

Overzichten

Koolhydraatdeficiënt transferrine: betekenis als marker voor alcoholmisbruik

H.J.H. KREUTZER¹ en J. van PELT²

Er is een grote behoefte aan testen voor het opsporen van chronisch alcoholmisbruik. In studies van de laatste jaren is een relatie aangetoond tussen een frequent verhoogde ethanolspiegel en een significant verminderde glycosylering van transferrine. In het (ziekenhuis-)laboratorium zijn er verschillende technieken om het koolhydraatdeficiënt transferrine (KDT) te scheiden, namelijk iso-elektrische focussing en ionenwisselaar chromatografie. Deze laatste techniek wordt steeds meer gebruikt omdat de bepaling van het gescheiden KDT op de routine-analyseapparatuur kan worden uitgevoerd. Er zijn aanwijzingen dat de bepaling van KDT als percentage van het totaal transferrine betere resultaten oplevert als het absolute gehalte aan KDT. De specificiteit van deze testen, in combinatie met die voor gammaglutamyltransferase (GGT) is zeer hoog. De sensitiviteit is acceptabel, als de test wordt gebruikt bij ernstige verdenking op alcoholmisbruik. Zonder goede patiëntenselectie kan men tot 50% fout-negatieve resultaten vinden.

Alcoholmisbruik* is een veel voorkomend probleem. Er is sprake van chronisch overmatig alcoholgebruik bij het nuttigen gedurende langere tijd van meer dan 5 alcoholhoudende consumpties (60 g of 75 ml ethanol) per dag. Afhankelijk van de toegepaste definitie hebben onderzoeken aangetoond dat ongeveer 5% van de bevolking in verschillende landen zich schuldig maakt aan alcoholmisbruik (1,2,3). Andere studies spreken van problematisch alcoholgebruik bij 10% van de Nederlandse patiënten, die een huisarts bezoeken (4).

Het is dan ook niet verwonderlijk dat een aanzienlijk deel van het gezondheidszorgbudget opgaat aan kosten, veroorzaakt door alcoholmisbruik. Een schatting van dit bedrag voor Nederland komt uit op 5 miljard gulden (1,4), waarvan 2 miljard gulden als materiële schade in het verkeer (5). Daarnaast veroorzaakt alcoholmisbruik veel "sociale schade". Het belang van de herkenning van de door alcohol veroorzaakte gezondheidsproblemen door huisarts of specialist is dan ook evident. Wanneer de patiënt zelf ontkent, blijkt het

moelijk te zijn om alcoholmisbruik aan te tonen. Tot nu toe werd hiervoor vooral de bepaling van GGT en eerder het MCV gebruikt. Eind zeventiger jaren werd door de Zweedse onderzoeksgroep rond Stibler ontdekt, dat in het bloed van chronische alcoholici een afwijkend soort transferrine voorkomt (6). Ook in Nederland is op dit gebied pionierswerk verricht (7,8). Voortbordurend op deze gegevens zijn een aantal testen ontwikkeld voor het bepalen van het zogenaamde koolhydraatdeficiënt transferrine. Alvorens op de diagnostische mogelijkheden van deze testen in te gaan, volgt eerst enige biochemische achtergrondinformatie.

Isovormen van transferrine

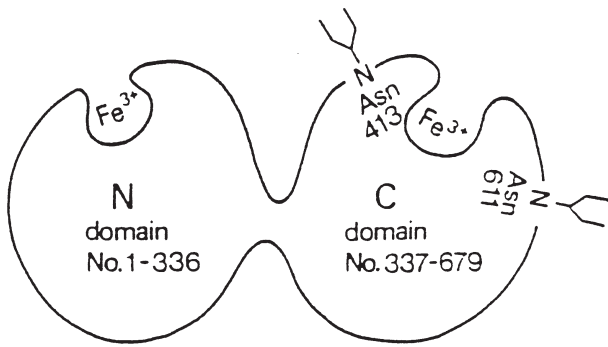
Het eiwit transferrine heeft een belangrijke functie bij het vervoer van driewaardig ijzer uit het voedsel via het plasma naar het beenmerg, waar het ijzer wordt ingebouwd in de heemgroep van hemoglobine in de erythrocyten. Het glycoproteïne transferrine bevat twee koolhydraatketens, die zijn opgebouwd uit acetylglucosamine, mannose, galactose en siaalzuur. Aan het uiteinde van deze ketens zit steeds een negatief geladen siaalzuurgroep (zie figuur 1). Doordat beide koolhydraatketens vertakt kunnen zijn, treffen we in plasma verschillende isovormen van transferrine aan, die verschillen in de mate van vertakking van de koolhydraatketens en in het aantal siaalzuurgroepen en dus ook in het aantal negatieve ladingen. De meest voorkomende isovorm bevat 4 siaalzuurgroepen, maar ook vormen met 3, 5 en 6 siaalzuurgroepen worden in serum gevonden. Transferrinemoleculen met minder dan 3 siaalzuurgroepen zijn nauwelijks aanwezig bij gezonde personen maar wel bij personen met alcoholmisbruik. Het is gebleken, dat bij alcoholmisbruik bij een klein gedeelte van de transferrinemoleculen een of beide koolhydraatketens geheel ontbreken (9). Vandaar dat de term koolhydraatdeficiënt transferrine gekozen is als verzamelnaam voor deze isovormen. In de Engelse literatuur wordt de afkorting CDT (carbohydrate-deficient transferrin) gebruikt. Bij de glycosylering van eiwitten zijn vele enzymen betrokken. Bij alcoholmisbruik wordt dit systeem waarschijnlijk

