

Determinazione della transferrina desialata (CDT) presso il Laboratorio di Tossicologia Forense dell'Università di Brescia: casistica dell'anno 2005

Determination of Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT) performed at the Laboratory of Forensic Toxicology of the University of Brescia: results from a 2005 case study.

MARZIA BERNINI¹, DANIELA RUFFINI², FRANCESCO DE FERRARI³

¹ Ricercatore presso la Cattedra di Medicina Legale di Brescia (Direttore: Prof. Francesco De Ferrari). Inviare corrispondenza presso Istituto di Medicina Legale di Brescia, P.le Spedali Civili 1, 25123, Brescia, Tel. 030-3995480, Fax. 030-3995839.

² Assegnista di Ricerca presso la Cattedra di Medicina Legale di Brescia.

³ Direttore della Cattedra di Medicina Legale di Brescia.

Riassunto

Il lavoro ha la finalità di far conoscere nella nostra sede l'andamento del fenomeno dell'abuso alcolico, mediante la determinazione della CDT; a tal fine si è presa in considerazione la casistica di 12 mesi di osservazione (gennaio-dicembre 2005) relativa a campioni ematici pervenuti presso il Laboratorio di Tossicologia Forense degli Spedali Civili di Brescia.

Sono stati analizzati 1530 campioni di sangue (relativi a 1459 uomini ed a 71 donne), appartenenti a persone richiedenti tale indagine sia a fini puramente clinici sia su richiesta della Commissione Patenti di Brescia, ai sensi dell'articolo 186 del Nuovo Codice della Strada. Tutti i reattivi utilizzati sono a marchio ClinRep® (CDT in Serum by HPLC) prodotto da Recipe. Ogni campione è stato analizzato con metodo HPLC/UV secondo le indicazioni di Recipe® (Munich, Germany).

Il valore medio di CDT considerato sulla totalità dei campioni è risultata essere 0,95%. Il valore medio di CDT nella popolazione di sesso maschile è risultato essere 0,95%. Il valore medio di CDT nella popolazione di sesso femminile è risultato essere 0,78%.

Il 4,40% della popolazione totale presenta indice CDT superiore al cut-off, con una media del valore di CDT di 3,01%.

Lo studio della popolazione in riferimento all'abuso alcolico cronico ha mostrato una netta proporzione numerica in favore del sesso maschile. Appare molto interessante il rilievo di una bassa percentuale di soggetti che abusano di alcool etilico in modo abitudinario, facendo emergere come, nella nostra Provincia, l'innegabile uso/abuso di alcolici da parte dei guidatori sia un fenomeno ancora da precisare.

Parole chiave: Transferrina, Transferrina carboidrato carente, Alcolismo, Cromatografia Liquida ad Alte Prestazioni (HPLC), Siero, Guidatori, Tossicologia Forense.

Abstract

The purpose of the study was to determine the phenomenon of alcoholic abuse in the Province of Brescia, by assessing CDT. To this end, a 12- months record of cases (January-December 2005) was considered, regarding blood samples collected and analyzed at the Laboratory of Forensic Toxicology of Spedali Civili in Brescia.

1530 blood samples (1459 men, 71 women) were analysed. Samples were analysed for both clinical and research purposes and on request from the Brescia Driving Licence Commission, according to

art.186 of the Italian Road Code. All the reagents that have been used, are registered as Clin Rep® (CDT in serum by HPLC) produced by Recipe. The analyses were performed with HPLC/UV method, according to Recipe's indications.

The average value of CDT was 0,95% in the total sample. The average value of CDT was 0,95% for males and 0,78% in females. 4,40% of the total sample showed a CDT value higher than the cut-off (2%), with an average value of 3,01%.

The study of the sample population with regard to chronic alcohol abuse has shown a clear prevalence of males. It is interesting to note that the research identified a very low percentage of chronic alcohol abusers. This can be due to the fact that in our Province the use/abuse of alcohol needs to be further surveyed and examined.

Key words: Transferrin, Carbohydrate-deficient Transferrin, Alcoholism, High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), Analysis, Driving license, Forensic Toxicology.

La transferrina desialata (CDT), secondo la letteratura prevalente (1) e la comune esperienza clinica e diagnostica è stata internazionalmente accettata come marcatore cronico di ripetuta od eccessiva assunzione di alcool. In una recente revisione casistica (2), la transferrina desialata è definita come il più sensibile (80% negli alcoolisti e il 60% nei forti bevitori) e specifico marcatore di abuso cronico di alcool ad oggi disponibile.

