviluppo di un metodo di riferimento sono:

1. la lunghezza d'onda che rende specifica la misura e minimizza le possibili interferenze,
2. la separazione adeguata delle glicoforme della Tf,
3. la quantificazione assoluta o relativa della concentrazione della disialo-Tf attraverso la misura dell'area o dell'altezza del picco;
4. il grafico che consente la tracciabilità e la semplice identificazione del picco.

Su questa raccomandazione rilasciata dal gruppo di studio dell'IFCC, alcuni Autori hanno sollevato recentemente critiche relative al potere risolutivo e alla stessa lunghezza d'onda utilizzata (27).

Una seconda tecnica analitica separativa, applicata all'analisi della CDT è la CE, frequentemente utilizzata in ambito forense (27). Sebbene secondo alcuni Autori la CE sia considerata meno affidabile della HPLC come tecnica analitica di riferimento, poiché utilizza una lunghezza d'onda meno specifica (~200 nm) alla quale

assorbono anche le altre proteine potenzialmente interferenti con la determinazione della disialo-Tf (28-30), una serie di miglioramenti analitici rilevanti l'ha resa nel tempo applicabile alla attività di molti laboratori clinici. Secondo alcuni Autori la sensibilità analitica della CE appare al momento minore di quella della HPLC (31). A tal proposito, va sottolineato che è necessario distinguere il principio analitico (HPLC, CE, ecc.) dalla specifica procedura applicativa e che ai fini pratici va valutata l'effettiva affidabilità del metodo in uso rispetto agli obiettivi analitici e clinici, a prescindere dal principio analitico (HPLC, CE).

In conclusione, ad oggi, non è disponibile un metodo da potersi ritenere in assoluto come metodo di riferimento. Su questa base, e particolarmente per l'impiego in ambito forense, viene richiesta la concordanza quali-quantitativa tra almeno due metodi analitici basati su principi chimico-fisici differenti, ma con paragonabile sensibilità e specificità. In questa visione, l'accoppiamento di metodi elettroforetici e cromatografici sembra raccomandabile. L'adozione del metodo di scelta e delle strategie diagnostiche che permettano di documentare l'affidabilità analitica pertanto dipendono dal contesto clinico e dalla stesura di protocolli operativi concordati con gli utilizzatori (clinici e tossicologi forensi), ma non può prescindere da documentazione delle prestazioni analitiche sulla base dei criteri raccomandati dagli organismi professionali ("Clinical and Laboratory Standards Institute") e dalle società scientifiche della Medicina di Laboratorio (IFCC).

Come esprimere il risultato

Il gruppo di studio dell'IFCC raccomanda di calcolare la CDT come rapporto percentuale rispetto alla Tf totale (%CDT), per compensare falsi positivi o falsi negativi legati rispettivamente ad alti o bassi valori di Tf totale (21).

Materiali di riferimento: standard e calibratori

La standardizzazione della misurazione della CDT richiede l'uso di materiali di riferimento preparati secondo regole ben definite e soprattutto in linea con la catena della tracciabilità (così come richiesto dalla Conferenza Generale dei Pesi e delle Misure) (32). In particolare, è stata sviluppata una tecnica per la preparazione di un materiale di riferimento candidato (33), che dovrà essere oggetto di valutazione e definitiva validazione da parte degli organismi scientifici a questo deputati. L'utilizzo di standard e calibratori validati permetterà un miglior confronto tra i diversi metodi, risultati e laboratori che eseguono questa analisi.

FASE PREANALITICA

Tra le diverse condizioni preanalitiche potenzialmente in grado di alterare la CDT sono state oggetto di studio l'uso e il tipo di anticoagulanti, nonché la durata e la temperatura di conservazione del campione. L'uso di provette con caolino o di gel separatori non influenza la misura della CDT (34), mentre EDTA ed eparina possono alterare la saturazione *in vitro* degli ioni ferrici della Tf (35). Pertanto, si raccomanda di utilizzare il siero quale campione biologico di elezione.

La CDT è stabile nel siero a temperatura ambiente fino a 30 ore (36), a 4 °C per alcune settimane e a -20 °C per diversi mesi (35-37). Se il campione è lasciato a temperatura ambiente, dopo tre giorni, la CDT aumenta anche del 25% probabilmente per la presenza di batteri ad attività neuroamminidasica, che staccano i residui di acido sialico dalle catene glicaniche: a questo proposito si raccomanda l'uso di provette sterili per la raccolta del sangue. Ripetuti cicli di congelamento e scongelamento del medesimo campione non inficiano la determinazione della CDT (37, 38), così come la dieta (39), i più comuni farmaci (40) ed il disulfiram, farmaco usato nella terapia dell'alcolismo (41). Infine, pur non essendo presenti studi specifici in letteratura, sembra opportuno raccomandare il prelievo di sangue da soggetti a digiuno, così come per le più frequenti indagini di laboratorio.

FASE ANALITICA

Successivamente alla prima identificazione delle glicoforme della CDT mediante IEF seguita da immunofissazione e colorazione dei complessi CDT-anticorpo anti-Tf nel liquido cerebrospinale di alcolisti (20), sono stati proposti numerosi altri metodi di analisi tra cui quelli basati sull'impiego della CE, della HPLC, di reazioni immunochimiche (5) e, più recentemente, della spettrometria di massa (42). La separazione delle glicoforme della Tf è essenzialmente basata sulle differenze di carica dovute al diverso contenuto di residui di acido sialico, al differente grado di saturazione ferrica e alla differente struttura primaria delle varianti genetiche. Usualmente sono determinabili 6 glicoforme (da asialo-Tf a pentasialo-Tf) delle nove descritte in letteratura.