Bosch MediCentrum¹, Den Bosch; Ziekenhuizen Noord-Limburg², Venlo/Venray

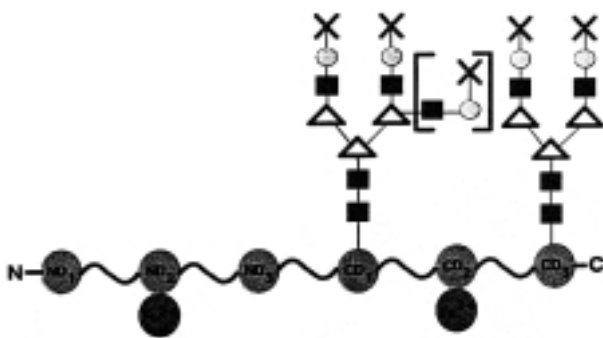
Correspondentie: Dr. H.J.H. Kreutzer, Vinkelsestraat 163, 5382 JA Vinkel.

Ingekomen: 06.01.99

* In dit artikel worden de begrippen alcoholmisbruik, chronisch overmatig alcoholgebruik en problematisch alcoholgebruik als synoniem gehanteerd. In de psychiatrische wereld wordt echter een onderscheid gemaakt tussen de begrippen alcoholafhankelijkheid en alcoholverslaving zoals omschreven in de DSM-IV.



Figuur 1a. Schema van een transferrinemolecuul met daarin aangegeven de bindingsplaatsen van ijzer (Fe^{3+}) en de plaatsen waar de koolhydraatketens met het eiwit verbonden zijn (Asn 413 en Asn 611).

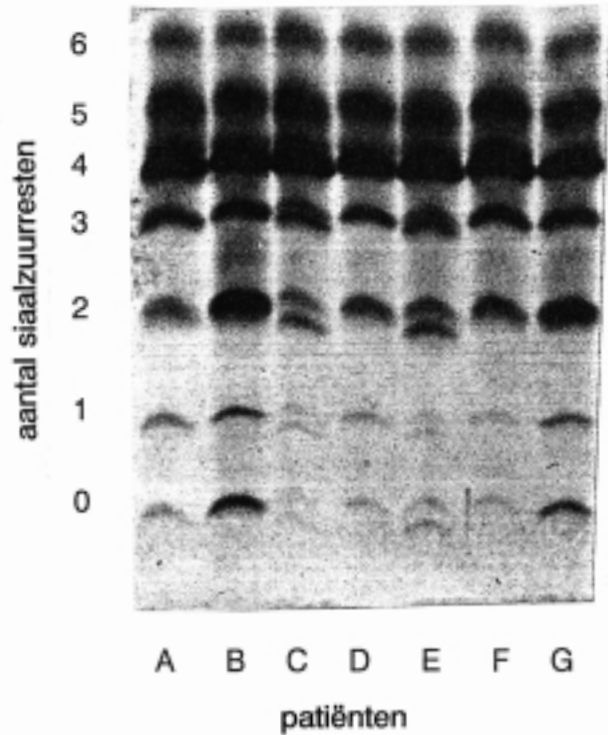


Figuur 1b. Schema met meer details van de koolhydraatketens. De eiwitketen is door de donkere bolletjes onderaan weergegeven, het ijzer door de 2 zwarte bolletjes. De koolhydraatketens zijn opgebouwd uit N-acetyl-glucosamine (zwarte vierkantjes), mannose (driehoeken), galactose (kleine lichte bolletje) en sialzuur (kruis) met een negatieve lading. Getekend is pentasialo-transferrine.

door het zich ophopende acetaldehyde geremd. Tevens neemt de activiteit van neuraminidase toe, dat sialzuur van de ketens afsplitst. Beide effecten zorgen voor koolhydraatdeficiënte glycoproteïnen bij chronisch overmatig alcoholgebruik (10).