CDT è il nome collettivo di un gruppo di isoforme minori di transferrina sierica; proposta come marcatore di abuso alcoolico dalla fine degli anni '70 (3,4), continua ad essere largamente studiata dal punto di vista chimico, biochimico, analitico e clinico (5-8).

Come è noto, la transferrina è la principale proteina sierica che trasporta ferro; essa è composta da 679 amminoacidi con due potenziali siti di glicosilazione a livello 413 ed a livello 611, usualmente leganti catene di carboidrati bi- o tri- antennarie, ciascuna delle quali terminante con un residuo di acido sialico. In conseguenza dell'abuso alcoolico è stata dimostrata una anormale crescita delle isoforme asialo-, monosialo- e disialo-transferrina (9) (chiamate collettivamente CDT) senza un sostanziale cambiamento nell'isoforma maggiormente rappresentata, ovvero la tetrasialo-transferrina. Tale incremento sembra essere correlato all'ini-

bizione delle glicosil-transferasi da parte dell'acetaldeide, primo metabolita dell'etanolo (10).

Diversi studi hanno indicato che consumi superiori a 50-80 g di etanolo al giorno per almeno una settimana inducono un innalzamento dei valori di CDT nella maggioranza dei pazienti esaminati (11). Durante l'astinenza alcoolica la CDT mostra un'emivita plasmatica di circa 15 giorni (12,13).

Esistono differenti varianti genetiche di transferrina dovute alla sostituzione di diversi amminoacidi nella catena polipeptidica (14). Sono conosciute circa una quarantina di sostituzioni differenti, di cui almeno quattro con prevalenza maggiore dell'1%; in particolare, la variante "C" è la più frequente (oltre il 95%) nella popolazione caucasica.

Le varianti "B" e "D" possono interferire con la determinazione della CDT. Infatti il pl di una isoforma "non-CDT" della Transferrina "D" è simile alla forma "CDT" della Transferrina "C". Per tale motivo può accadere che persone che assumono quantità normali di alcool possano risultare falsamente positive in quanto eterozigoti per la Transferrina "CD". Tuttavia l'interferenza della variante D nel determinare sovrastime di CDT dipende non solo dal sottotipo personale, ma anche dal metodo di determinazione: infatti i metodi che dosano la CDT incorporando nel complesso la Trisialo CDT

sono più facilmente soggetti all'interferenza della Transferrina "D" (15). La variante "B" invece ha un pl minore e pertanto coeluisce con le forme normali ed il bevitore cronico di alcool recante nel corredo genetico la Transferrina "B" può risultare falsamente negativo.

Molti studi hanno confermato in trials clinici la validità della CDT come marcatore di abuso alcoolico, sia in termini di sensibilità che in termini di specificità, comparando questo indice con i convenzionali marcatori utilizzati per effettuare tale diagnosi da un punto di vista clinico (16-19).

Riguardo alla "specificità" della CDT come marcatore di abuso alcoolico cronico (20), le principali cause di falsi positivi sono le sindromi C.D.G. (Disordini congeniti della glicosilazione) (21), le varianti genetiche Transferrina "D" e alcune patologie epatiche (22), mentre in presenza di carenze marziali (23,24), qualora si utilizzi il rapporto tra CDT e Transferrina, la potenziale interferenza viene annullata. Risulta comunque evidente da questi studi che gli errori di valutazione indotti dall'uso della CDT sono di gran lunga inferiori come numero di quelli indotti dal dosaggio della GGT, parametro di funzionalità epatica dosato comunemente nei soggetti etilisti.

Per quel che riguarda la "sensibilità" (25), l'emivita della CDT è circa 14 giorni. Studi effettuati sulla base di assunzione di alcool per tre settimane mostra che consumi cronici anche di piccole quantità modificano la concentrazione di CDT, mentre l'assunzione di forti quantità in tempi più ristretti non modifica la concentrazione di CDT.