Metodi elettroforetici

Fin dalla scoperta della CDT l'IEF è stata la tecnica analitica più utilizzata. Essa prevedeva una prima fase di separazione elettroforetica a cui seguiva una seconda fase di riconoscimento immunometrico (immonofissazione, immunoblotting, ecc.) (5). Tale approccio analitico, tuttavia, presenta un ineliminabile limite di inaccuratezza nella determinazione quantitativa, basata sulla colorazione "off-line" e sulla misurazione densitometrica. Per questo motivo, tale tecnica è stata progressivamente sostituita da tecniche quantitativamente più accurate come la CE e la HPLC. Tuttavia, per la sua insuperata selettività, l'IEF è ancora considerata la tecnica di riferimento, in particolare nei casi dove sia necessario ottenere la risoluzione di glicoforme della CDT strettamente correlate (come nel caso di varianti genetiche) (5).

A differenza della separazione in IEF basata sul differente pI, i metodi in elettroforesi zonale determinano la separazione fisica delle glicoforme sulla base del rapporto carica/massa legato al diverso contenuto di acido sialico della proteina. La CE zonale è stata proposta per la prima volta per l'analisi della CDT da Tagliaro et al. nel

1998 (43). Il metodo era basato sulla separazione delle glicoforme della Tf in tampone borato a pH 8,3 con rivelazione UV a 200 nm. Al fine di ridurre l'interazione delle proteine con la parete del capillare, e quindi di migliorare la sensibilità e la selettività analitiche, il metodo è stato migliorato con l'aggiunta di diaminobutano al tampone di separazione (44). Il maggior limite della CE è rappresentato dall'uso di una lunghezza d'onda non specifica per la Tf. In commercio esistono diverse soluzioni che utilizzano sia un solo capillare che un sistema multicapillare, automatico, che permette un'alta produttività, ma che, su casi specifici, si è rivelato problematico nella determinazione dell'area dei picchi.

Metodi cromatografici

La HPLC misura l'assorbanza del complesso Fe-Tf a 460-470 nm e questo rende tale tecnica specifica e sensibile e con un basso rischio di interferenze analitiche (45). Essa permette una separazione adeguata delle glicoforme della Tf, rende possibile la quantificazione della concentrazione della disialo-Tf sia in modo assoluto che relativo, misurando l'altezza o l'area del picco, evidenzia immediatamente il pattern delle glicoforme (tracciato cromatografico), fornisce la registrazione del picco della disialo-Tf ed è facilmente interpretabile.

Il primo metodo di determinazione cromatografica della CDT è stato proposto da Jeppsson et al. nel 1993 (46). Il metodo era basato su una separazione a scambio anionico con un gradiente di eluizione salina e rivelazione a 460 nm (lunghezza d'onda selettiva per il complesso Fe-Tf). Questo metodo fu in seguito migliorato da Helander et al. (47) ed è caratterizzato da una linea di base costante e da una miglior separazione delle glicoforme. Recentemente sono stati introdotti metodi commerciali in HPLC, semplificazioni del metodo originale. Questi propongono separazioni relativamente rapide, al fine di incrementare la produttività, con qualche compromesso in termini di risoluzione delle glicoforme della Tf. La disponibilità di reagenti altamente standardizzati, peraltro, incrementa la trasferibilità dei metodi tra laboratori. Il metodo in HPLC è stato utilizzato da alcuni Autori anche nello studio delle glicoforme desialate nei disordini congeniti della glicosilazione (48, 49).

Metodi immunometrici

Il primo metodo immunometrico per la determinazione della CDT fu descritto da Stibler et al. nel 1986 (35). Questo metodo, non disponendo di anticorpi specifici per le glicoforme CDT correlate, richiedeva una preliminare estrazione del campione biologico su colonnine a scambio ionico. La fase estrattiva era seguita da una fase di determinazione immunometrica basata su un antisiero anti-Tf umana, realizzata inizialmente mediante RIA e successivamente con tecniche non radioisotopiche (EIA, immunoturbidimetria, ecc.), più facilmente automatizzabili. Il metodo risentiva di numerose interferenze, quali l'alta concentrazione di trisialo-Tf (50), le varianti genetiche, nonché la presenza di numerose patologie. Negli ultimi anni, la produzione commerciale dei kit immunocromatografici è stata sospesa.

Nel 2005 è stato introdotto in commercio il primo metodo immunometrico diretto. La base innovativa è rappresentata dall'impiego di un antisiero specifico per epitopi caratterizzati dalla mancanza di una o di tutte le ramificazioni glicaniche nella molecola della Tf. La rivelazione è su base nefelometrica. Il metodo non richiede alcuna fase di estrazione e può quindi essere completamente automatizzato. Inoltre, essendo la reazione antigene-anticorpo basata sullo stato di glicosilazione degli epitopi e non sulla sequenza primaria o sulla carica della proteina, le varianti B o D della Tf non dovrebbero determinare alcuna interferenza. Da segnalare tuttavia che secondo alcuni Autori questo metodo potrebbe sovrastimare la CDT di circa 20-25% rispetto al valore reale (51). I risultati positivi ottenuti dal metodo immunometrico vanno sempre confermati con tecniche basate su principi chimico-fisici differenti.

Metodi in spettrometria di massa

L'impiego della tecnologia MALDI-TOF ("matrix assisted laser desorption ionization - time of flight") per lo studio della Tf umana è stato proposto per chiarire la struttura delle unità saccaridiche della glicoproteina (52) e per caratterizzare le proteine eluite dalle colonnine di estrazione dei metodi immunometrici indiretti (53). L'"HPLC-electrospray mass spectrometry (ESI-MS)" è stata utilizzata per studiare le glicoforme anomale in un gruppo di malattie note come malattie congenite della glicosilazione (CDG) (54). Questa tecnica analitica non sembra ancora idonea ad essere utilizzata in studi quantitativi e, pertanto, all'impiego nella determinazione della CDT in qualità di indicatore di abuso alcolico.