Meettechnieken voor KDT

Alle methoden voor de bepaling van KDT maken voor de scheiding gebruik van de ladingsverschillen, die er zijn tussen de verschillende isovormen van transferrine. Dit kan het beste gedemonstreerd worden met iso-elektrische focussing (IEF). Met deze scheidingsmethode, gevolgd door een immunochemische kleuring of een immunoblotting van transferrine, kan men alle isovormen kwantitatief bepalen (11). Een voorbeeld van de scheiding van de transferrine-isovormen is afgebeeld in figuur 2. Iso-elektrische focussing is een bewerkelijke methode, die niet geschikt is voor routinematige uitvoering. Daarom heeft men gezocht naar een meer eenvoudige testmethode. De eerste commerciële test, die geschikt is voor niet gespecialiseerde laboratoria is de zogenoemde CDTECT™ van Pharmacia en Upjohn. Hierbij wordt in een kolom met een anionwisselaar transferrine met twee- of minder sialzuurgroepen geschei-



Figuur 2. Patroon na iso-elektrische focussing (pH 5-6) van transferrine. De positieve pool zit aan de bovenkant. Van boven naar beneden neemt het aantal sialzuurgroepen af en het iso-elektrisch punt toe. Tetrasialotransferrine is steeds de overheersende variant. Bij personen zonder alcoholmisbruik (A,C,D,F) zijn slechts sporen van asialo- en monosialotransferrine te zien. Ook de hoeveelheden di- en trisialotransferrine zijn duidelijk minder. Bij personen met alcoholmisbruik (B,G) ziet men vooral een toename van a-sialo- en disialotransferrine. Bij patiënt E ziet men een lichte verhoging van de koolhydraat-deficiënte transferrines. De dubbele banden bij de patiënten C en E worden veroorzaakt door een mutatie van een aminozuur in de eiwitketen van transferrine, die geen klinische betekenis heeft.

den van het overige transferrine. Met behulp van een RIA of een EIA wordt het in het eluaat aanwezige transferrine gemeten en uitgedrukt in U/l (12) (1 U/l komt overeen met ca 1,2 mg/l). Intussen is ook een "tweede generatie test" voor KDT beschikbaar, namelijk de %CDT of %CDTriTIA-test (13). Er zijn naast veel overeenkomsten twee belangrijke verschillen met de oorspronkelijke CDTECT-bepaling:

- De scheiding met microkolommen wordt zo uitgevoerd, dat ook een deel (ca 50%) van het trisialotransferrine wordt meegeteld; dit levert in een aantal klinische situaties een betere gevoeligheid op (14).
- Tevens wordt de uitkomst gerelateerd aan de totale transferrine-concentratie, waardoor gecorrigeerd wordt voor situaties, waarin het transferrine verhoogd (bij ijzergetekort, in de zwangerschap) of verlaagd is (bij acute fasereacties, proteïnurie) (15).

Naast de %CDTriTIA-test van de firma Axis is inmiddels de %CDT test van de firma Roche beschikbaar (16). Bij deze methoden kunnen de transferrinebepalingen turbidimetrisch of nefelometrisch worden uitgevoerd op een routine analyseautomaat. In het laboratorium van het BMC is een bepaling van de tweede generatie uitgetest met zelf vervaardigde

kolommen (17). Ter controle werd van alle monsters tevens een IEF patroon vervaardigd. Inmiddels is overgestapt op een commerciële kit (% CDTriTIA), waarvan de reproduceerbaarheid veel beter is. Tenslotte is het ook mogelijk de transferrine-isovormen kwantitatief te bepalen met HPLC (18). Deze methode wordt gebruikt om de %CDTriTIA-test te ijken.