Considerando quindi l'opportunità di conoscere nella nostra sede locale l'andamento del fenomeno dell'abuso alcoolico, si è presa in considerazione la casistica realizzata in 12 mesi di osservazione relativa a campioni ematici pervenuti presso il Laboratorio di Tossicologia Forense degli Spedali Civili di Brescia.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati 1530 campioni di sangue, appartenenti a persone che si sottoponevano a tale indagine sia a fini puramente clinici sia dietro richiesta della Commissione Patenti di Brescia, ai fini del rilascio della patente di guida dopo una sospensione prevista ai sensi dell'articolo 186 del Nuovo Codice della Strada.

Il dosaggio della CDT è stato eseguito su siero umano, ottenuto per centrifugazione effettuata a 2500 giri/minuto per 20 minuti da una provetta senza anticoagulante, contenente almeno 6 ml di sangue intero. In questo modo è stato recuperato un quantitativo pari a circa 2 ml di siero sovranatante per ogni campione, che è stato conservato a -20° C fino all'analisi (26).

Tutti i reattivi utilizzati per l'effettuazione dell'analisi dei campioni sono a marchio ClinRep® (CDT in Serum by HPLC) prodotto da Recipe Chemical+Instruments GmbH, Munich (D), commercializzato in Italia da B.S.N. Srl di Castelleone - CR.

Ad un'aliquota di 150 ml di siero sono stati aggiunti 30 ml reagente S (stabilizzante); dopo vortex per qualche secondo ed incubazione a temperatura ambiente per 5 minuti, è stato aggiunto un quantitativo di 10 ml di una soluzione contenente in proporzione diversa una miscela di reagente P1 e P2. Ogni campione è stato quindi posto in incubazione alla temperatura di 5°C per un tempo non inferiore ad un'ora.

Dopo centrifugazione per 5 minuti a 10000 giri/min, sono stati prelevati 100 ml di sovranatante diluiti 1:11 con acqua Millipore. Ogni campione è stato analizzato con metodo HPLC/UV secondo le indicazioni di Recipe® in un sistema fornito da Thermo Electron S.p.a.- Rodano (Milano, Italia) costituito da: degasatore, pompa quaternaria P4000, rivelatore UV/VIS Spectraseries UV150, campionatore automatico Finnigan SpectraSystem e programma di elaborazione ChromCard; l'analisi è stata conseguita in

gradiente con lettura a $\lambda = 460$ nm, fase mobile $\phi = 1$ ml/min.

Il calcolo dell'indice CDT era effettuato dividendo l'area del picco corrispondente alla disialo-transferrina per il totale delle aree dei picchi di tutte le isoforme ottenute mediante separazione cromatografica, esprimendo il rapporto sotto forma di percentuale [(Area disialo/Area totale) x 100].

Risultati

La casistica si riferisce a 1530 persone di cui 1459 uomini (95,3% del campione) e 71 donne (4,7% del campione). Emerge come la popolazione di sesso maschile rappresenti la quasi totalità del campione.

La media dell'età calcolata sul totale della popolazione è risultata essere 36,35 anni, con moda di 23 e mediana di 34 anni.

Il valore medio di CDT considerato sulla totalità dei campioni in esame è risultata essere 0,95%, con moda 0,65 e mediana 0,84%. La deviazione standard è stata calcolata pari a 0,62. Il valore rappresentativo della popolazione, ottenuto aggiungendo al valore medio il doppio della deviazione standard, risulta essere 2,19%. La varianza sul totale del campione è pari a 0,38, con coefficiente di variazione (CV) di 65,2.

In 10 casi, tutti appartenenti al sesso maschile, non è stato possibile eseguire il dosaggio della transferrina desialata, a causa della presenza di varianti genetiche della transferrina; per questi campioni non è stata fornita una risposta in termini quantitativi, secondo quanto consigliato dalla più recente letteratura in merito (27).

Va precisato quindi come i dati utilizzati per l'analisi statistica di questo campione si riferiscano non alla totalità del campione bensì a 1520 individui, avendo provveduto ad eliminare i 10 campioni che all'analisi cromatografica si presentavano con isoforme varianti.

Routinariamente, il limite inferiore di po-

sitività da noi usato come discriminante tra coloro che abusano di alcool e coloro che ne fanno un uso moderato è stato fissato a 2%, ottenuto da una precedente popolazione bresciana di riferimento di 78 campioni di donatori volontari sani, suddivisi in 51 maschi e 27 femmine, con valore medio di Disialo-Tf/Tetrasialo-Tf = 1,03 con S.D. = 0,61 e C.V. = 59%, ed in conformità con il metodo analitico adottato, che indica nel valore <1,75% la popolazione normale, >2,50% il dato patologico e l'intervallo intermedio come positivo potenziale.