L'"HPLC-inductively coupled argon plasma-mass spectrometry (ICP-MS)" è stata usata nella determinazione della CDT in quanto effettua una misurazione selettiva del Fe contenuto nella Tf (55). Tale metodo non trova al momento applicazione nella pratica clinica a causa dell'elevato costo e delle difficoltà analitiche. E' peraltro possibile che in futuro il metodo di riferimento si basi proprio sulla spettrometria di massa.

INTERPRETAZIONE DEI DATI

L'impiego dei risultati ottenuti con i metodi di determinazione della CDT a fini diagnostici implica alcune approssimazioni la cui validità deve essere oggetto di adeguata valutazione.

Innanzitutto, la classificazione dei soggetti sottoposti ad analisi in categorie (normali, abusatori, alcolisti, "social drinkers") comporta la trasformazione di dati a distribuzione continua in dati a distribuzione discontinua. Tale processo viene eseguito utilizzando griglie interpretative (cut-off, livelli decisionali), la cui scelta si basa su criteri "politici" che non dipendono dalle prestazioni analitiche, ma piuttosto dalle esigenze diagnostiche. In secondo luogo, l'affidabilità diagnostica di un indicatore non può non essere legata alla affidabilità analitica, nel senso che un metodo inaccurato non potrà mai fornire

risultati affidabili dal punto di vista diagnostico, per quanto l'indicatore in questione possa essere di per sé sensibile e specifico. Queste considerazioni di rilievo generale si applicano in maniera particolarmente pregnante all'analisi della CDT quale indicatore di eccessivo consumo alcolico. Preliminarmente alla valutazione diagnostica di questo indicatore, infatti, si dovrebbe stabilire quale sia da considerare nei diversi ambiti il consumo "eccessivo" di alcol, sia dal punto di vista quantitativo che modale. Questo, in realtà, è stato definito con un accettabile grado di confidenza solo in ambito medico/psichiatrico, dove il limite stabilito è quello al di sopra del quale, in presenza di consumo cronico, è possibile prevedere lo sviluppo di complicanze fisiche, psichiche o sociali. Secondo le linee guida americane pubblicate dal "Center for Nutrition Policy and Promotion" (56), il consumo di alcol può essere classificato come segue:

moderato:	1 bicchiere[1] al giorno per le donne, 2 bicchieri al giorno per gli uomini (<30 g di etanolo/die),
non moderato:	tra 30 e 60 g di etanolo al giorno,
abuso:	>60 g di etanolo al giorno.

Ovviamente le considerazioni che sono alla base dell'identificazione di questi limiti non si possono adottare acriticamente negli ambiti in cui l'abuso alcolico deve essere escluso (ad es. idoneità alla guida, al lavoro, al porto d'armi, all'affidamento dei figli, ecc.). Per queste ragioni, la scelta dei criteri decisionali è particolarmente delicata e richiede un'accurata scelta delle procedure statistiche alla base degli stessi.

Sensibilità e specificità diagnostiche della CDT

La grande maggioranza degli studi applicativi pubblicati sulla CDT riguarda la valutazione della sensibilità e specificità diagnostiche di questo marcatore a confronto con indicatori più tradizionali di abuso alcolico, quali la γ-glutammiltransferasi (GGT) e il MCV (57). Sillanaukee and Olsson (58) sulla base di una meta-analisi di studi clinici che comprendeva 1412 casi concludevano che nella discriminazione tra abusatori di alcol e "social drinkers" l'uso combinato di CDT e GGT era migliore rispetto all'uso singolo di ciascun marcatore (CDT, GGT, transaminasi e MCV) o degli altri marcatori in combinazione.

Per calcolare i parametri dell'efficienza diagnostica, il prerequisito richiesto è che si conosca con chiarezza ed attendibilità il consumo di alcol da parte del soggetto sottoposto all'esame, al fine di poter classificare i falsi positivi e i falsi negativi. E' condizione abbastanza comune, infatti, sottostimare il quantitativo di alcol assunto da un individuo quando si domanda al consumatore stesso il suo consumo di alcol: ciò determina fin da subito errori di inquadramento del soggetto.

I metodi utilizzati sono importanti, così come la popolazione studiata. Se si utilizzano metodi immunometrici si potrebbe incorrere in errori dovuti ad esempio alle Tf varianti, rare nella forma monozigote, ma frequenti nella forma eterozigote, o alla elevata concentrazione di trisialo-Tf. Confrontare popolazioni di grandi bevitori o di bevitori normali con astemi può portare a conclusioni differenti. Nell'interpretare i parametri di efficienza diagnostica è dimostrato che sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo possono subire variazioni dell'ordine del 12% quando si utilizzano diversi metodi per la misura della CDT (5, 59). La sensibilità diagnostica della CDT in percentuale, come indicatore di consumo cronico di alcol, è legata ad alcuni fattori come l'età, la massa corporea, il sesso e le abitudini verso l'alcol e il fumo (5, 60). In generale, quando si confrontano popolazioni costituite una da alcolisti all'inizio del trattamento e l'altra da bevitori occasionali (i cosiddetti bevitori sociali), la sensibilità varia dal 70% al 90% (61). Quando invece si paragonano bevitori occasionali con pazienti che si rivolgono al medico di Medicina Generale o a specialisti, la sensibilità varia da 40% al 60% (61). I protocolli sperimentali dovrebbero tenere conto dell'emivita della CDT (circa 2 settimane), della quantità di alcol assunto, dell'arco temporale e della modalità di assunzione, poiché è dimostrato che se l'assunzione è quantitativamente modesta, ma protratta nel tempo (almeno 3 settimane), la CDT aumenta, mentre per forti assunzioni, ma limitate nel tempo, la CDT potrebbe non variare significativamente (5).