Gebruik in de (poli)klinische praktijk

Van oudsher wordt de activiteit van GGT in serum als een parameter gebruikt voor het opsporen van alcoholmisbruik. Vooral een hoge GGT en een normale Alkalische Fosfatase is verdacht. Vanwege de vele andere ziekten, waarbij een GGT verhoging optreedt, is deze bepaling echter niet specifiek. Hetzelfde geldt voor het MCV, dat bij alcoholmisbruik groter wordt. Bij verdenking op alcoholmisbruik levert een combinatie van GGT en KDT de grootste betrouwbaarheid, omdat het mechanisme waardoor deze bepalingen bij alcoholmisbruik een verhoogde uitkomst geven, geheel verschillend is (19, 20, 21, 22). Zijn beide testen normaal, dan is alcoholmisbruik onwaarschijnlijk; zijn beide testen verhoogd, dan is dit zeer waarschijnlijk. De testen zijn niet betrouwbaar genoeg om zonder klinische verdenking alcoholmisbruik onomstotelijk vast te stellen. Bij een verhoogde GGT met een normale KDT moet in eerste instantie aan andere oorzaken voor een verhoging van GGT gedacht worden. Bij een normale GGT en een verhoogde KDT is alcoholmisbruik waarschijnlijk. Foutpositieve uitkomsten van KDT (specificiteit > 95%) worden alleen verkregen bij patiënten met primaire biliaire cirrose (23), bij patiënten met het zo genoemde transferrine D en bij een zeldzame genetische afwijking: het koolhydraatdeficiënt glycoproteïensyndroom. Onlangs vonden wij ook verhoogde CDtect™-uitkomsten bij patiënten met verlaagde ferritinewaarden zonder overmatig alcoholgebruik (24). Of de %CDTriTIA en %CDT-testen bij deze categorie patiënten wel normaal uitkomen, moet nog onderzocht worden. KDT testen zijn vanwege hun sensitiviteit (50% bij problematisch alcoholgebruik tot 80% bij alcoholici) niet geschikt om de hele patiëntenpopulatie te screenen. Wanneer de prétestprevalentie echter boven de 10% komt (door alleen patiënten te testen met anamnestic vermoeden op alcoholmisbruik) levert de test, in combinatie met GGT, zeer bruikbare informatie. In het BMC waren 53 van de 161 patiënten (voornamelijk van huisartsen) positief. Dit duidt op een goede selectie van de patiënten, waarbij de test is aangevraagd. Bij monsters aangeboden in het kader van CBR keuringen (vorderingsprocedures) blijkt meer dan de helft een verhoogde KDT waarde te vertonen. Tenslotte kan de test ook gebruikt worden om bij patiënten met een positieve uitslag het verloop te volgen en zo te controleren of de drinkgewoonte veranderd is (25). Na 4-6 weken abstinente dienen de KDT waarden genormaliseerd te zijn (halfwaardetijd ca 10 dagen). Is de daling minder, dan is een continuering of hervatting van het alcoholmisbruik waarschijnlijk.

Bij de CDtect™ treedt een merkwaardig verschil op bij de bruikbaarheid van de test tussen mannen en vrouwen. Bij de laatsten is de gevoeligheid duidelijk minder. Mogelijk hangt dit samen met hogere referentiewaarden voor vrouwen (tot 26 U/l) dan voor mannen (tot 20 U/l). Dit verschil is bij postmenopauzale vrouwen vrijwel verdwenen (referentiewaarden tot 22 U/l) (26). Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat een verhoogde ijzerbehoefte bij jongere vrouwen gevolgen heeft voor het totaal transferrine en dus ook voor het absolute gehalte aan koolhydraatdeficiënte isovormen. Bij de procentuele bepalingen wordt voor dit effect gecorrigeerd en zijn de referentiewaarden voor mannen en vrouwen gelijk: tot 5%. Of dan ook een grotere sensitiviteit van de test bij vrouwen wordt bereikt, is nog niet vastgesteld. Er zijn ook aanwijzingen, dat het drinkpatroon van vrouwen anders zou zijn en dat het KDT bij vrouwen vooral gerelateerd aan de frequentie van dagen met een zeer hoge alcohol inname (27). In de praktijk komt het voor, dat patiënten vlak voor het doktersbezoek gedronken hebben. In dat geval kan een bloed alcoholspiegel alcoholmisbruik, ook bij een ontkennende patiënt, bewijzen. Enkele uren na de alcoholinname kan men alleen nog sporen ethanol in bloed aantonen. Ethylesters van vetzuren zijn tot 24 uur na alcoholinname in het plasma aantoonbaar (28). Met behulp van chromatografische analyses kan men deze componenten aantonen (29). Voor een klinische toepassing komen ze nog niet in aanmerking. Door de langere halfwaardetijd van KDT zal een onderbreking van het drinkgedrag van enkele dagen voor een doktersbezoek weinig invloed hebben op de uitkomst. Bij deze nieuwe testen ontbreken nog veel gegevens over pré-analytische factoren, die de uitkomst kunnen beïnvloeden. De eerste studies daarover zijn recent verschenen (30, 31).