In riferimento quindi al cut-off analitico precedentemente definito, i soggetti con valore di CDT superiore a 2% sono risultati essere 67 (tutti di sesso maschile), rappresentanti il 4,40% della popolazione totale, come rappresentato in Figura 2. Il valore medio di CDT di questa popolazione con CDT superiore al cut-off analitico è risultato essere 3,01%, con moda coincidente con la mediana (2,58%) e varianza pari a 1,18 (C.V. pari a 39,2%). L'età media di tali soggetti è risultata essere 40,7 anni (19-69 anni) con moda di 35 anni e mediana di 39 anni.

I campioni risultati con CDT superiore al cut-off sono stati poi stratificati suddividendo la sottopopolazione in fasce d'età. Si è provveduto ad effettuare 5 suddivisioni, in ognuna delle quali è stato calcolato il valore medio dell'indice CDT degli appartenenti. Dalla Figura 3, si nota come i valori medi più bassi di CDT si collochino nella fascia d'età compresa tra i 19 ed i 29 anni (2,47%) e che di seguito, col procedere dell'età, si osservi un incremento apprezzabile nel valore medio di CDT fino ad arrivare agli ultimi due raggruppamenti, dove si notano i valori maggiori, rispettivamente 3,62% nella fascia d'età tra 52 e 62 anni e 3,60% nella fascia d'età tra 63 e 73 anni.

Infine, i dati complessivi della casistica sono stati analizzati in relazione alle differenze riscontrabili sulla base del sesso (Figura 1), calcolando per ognuna di esse il valore medio dell'indice CDT. Il valore me-

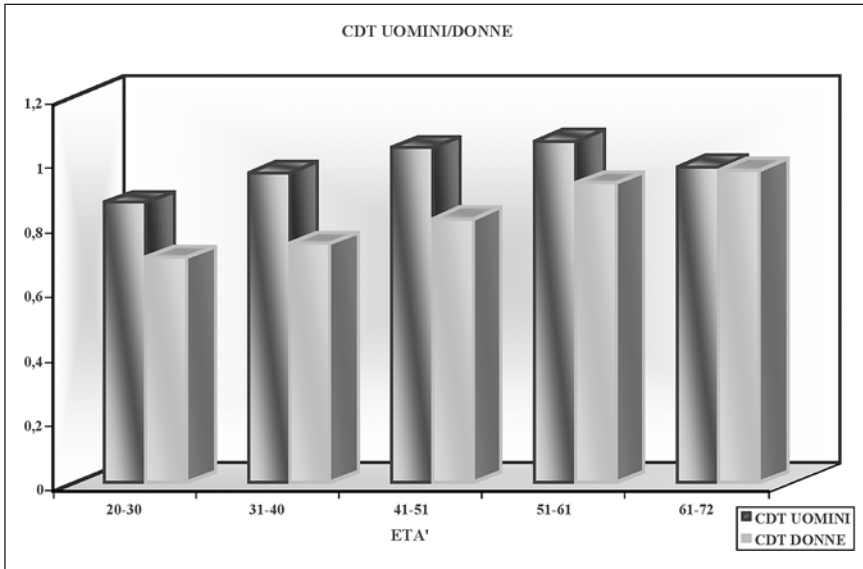


Figura 1. Andamento dei valori di CDT in relazione al sesso.

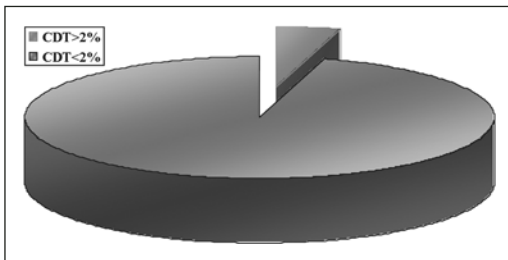


Figura 2: Rappresentazione grafica dei campioni risultati sopra il cut-off del 2%

dio di CDT nella popolazione di sesso maschile è risultato essere 0,95% con 0,65 e mediana 0,84%, varianza 0,40 e C.V. 97. Suddividendo questa popolazione in 5 fasce d'età si nota come, prendendo come riferimento quelle centrali, vi sia un andamento quasi speculare tra la porzione destra e quella sinistra del grafico relativamente al sesso maschile: questo è dovuto al fatto che nelle fasce d'età più basse (18-28 e 29-39 anni) e più alte (62-72 e 73-83 an-