Un tempo, quando i metodi utilizzati per la determinazione della CDT erano solo immunometrici, la letteratura riportava alcune cause di falsi positivi, come le sindromi CDG, varianti genetiche, cirrosi, carcinomi, epatiti, carenza marziale, anemia, trapianti, gravidanza, uso di estroprogestinici e galattosemia (5). Oggi l'utilizzo di analisi separative quali quelle cromatografiche, che permettono di identificare le singole glicoforme, ha dimostrato che nella sindrome CDG e nelle varianti genetiche si potrebbero avere quadri cromatografici che interferiscono nella separazione della disialo-Tf, ma comunque di aspetto differente e quindi riconoscibile rispetto all'abuso alcolico cronico.

La CDT non viene influenzata dall'utilizzo di farmaci (5), a differenza della GGT, anche perché sono diversi i meccanismi biochimici che le influenzano. Numerosi studi pubblicati hanno valutato la specificità diagnostica della CDT: essa è pari al 83,6% e al 94,2% nell'uomo con e senza danno epatico e, rispettivamente, al 96,9% e al 91,9% nella donna. Di contro, si osserva che per la GGT le specificità diagnostiche sono pari nell'uomo con e senza danno epatico al 36,1% e al 24,0% e nella donna al 36,6% e al 50,0%, rispettivamente (62, 63).

Differenze fisiologiche, di etnia e di genere nella concentrazione di CDT

In un recente lavoro, eseguito su oltre un migliaio di campioni provenienti da diverse parti del mondo, in cui è stato misurato il quadro delle glicoforme con metodo HPLC, sono stati ottenuti risultati interessanti (19). Per quel che riguarda le glicoforme della Tf, nell'uomo e nella donna si è osservata una piccola differenza significativa.

[1] *"standard drink" negli Stati Uniti è pari a 330 mL di birra, 150 mL di vino o 50 mL di superalcolici.*

Infatti, l'uomo presenta una tetrasialo-Tf più elevata della donna, ma una concentrazione più bassa di pentasialo-Tf. Invece il rapporto percentuale disialo-Tf/Tf totale è simile nel maschio e nella femmina [uomo (media±DS), 1,13%±0,20%; donna, 1,16%±0,18%] (19). In riferimento all'età, non si osservavano differenze significative (19). Quando tutti i soggetti sono divisi in base all'indice di massa corporea (BMI) (<20, tra 20-24,9, tra 25-30 e >30), quelli con BMI >30 (obesi) presentano una media significativamente più alta della disialo-Tf rispetto ad altri gruppi (19). Per quel che riguarda l'associazione tra CDT e fumo di sigaretta, lo stesso studio ha evidenziato che i livelli di disialo-Tf sono più alti nei fumatori rispetto ai non fumatori in tutte le categorie di bevitori (media non fumatori e non bevitori, 1,13%; media fumatori e non bevitori, 1,20%). Un risultato simile è stato osservato per l'asialo-Tf nei moderati e nei forti bevitori. Probabilmente quest'ultimo risultato è riferibile al fatto che nella popolazione oggetto di studio coloro che dichiaravano di bere alcol erano anche dei fumatori (19).

USO CLINICO DELLA CDT

L'uso clinico della CDT è stato provato nei trattamenti di disintossicazione da abuso alcolico dove questo indicatore, determinato longitudinalmente, si è dimostrato superiore alla GGT e al MCV nell'identificazione delle ricadute (64, 65), nella identificazione della pancreatite alcol correlata (66-68) e dell'epilessia alcol correlata (69, 70), nonché nella diagnosi di emorragia intracranica alcol correlata (71). E' inoltre ben noto come la CDT sia il più tipico indicatore delle CDG, un gruppo di gravi patologie neurologiche caratterizzate da difetti genetici della glicosilazione proteica (5). Recenti studi indicherebbero alterazioni della CDT in altre patologie della glicosilazione, come la malattia ostruttiva polmonare cronica (COPD) (72) o in patologie in cui l'attività dell'enzima neuroamminidasi è aumentata (ad es. malattie settiche) (73). Un aumento della CDT è stato ipotizzato nella anoressia nervosa (74). In realtà, successivamente mediante l'impiego di tecniche analitiche separative, è stato dimostrato che nei soggetti affetti da anoressia nervosa la concentrazione delle glicoforme CDT alcol correlate rimaneva nei limiti fisiologici, mentre si assisteva ad un aumento della trisialo-Tf (75). Alla luce di quest'ultima considerazione si raccomanda la lettura critica delle pubblicazioni, soprattutto in merito al protocollo sperimentale e alla scelta delle tecniche analitiche. Un'interessante applicazione del dosaggio della CDT viene riportata da Arndt et al. (76), che ipotizzano la fusione disialo-trisialo-Tf quale possibile e promettente marcatore di cirrosi epatica.

USO FORENSE DELLA CDT

Nell'ambito della patologia forense ha destato particolare interesse la determinazione della CDT sui fluidi cadaverici per dimostrare una pregressa storia d'abuso alcolico. Gli studi disponibili in letteratura indicano che il liquido cadaverico è idoneo alla determinazione della CDT, una volta eliminate le interferenze da emolisi (77, 78). Al medesimo scopo è stato anche riportato l'impiego dell'umor vitreo, sebbene le concentrazioni di CDT, di molto inferiori rispetto al siero, impongono l'uso di tecniche ad elevatissima sensibilità (79, 80). In realtà, l'applicazione di gran lunga più diffusa in ambito forense riguarda l'impiego della CDT quale indicatore di abuso alcolico nelle procedure di accertamento dell'idoneità al lavoro e al conseguimento/rinnovo della patente di guida.

Recenti studi hanno dimostrato come un'elevata percentuale dei soggetti incorsi in infrazioni stradali o incidenti sotto l'effetto di alcol presentino elevati valori di CDT, supportando dunque l'ipotesi che la CDT sia un valido indicatore del rischio di guida in stato di ebbrezza alcolica (81, 82).