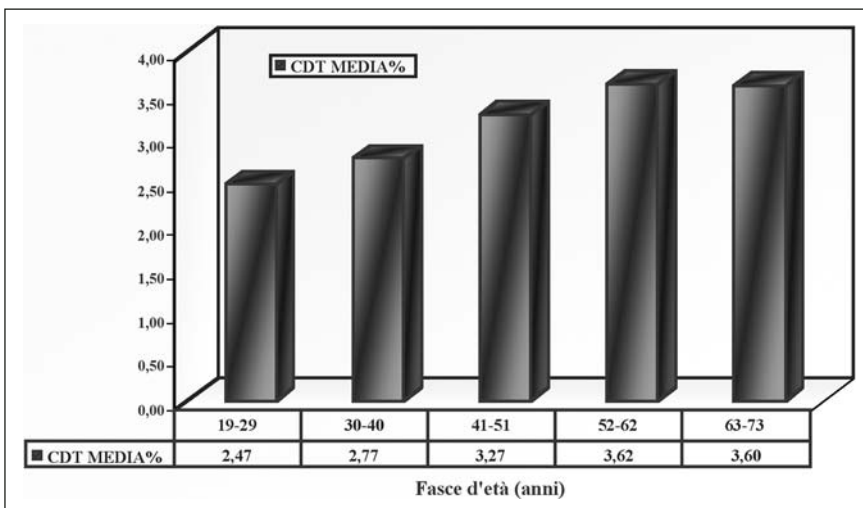


Figura 3. Distribuzione dell'indice CDT superiore al cut-off in relazione all'età

ni) si collocano i valori inferiori dell'indice di CDT (rispettivamente 0,87%, 0,96%, 0,98%, 0,86%), mentre in quelle centrali (40-50 e 51-61 anni) si riscontrano i valori maggiori (rispettivamente 1,04% ed 1,06%). La popolazione di sesso femminile è costituita da 71 persone, ovvero il 4,6% del totale del campione. Nessuno degli appartenenti a questa popolazione ha presentato valori di CDT superiori al cut-off analitico. Il valore medio di CDT nella popolazione di sesso femminile è risultato essere 0,78% con moda 0,37% e mediana 0,80%. Dal grafico (Figura 1) si nota come al crescere dell'età per la popolazione femminile si associ un aumento nell'indice CDT, che di fatto passa da un valore minimo di 0,70%, nella fascia d'età compresa tra 20 e 30 anni ad un valore di 0,97% nella fascia d'età tra i 62 ed i 72 anni.

Discussione

Dall'analisi dei dati relativi alla totalità dei campioni analizzati presso il Laboratorio di Tossicologia Forense dell'Istituto di Medicina Legale di Brescia emerge come sia risultata variegata da un punto di vista anagrafico la popolazione afferente. Infatti l'età del campione spazia tra i 18 e gli 83 anni, con età media che si attesta intorno ai 36 anni.

Vi è una netta prevalenza degli individui di sesso maschile che rappresentano il 95,3% del campione, che hanno un'età media di 36,2 anni, confrontata con la popolazione di sesso femminile che è risultata avere un'età media di 37,8 anni.

Un altro aspetto che emerge in maniera netta è la scarsità di soggetti che hanno presentato all'indagine per la determinazione della CDT valori superiori al cut-off fissato a 2%. Questi soggetti rappresentano il 4,40% della popolazione totale, con una media del valore di CDT di 3,01%.

Questo dato è indicativo di una popola-

zione che, seppur selezionata in quanto prevalentemente inviata per effettuare controlli conseguenti al ritiro della patente di guida in violazione dell'articolo 186 del Nuovo Codice della Strada, non presenta le caratteristiche del "forte" abusatore di alcool. Infatti la media del valore di CDT non si allontana di molto dal cut-off fissato (2%), che discrimina il bevitore moderato dall'abusatore cronico di alcool.

Da questi dati emerge come i soggetti esaminati, pur facendo un utilizzo cronico non moderato di alcool, non abbiano le caratteristiche, quantomeno analitiche, del "forte abusatore" (valore medio di CDT: uomini 0,95%, donne 0,78%). Non disponendo di ulteriori notizie cliniche relative a tali soggetti, qualunque considerazione in merito alle abitudini dovrà essere considerata parziale e meramente analitica e, come tale, incompleta.