Nell'ambito dell'uso forense della CDT occorre ribadire come l'accertamento debba essere eseguito in centri che possano garantire un'adeguata catena di custodia (inclusa la necessità di conservare il campione per eventuali nuove analisi di verifica), nonché uno schema analitico che preveda accertamento di screening e determinazione di conferma eseguiti con tecniche basate su principi chimico-fisici differenti. Appare infine necessario sottolineare come nell'ambito degli accertamenti di idoneità alla patente di guida, l'utilizzo della CDT ai fini di una corretta diagnosi di abuso alcolico cronico debba comunque essere inserito in un più ampio protocollo clinico-laboratoristico, come peraltro indicato dalle linee guida approvate dalla SIMLA e dal gruppo dei Tossicologi Forensi che alla SIMLA fanno riferimento (83).

QUANTIFICAZIONE E VALORI DI CUT-OFF PER LA CDT

Mancando uno standard di riferimento internazionale, la quantificazione della CDT con metodi differenti non fornisce un risultato numerico confrontabile in termini assoluti. La modalità di espressione che attualmente può consentire la comparabilità dei risultati fra laboratori diversi è quella in percentuale. In ragione di difficoltà analitiche, ora in gran parte superate, la CDT è generalmente espressa come percentuale delle glicoforme della Tf CDT-correlate sulla Tf totale (%CDT). Un modo alternativo è quello di rapportare la CDT alla glicoforma della Tf più rappresentata, vale a dire la tetrasialo-Tf (CDT Index). Se questa modalità di espressione fornisce, per la minore complessità di formazione del denominatore (una sola glicoforma in confronto a tutte le isoforme della Tf), valori meno soggetti a variabilità, si deve ammettere che la modalità %CDT è più largamente utilizzata e pertanto consente una maggiore trasferibilità dei risultati ottenuti dai diversi laboratori. Come anticipato più sopra, l'adozione di cut-off pone problemi sia di natura analitica che interpretativa. Dal punto di vista analitico, la dimostrazione dell'accuratezza dell'analisi deve essere considerata preliminare alla definizione dei valori di cut-off, soprattutto in fase di esami di conferma. E' quindi essenziale, ai fini di un utilizzo dei risultati in sedi alternative a

dove sono stati prodotti, che le determinazioni siano eseguite con metodi altamente accurati in grado di riflettere il valore "vero" dell'analita.

Livelli decisionali (cut-off)

I livelli decisionali sono metodo-dipendenti, oltre che popolazione-dipendenti (84). Ogni laboratorio dovrebbe definire i propri cut-off all'interno di una popolazione con normali abitudini all'alcol e non astemia, in modo tale da avere valori riferibili ad una popolazione rappresentativa dell'uso che della CDT si vuole fare. Infatti, qualsiasi metodo per il calcolo del cut-off (identificazione di gruppi di soggetti "normali", curve ROC, ecc.) non può prescindere dalla preliminare definizione dello scopo per il quale detto cut-off si deve applicare. Nel definire tali valori bisogna tenere conto anche dell'imprecisione del metodo nel proprio laboratorio. Trattandosi di risultati che possono essere utilizzati per scopi forensi, il laboratorio deve documentare la strategia diagnostica che rende il risultato affidabile, ossia la scelta di utilizzare un metodo di primo livello (ad es. immunologico) e un esame di conferma, oppure adottare un metodo metrologicamente riferibile al metodo di riferimento candidato.

I valori della CDT nel siero di popolazioni sane sono pressoché costanti. A tale riguardo la letteratura riporta che i valori di cut-off più accettati sono approssivamente 1,8-2,0% per i metodi separativi ed intorno a 2,5% per i metodi immunometrici (85). Le ragioni di queste differenze debbono probabilmente ricercarsi nelle ineliminabili interferenze determinate dalle glicoforme principali (che rappresentano oltre il 90% della Tf) sulla determinazione immunologica.

Ad oggi è ormai provato che se si utilizzano metodi adeguati, la possibilità di avere falsi negativi o falsi positivi nel caso di cirrosi biliare primaria, epatite virale cronica, carcinoma epatocellulare, ipertransferrinemia, gravidanza, uso di estrogeni, anemia sideropenica, ipoferritinemia, trapianto e uso di antiepilettici è estremamente ridotta o addirittura nulla (86). La CDT è sicuramente alterata in caso di abuso alcolico cronico, varianti genetiche della Tf e CDG (I e II).

RACCOMANDAZIONI PER LA DETERMINAZIONE DELLA CDT

Sulla base delle considerazioni fin qui presentate e supportate da una solida letteratura scientifica, si riportano di seguito le raccomandazioni utili per la determinazione della CDT.

Raccomandazioni per il laboratorio

- La determinazione della CDT dovrebbe essere effettuata solo in laboratori accreditati, secondo protocolli definiti e documentati.
- Il laboratorio dovrebbe avere adeguata strumentazione e personale competente nell'ambito della Biochimica Clinica, analisi tossicologiche incluse.
- Il laboratorio dovrebbe attuare un appropriato programma di CQI (vedi le linee guida SIBioC) e partecipare a programmi di VEQ.
- Il laboratorio dovrebbe avere idonea certificazione che comprovi l'esistenza di un sistema di gestione per la qualità.

Raccomandazioni per la fase preanalitica

- Il soggetto che si sottopone alla determinazione della CDT deve essere identificato e il campione dovrebbe essere raccolto osservando la catena di custodia, oppure utilizzando procedure che documentino la tracciabilità di tutte le fasi del processo, dall'identificazione del paziente alla refertazione.
- Il campione ideale per la determinazione della CDT è il siero. E' preferibile l'utilizzo di provetta senza additivi, anche se provette contenenti caolino o gel separatore sembrerebbero non causare interferenze con la misura della CDT.
- I campioni emolisati non devono essere analizzati. Per l'identificazione del campione emolisato si rimanda alla specifica letteratura (87, 88).
- Se la determinazione della CDT non viene eseguita nella stessa giornata del prelievo, si consiglia di congelare il campione a -20 °C, in considerazione del fatto che così facendo si impedisce la crescita di batteri con possibile attività neuroamminidasica. La CDT non risente di congelamenti e scongelamenti ripetuti.