Inoltre, dall'analisi effettuata sulla base della stratificazione per età dei soli soggetti con indice di CDT superiore al cut-off, risulta come al progredire dell'età si associ un aumento dell'indice stesso. Infatti si osserva un netto incremento di tale valore che passa da 2,47% nella fascia d'età compresa tra i 19 ed i 29 anni ad un 3,62% nella fascia d'età tra i 52 ed i 62 anni. Questo dato, probabilmente, depone per un'abitudine reiterata negli anni all'eccessivo consumo di alcool.

Il valore medio di CDT calcolato con riferimento alla popolazione di sesso femminile si assesta a 0,78%, confrontato con quella della popolazione di sesso maschile che è pari a 0,95%. Il valore medio di CDT maggiore nella popolazione di sesso maschile rispetto a quella di sesso femminile può essere dovuto all'esiguità di quest'ultimo campione. Infatti, essendoci un eccesso numerico di soggetti maschi, le due popolazioni mancano dell'omogeneità necessaria per attuare un confronto.

L'andamento dei valori di CDT studiato sulla base della distribuzione in fasce d'età

confrontata nei due sessi, presenta un andamento diversificato. Infatti, nel sesso maschile, si nota un incremento di tale valore nel passaggio tra le fasce d'età più basse e quelle intermedie, per poi passare ad un successivo decremento alla progressione tra queste ultime e le fasce d'età più avanzate.

Si osserva nel sesso femminile, nell'andamento dei valori di CDT in rapporto all'età, una crescita lenta, ma costante di tale indice al progredire dell'età. Di fatto si osservano i valori più bassi nella fascia d'età tra i 20 ed i 30 anni (0,70%) ed i valori maggiori (0,97%) nella fascia d'età compresa tra i 62 ed i 72 anni. Come per i maschi, questo dato depone per una reiterata abitudine al consumo di alcoolici perpetrata negli anni, tenendo sempre presente il fatto che si tratta di valori nettamente sotto il cut-off analitico.

Infine, i soggetti con indice CDT superiore al cut-off, seppure in numero esiguo, sono esclusivamente maschi. Questo dato con buona probabilità è legato alla notevole sproporzione in eccesso rilevata a carico della popolazione di sesso maschile che si presenta, in quanto più rappresentativa, anche più variegata: la caratteristica di indice CDT maggiore del 2% non è quindi attribuibile direttamente al genere maschile, ma necessita di una diversa numerosità per poter essere correlata all'uno o all'altro genere.

In definitiva lo studio diretto della popolazione sottoposta a controllo riguardo l'abuso alcoolico cronico ha mostrato una netta sproporzione numerica tra i due sessi mantenendo invece una buona correlazione riguardo all'età. Risulta assai più interessante il rilievo di una bassa percentuale di soggetti che eccedono in modo abitudinario nell'assunzione di alcool etilico (ovvero coloro i quali presentano un indice CDT superiore al 2%), facendo emergere come, nella nostra Provincia, l'innegabile uso/abuso di alcoolici da parte dei guidatori sia un fenomeno non ancora del tutto "inquadrato".

Bibliografia

- 1) Helander A., Jones A.W. Biochemical tests for acute and chronic ingestion. *Drug Abuse Handbook*; CRC Press; Boca Raton, FL 1998, pg. 374;
- 2) Rosalki S.B. Biochemical identification of alcohol abuse. *Int J Clin Pract* 1999, 53: 138.
- 3) Stibler H., Allgulander C., Borg S., Kjellin K.G. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Med Scand* 1978, 204: 49.
- 4) Stibler H., Borg S., Allgulander C. Clinical significance of abnormal heterogeneity of transferrin in relation to alcohol consumption. *Acta Med Scand* 1979, 206: 257.
- 5) Allen J.P., Litten R.Z., Anton R.F., Cross G.M. Carbohydrate-deficient transferrin as a measure of immoderate drinking: remaining issues. *Alcohol Alcohol Exp Res*, 1994, 18: 799.
- 6) Landberg E., Pahlsson P., Lundblad A., Arne-
torp A., J.O. Jeppson. Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 210: 267.
- 7) Sillanaukee P. Laboratory markers of alcohol abuse. *Alcohol Alcohol*, 1996, 31: 613.
- 8) Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem*, 1991, 37: 2029.
- 9) Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991, 37: 2029.
- 10) Sillanaukee P. CDT by anion-exchange chromatography followed by RIA as a Marker of heavy drinking among men. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1993, 17:230-3.
- 11) Yersin B., Nicolet J.F., Decrey H, Burnier M. Screening for excessive alcohol drinking. *Arch Intern Med* 1995, 155:1907-1911,.
- 12) Stibler H. Carbohydrate deficient transferrin: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin. Chem*, 1993, 37:2029-2037.
- 13) Stibler H., Jaeken J. Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systemic hereditary syndrome. *Arch. Dis. Child* 1990, 65:107-111.