Raccomandazioni per la fase analitica

- Nella determinazione della CDT i metodi basati su reazioni immunologiche vanno utilizzati solamente come indagine di primo livello.
- E' altamente raccomandabile l'utilizzo di metodi con caratteristiche analitiche (sensibilità e specificità) riconosciute a livello internazionale.
- E' altamente raccomandabile l'utilizzo di metodi con provata riferibilità metrologica e prestazioni analitiche validate in base a parametri riconosciuti in Biochimica Clinica.
- La concordanza di risultato tra tecniche analitiche basate su principi chimico-fisici differenti corrobora l'affidabilità del risultato analitico e quindi la difendibilità dello stesso. In ogni caso, il laboratorio dovrà documentare le prestazioni analitiche del metodo e la strategia diagnostica impiegata in rapporto allo specifico quesito clinico.
- Nel momento in cui divenissero disponibili e venissero validati materiali di riferimento umani è altamente raccomandabile il loro utilizzo.
- La tecnica IEF va considerata clinicamente utile solo per lo studio delle varianti della Tf.

Raccomandazioni per la fase post-analitica: refertazione

- Si raccomanda di esprimere il risultato in termini di %CDT, cioè come rapporto percentuale della disialorispetto alla Tf totale.
- Si raccomanda ad ogni laboratorio di definire il proprio livello decisionale (cut-off) in base al metodo utilizzato, alla sua imprecisione, alla popolazione di rife-

rimento e allo scopo per cui è eseguita la determinazione della CDT.
- In caso di varianti della Tf che interferiscono con la separazione e la quantificazione della disialo-Tf occorre estrema cautela nella refertazione
- Nel referto sarebbe opportuno accompagnare il risultato con l'indicazione del metodo e del materiale di riferimento eventualmente utilizzato, del calcolo effettuato e del cut-off determinato.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

In attesa della disponibilità di studi più approfonditi, che utilizzino materiali di riferimento umani e che potranno portare ulteriori dettagli analitico-interpretativi al miglioramento della determinazione della CDT, é raccomandato un approccio basato su evidenze scientifiche e raccomandazioni emanate da organismi professionali e società scientifiche. Solo in tal modo sarà possibile promuovere la standardizzazione, l'armonizzazione della pratica clinica, la confrontabilità dei risultati tra laboratori e, da ultimo, ma non meno importante, una migliore prestazione per il cittadino.

Le diverse tecniche analitiche oggetto di trattazione presentano vantaggi e limiti. Al momento attuale, quindi, pur essendo stato proposto un metodo candidato di riferimento da parte del gruppo di lavoro dell'IFCC, non è possibile identificare e raccomandare un'unica tecnica di determinazione della CDT. I laboratori clinici, sulla base delle specifiche situazioni operative e delle informazioni contenute in questo documento, potranno adottare le metodologie che meglio si prestano a documentare l'esattezza, la riproducibilità e l'affidabilità dei risultati forniti.

BIBLIOGRAFIA

1. http://ec.europa.eu/health-eu/doc/alcoholineu_sum_it_en.pdf.
2. http://www.ministerosalute.it/imgs/c_17_pubblicazioni_673_allegato.pdf.
3. Atti Convegno "Alcool e guida". Verona, 25 ottobre 2005.
4. de Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. The biology of transferrin. Clin Chim Acta 1990;190:1-46.
5. 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.
6. Hacker R, Arndt T, Kleine TO, et al. Effect of separation conditions on automated isoelectric focusing of carbohydrate-deficient transferrin and other human isotransferrins using the PhastSystem. Anal Biochem 1995;230:281-9.
7. Van Noort WL, de Jong G, van Eijk HG. Purification of isotransferrin by concavallin A sepharose chromatography and preparative isoelectic focusing. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1994;32:885-92.
8. van Eijk HG, Van Noort WL, de Jong G, Koster JF. Human serum sialo transferrins in diseases. Clin Chim Acta 1987;165:141-5.
9. van Eijk HG, Van Noort WL. The analysis of human serum transferrins with the PhastSystem: quantification of microheterogeneity. Electrophoresis 1992;13:354-8.
10. Mårtensson O, Härlin A, Brandt R, et al. Transferrin isoform distribution: gender and alcohol consumption. Alcohol Clin Exp Res 1997;21:1710-5.
11. Flahaut C, Michalski JC, Danel T, et al. The effects of ethanol on the glycosylation of human transferrin. Glycobiology 2003;13:191-8.
12. Kamboh MI, Ferrell RE. Human transferrin polymorphism. Hum Hered 1987;37:65-81.
13. Stibler H. Carbohydrate deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. Clin Chem 1991;37:2029-37.
14. Bean P, Peter JB. Allelic D variant of transferrin in evaluation alcohol abuse: differential diagnosis by isoelectric focusing-immunoblotting-laser densitometry Clin Chem 1994;40:2078-83.
15. Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, et al. 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;46:483-92.
16. Arndt T, Korzec A, Bar M, et al. Further arguments against including trisialo-Fe2-transferrin in carbohydrate-deficient transferrin (CDT): a study on male alcoholics and hazardous drinkers. Med Sci Monit 2002;8:411-8.
17. Sillanaukee P, Strid N, Allen JP, et al. Possible reasons why heavy drinking increases carbohydrate-deficient transferrin. Alcohol Clin Exp Res 2001;25:34-40.
18. Randell E, Diamandis EP, Goldberg DM. Changes in serum carbohydrate-deficient transferrin and gammaglutamyl transferase after moderate wine consumption in healthy males. J Clin Lab Anal 1998;12:92-7.
19. Bergström JP, Helander A. Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking on the serum transferrin glycoform pattern: implications for use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. Clin Chim Acta 2008;388:59-67.
20. Stibler H, Allgulander C, Borg S, et al. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. Acta Med Scand 1978;204:49-56.
21. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. Clin Chem Lab Med 2007;45:558-62.
22. Bianchi V, Roveta A, Arfini C. La prima indagine conoscitiva sullo stato dell'arte nel dosaggio della transferrina carboidrato-carente in Italia. Minerva Med Leg 2007;127:45-9.
23. Aertgeets B, Buntix F, Ansoms S, et al. Screening proprieties of questionnaires and laboratory tests for the detection of alcohol abuse or dependence in a general practice population. Br J Gen Pract 2001;51:206-17.
24. Lanz C, Kuhn M, Deiss V, et al. Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. Electrophoresis 2004;25:2309-18.
25. Stibler H, Borg S, Joustra M. A modified method for the assay of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum. Alcohol Alcohol Suppl 1991;1:451-4.
26. Tagliaro F, Bortolotti F. Criticism to the article: "Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method". Clin Chem Lab Med 2008;46:725-6.
27. Delanghe JR. De Buyzere ML. Carbohydrate deficient transferrin and forensic medicine. Clin Chim Acta 2009;406:1-7.
28. Legros FJ, Nuyens V, Minet E, et al. Carbohydrate-deficient transferrin isoforms measured by capillary zone electrophoresis for detection of alcohol abuse. Clin Chem 2002;48:2177–86.
29. 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;24:4272–81.
30. Ramdani B, Nuyens V, Codden T, et al. Analyte comigrating with trisialotransferrin during capillary zone electrophoresis of sera from patients with cancer. Clin Chem 2003;49:1854–64.
31. Helander A, Wielders JP, Te Stroet R, et al. Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin. Clin Chem 2005;51:1528–31.
32. http://www.bipm.org
33. Oberrauch W, Bergman AC, Helander A. HPLC and mass spectrometric characterization of a candidate reference material for the alcohol biomarker carboihydrate-deficient transferrin (CDT). Clin Chim Acta 2008;395:142-5.
34. Arndt T, Czylwik D, Hackler, et al. Carbohydrate-deficient transferrin is not affected by serum separators. Alcohol Alcohol 1998;33:447-50.
35. 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;10:535–44.
36. Mårtensson O, Brandt R. Stability of CDT in vivo and in vitro. Alcohol Alcohol 1997;32:384.
37. Köhler H, West A, Brinkmann B. Stability of carbohydrate deficient transferrin (CDT) in stored blood samples. Int J Legal Med 2000;113:121–2.
38. Appenzeller BMR, Wennig R. Altered distribution of transferrin isoforms according to serum storage conditions. Clin Chem 2005;51:2159-62.
39. Henriksen JH, Grønbæk M, Møller S, et al. Carbohydrate-deficint transferrin (CDT) in alcoholic cirrhosis: a kinetic study. J Hepat 1997;26:287-92.
40. Peter J, Unverzagt C, Engel WD,et al. Identification of carbohydrate deficient transferrin forms by MALDI –TOF mass spectrometry and lectin ELISA. Biochim Biophys Acta 1998;1380:93-101.
41. Helander A, Carlsson S. Carbohydrate-deficient transferrin and γ-glutamyl transferase levels during disulfiram therapy. Alcohol Clin Exp Res 1996;20:1202-5.
42. 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 Analyt Technol Biomed Life Sci 2006;841:96-109.
43. Tagliaro F, Crivellante F, Manetto G, et al. Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis 1998;19:3033-9.
44. Crivellente F, Fracasso G, Valentini R, et al. Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis. J. Chromatogr B 2000;739:81-93.
45. Jeppsson JO. Isolation and partial characterization of three human transferrin variants. Biochim Biophys Acta 1967;140:468-76.
46. Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. Clin Chem 1993;39:2115-20.
47. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. Clin Chem 2003;49:1881-90.
48. Helander A, Bergström J, Freeze HH. Testing for congenital disorders of glycosilation by HPLC measurement of serum transferrin glycoforms. Clin Chem 2004;50:954-8.
49. Helander A. Chromatographic measurement of transferrin glycoforms for detecting alcohol abuse and congenital disorders of glycosylation. In: Bertholf RL, Winnecker RE, eds. Chromatographic methods in clinical chemistry and toxicology. Hoboken, NJ: Wiley, 2007.
50. Alden A, Ohlson S, Pahlsson P, et al. HPLC analysis of carbohydrate deficient transferrin isoforms isolated by the Axis-Shield %CDT method. Clin Chim Acta 2005;356:143-6.
51. Helander A, Nordin G. Insufficient standardization of a direct CDT immunassay. Clin Chem 2008;56:1090-92.
52. Flahaut C, Michalski JC, Danel T, et al. The effects of ethanol on the glycosylation of human transferrin. Glycobiology 2003;13:191-8.
53. Arndt T, Kropf J. Alcohol abuse and carbohydrate-deficient transferrin analysis: are screening and confirmatory analysis required? Clin Chem 2002;48:2072-4.
54. Kleinert P, Kuster T, Durka S, et al. Mass spectrometric analysis of human transferrin in different body fluids. Clin Chem Lab Med 2003;41:1580-8.
55. Del Castillo Busto ME, Montes-Bayon M, et al. Strategies to study human serum transferrin isoforms using integrated liquid chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF detection: application to chronic alcohol abuse. Anal Chem 2005;77:5615-21.
56. Glanz J, Grant B, Monnyeiro M. Tabakoff B. WHO/ISBRA. Study on state and trait markers of alcohol use and dependence: analysis of behavioural, physiologic, and drinking variables that contribute to dependence and seeking treatment. International Society on Biomedical Research on Alcoholism. Alcohol Clin Res 2002;26:1047-81.
57. Bean P. Carbohydrate-deficient transferrin in the assessment of harmful alcohol consumption: diagnostic performance and clinical significance. Addict Biol 1999;4:151-61.
58. Sillanaukee P, Olsson U. Improved diagnostic classification of alcohol abusers by combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase. Clin Chem 2001;47:681-5.
59. Gordon MH, Sherwood R, Morgan MY. Serum carbohydrate-deficient transferrin (CDT) comparison of methodologies. Alcohol Alcohol 1997;32:330.
60. Schellenberg F, Mouray H. Carbohydrate-deficient transferrin: what's new 20 years later? Ann Biol Clin 2000;58:298-309.
61. Robitaille R. La transferrine déficiente en hydrates de carbon (CDT): une bréve revue. Ann Biol Clin 2003;40:3-10.
62. Allen J, Sillanaukee P. Carbohydrate-deficient is a useful marker for the detection of chronic alcohol abuse. Eur J Clin Invest 1999;29:899-901.
63. Arndt T, Gilg T, Soyka M. Alkoholismus-diagnose:CDT-Test hilft doch (Diagnosis of alcoholism: CDT test can does help). MMW Fortschr Med 2000;142:10-1.
64. Myrick H, Henderson S, Anton RF. Utility of a new assay for carbohydrate-deficient transferrin (Biorad %CDT TIA) to monitor abstinence during a treatment outcome study. Alcohol Clin Exp Res 2001;25:1330-4.
65. Walter H, Hertling I, Benda N, et al. Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin in drinking experiments and different patients. Alcohol 2001;25:189-94.
66. Basterra G, Casi MA, Alcorta P, et al. Is carbohydrates-deficient transferrin the best test of the alcoholic etiology in acute pancreatitis? Rev Esp Enferm Dig 2001;93:529-34.
67. Aparicio JR, Viedma JA, Aparisi L, et al. Usefulness of carbohydrate-deficient transferrin and trypsin activity in the diagnosis of acute alcoholic pancreatitis. Am J Gastroenterol 2001;96:1777-81.
68. Al-Bahrani AZ, Ammori BJ. Clinical laboratory assessment of acute pancreatitis. Clin Chim Acta 2005;362:26-48.
69. Bråthen G. Alcohol and epilepsy. Tidsskr Nor Laegeforen 2003;123:1536-8.