- 14) Wuyts B., Delanghe J., Kasvosve I. Carbohydrate-Deficient Transferrin and Alcohol Ingestion in Subjects with Transferrin CD-Variants. *Clin Chem Lab Med*, 39:10: 937-943.
- 15) Pekka S., Nuria S., Possible reasons why heavy drinking increases CDT, *Clin. And Expe. Research*, 2001, vol. 25 n°1 Jan.
- 16) Reynaud M., Hourcade F., Planche F., Alboisson E., Meunier M.N., Planche R. Usefulness of carbohydrate-deficient transferrin in alcoholic patients with normal gamma-glutamyl transpeptidase. *Alcohol Clin Exp Res* 1998, 22:615.
- 17) Lesch O.M., Walter H., Antal J., Kanitz R.D., Kovacz A., Leitner A., Marx B., Neumeister A., Saletu M., Semler B., Stumpf I., Mader R. Alcohol dependence: is carbohydrate-deficient transferrin a marker for alcohol intake? *Alcohol Alcohol* 1996, 31:257.
- 18) Lesch O.M., Walter H., Freitag H., Heggli-Dag E., Leitner A., Mader R., Neumeister A., Passweg V., Push H., Semler B., Sundrehagen E., Kasper S. Carbohydrate-deficient transferrin as a screening marker for drinking in a general hospital population. *Alcohol Alcohol* 1996, 31: 249.
- 19) Meregalli M., Giacobini V., Lino S., Marchetti L., DeFeo T., Cappellini M.D., Fiorelli G. Carbohydrate-deficient transferrin in alcohol and nonalcohol abusers with liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1995, 19: 1525.
- 20) Stibler H., Borg S., Jousra M. A modified method for the assay of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum. *Alcohol Alcohol Suppl* 1991, 1:451-454.
- 21) Stibler H., Jaeken J. Carbohydrate deficient serum transferrin in a new systemic hereditary syndrome. *Arch Dis Child* 1990, 65:107-111.
- 22) Meregalli M., Giacomini V., Lino S., Marchetti L., De Feo T.M., Cappellini M.D., Fiorelli G. Carbohydrate-deficient transferrin in alcohol and nonalcohol abusers with liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 1995, 19:1525-1527.
- 23) Kasvosva I., Delanghe J.R., Gomo Z., Gangaidzo I., Khumalo H. Transferrin polymorphism influences iron status in blacks. *Clin chem*. 2000, 46:1535-1539.
- 24) De Feo T.M., Fargion S., Duca L., Mattioli M., Cappellini M.D., Smpietro M., Cesana B.M., Fiorelli G. Carbohydrate-Deficient transferrin, a sensitive marker of chronic alcohol abuse, is highly influenced by body iron. *Hepatology* 1999, vol. 29, n 3.
- 25) Mundle G., Ackermann K., Munkes J., Steinle D., Mann K. Influence of age, alcohol consumption and abstinence on the sensitivity of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase and mean corpuscular volume. *Alcohol Alcohol* 1999, 34:760-766.
- 26) Di Magno E., Corle D., O'Brien J.F., Masnyk I.J., Go V.L., Aamodt R. Effect of long-term freezer storage, thawing and refreezing on selected constituent of serum. *Mayo Clin Proc* 1989, 64:1226-1234.
- 27) Wuyts B., Delanghe J.R., Kasvosve I., Gordeuk V., Gangaidzo I., Gomo Z. Carbohydrate-deficient transferrin and alcohol ingestion in subjects with transferrin CD-Variants. *Clin Chem Lab Med* 2001, 39 (10):937-943.