70. Bråthen G, Ben-Menachem E, Brodtkorb E, et al. EFNS guideline on the diagnosis and management of alcohol-related seizures: report of an EFNS task force. Eur J Neurol 2005;12:575-81.
71. Herzig R, Urbanek K, Vlachova I, et al. The role of chronic alcohol intake in patients with spontaneous intracranial hemorrhage: a carbohydrate-deficient transferrin study. Cerebrovasc Dis 2003;15:22-8.
72. Nihlen U, Montnemery P, Lindholm LH, et al. Increased serum levels of carbohydrate-deficient transferrin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. Scand J Clin Lab Invest 2001:61:341-7.
73. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Nuyens V, et al. Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis. Shock 2005;24:48-52.
74. Reif A, Fallgatter AJ, Schmidtke A. Carbohydrate-deficient transferrin parallels disease severity in anorexia nervosa. Psychiatry Res 2005;137:143-6.
75. Arndt T, Erkens M, Holltkamp K, et al. High prevalence of increased trisialotransferrin concentrations in patients with anorexia nervosa: implication for determination of carbohydrate–deficient transferrin. Clin Chim Acta 2007;379:150-3.
76. Arndt T, Van der Meijden B-B, Wielders J. Atypical serum transferrin isoform distribuition in liver cirrhosis studied by HPLC, capillary electrophoresis and transferrin genotyping. Clin Chim Acta 2008;394:42-6.
77. Simonnet C, Dumestre-Toulet V, Kintz P. Review of factors susceptible of influencing post-mortem carbohydrate-deficient transferrin. Forensic Sci Int 1999;106:7-17.
78. Rainio J, De Paoli G, Druid H, et al. Post-mortem stability and redistribution of carbohydrate-deficient transferrin (CDT). Forensic Sci Int 2008;174:161-5.
79. Berkowicz A, Wallerstedt S, Wall K, et al. Carbohydrate-deficient transferrin in vitreous humour: a marker of possible withdrawal-related death in alcoholics. Alcohol Alcohol 2001;36:231-4.
80. Berkowicz A, Wallerstedt S, Wall K, et al. Analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in vitreous humour as a forensic tool for detection of alcohol misuse. Forensic Sci Int 2003;137:119-24.
81. Appenzeller BM, Schneider S, Yegles M, et al. Drugs and chronic alcohol abuse in drivers. Forensic Sci Int 2005;155:83-90.
82. Bortolotti F, Trettene M, Gottardo R, et al, Carbohydrate-deficient transferrin (CDT): a reliable indicator of the risk of driving under the influence of alcohol when determined by capillary electrophoresis. Forensic Sci Int 2007;170:175-8.
83. Ferrara SD, Snenghi R, Boscolo M. Linee guida metodologico-accertative e criteriologico-valutative. Idoneità alla guida e sostanze psicoattive. Padova: Piccin, 2006.
84. Schellenberg F, Schwan R, Mennetrey L, et al. Dose-effect relation between daily ethanol intake in the range 0-70 grams and %CDT value: validation of a cut-off value. Alcohol Alcohol 2005;40:531-4.
85. Bianchi V, Arfini C, Helander A. Determination of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in Italy. Clin Chem Med Lab 2008;46:1759-62.
86. Helander A. The past, the present and the future of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. Alcohol Alcohol 2007;42(suppl 1):i13.
87. Lippi G, Salvagno L, Blanckaert N, et al. Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. Clin Chem Lab Med 2009;47:934-9.
88. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med 2008;46:764-72.