Conclusie

Met de bepaling van koolhydraat-deficiënt transferrine hebben we een nieuwe marker voor alcoholmisbruik in handen, die een betere specificiteit heeft dan de gebruikelijke parameters, die tot nu toe voor dit doel werden gebruikt. De GGT blijft in deze situatie nuttig als tweede test. De betrouwbaarheid (sensitiviteit en specificiteit) van de combinatie -als ze beide hetzelfde aangeven- is groter dan die van een van de testen afzonderlijk.

Literatuur

1. Heien DM, Pittman DJ. The economic costs of alcohol abuse: An assesment of current methods and estimates. *J Stud Alcohol* 1989; 50: 567-579.
2. Stibler H. Carbohydrate-Deficient Transferrin in Serum: a New Marker of Potentially Harmful Alcohol Consumption Reviewed. *Clin Chem* 1991; 37: 2029-2037.
3. Feiten over Alcohol. Bureau Alcohol Voorlichtingsplan 1993.
4. Cornel M. Detection of problem Drinkers in General Practice. Dissertatie RUL, Maastricht 1994.
5. Korzec A, Hendriks MMT, Warmink HH. Bestaat er samenhang tussen alcoholisme en de kans op verkeersongevallen. *Ned Tijdschr Geneesk* 1995; 139: 2020-2023.

6. Stibler H, Allgulander C, Borg S, Kjellin KG. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Med Scand* 1978; 204: 49-56.
7. van Eijk HG, van Noort WL, Dubelaar ML, van der Heul C. The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta* 1983; 132: 167-171.
8. van Eijk HG, van Noort WL, Kroos MJ, van der Heul C. Microheterogeneity of human serum transferrin. Invloed op de bepalingmethoden en de biologische functie. *Tijdschr NVKC* 1983; 8: 10-13.
9. Landberg E, Pålsson P, Lundblad A, Arnetorp A, Jeppson JO. Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210: 267-274.
10. Xin Y, Lasker JM, Lieber CS. Serum carbohydrate-deficient transferrin: mechanism of increase after chronic alcohol intake. *Hepatology* 1995; 22: 1462-1468.
11. Bean P, Peter JB. A new approach to quantitate carbohydrate-deficient transferrin isoforms in alcohol abusers: Partial iron saturation in isoelectric focussing/immunoblotting and laser densitometry. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; 17: 1163-1170.
12. Stibler H, Borg S, Joustra M. A modified method for the assay of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum. *Alcohol Alcoholism* 1991; (suppl 1): 451-454.
13. Viitala K, Lähdesmäki K, Niemelä O. Comparison of the Axis % CDT TIA and the CDTect method as laboratory tests of alcohol abuse. *Clin Chem* 1998; 44: 1209-1215.
14. Heggli DE, Aurebekk A, Granum B, Westly C, Lovli T, Sundrehagen E. Should tri-sialo-transferrins be included when calculating carbohydrate-deficient transferrin for diagnosing elevated alcohol intake. *Alcohol Alcoholism* 1996; 31: 381-384.
15. Sorvajärvi K, Blake JE, Israel Y, et al. Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol abuse are significantly influenced by alterations in serum transferrin: Comparison of two methods. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20: 449-454.
16. Van Pelt J. De eerste ervaring met een semi-geautomatiseerde bepaling van koolhydraat-deficient transferrine. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1998; 23: 138-140.
17. Schellenberg F, Martin M, Cacès E, Bénard JY, Weill J. Nephelometric determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 1996; 42: 551-557.
18. Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 1993; 39: 2115-2120.
19. Anton RF, Moak DH. Carbohydrate-deficient transferrin and γ -glutamyltransferase as markers of heavy alcohol consumption: gender differences. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 747-754.
20. Helander A, Carlsson AV, Borg S. Longitudinal comparison of carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyl transferase: complementary markers of excessive alcohol consumption. *Alcohol Alcohol* 1996; 31: 101-107.
21. Van Pelt J. Koolhydraat-deficient transferrine: een nieuwe biochemische marker voor chronisch overmatig alcoholgebruik. *Ned Tijdschr Geneesk* 1997; 141: 773-777.
22. Nikkari ST, Koivu TA, Anttila P, Raunio I, Sillanaukee P. Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase are inversely associated with lipid markers of cardiovascular risk. *Eur J Clin Invest* 1998; 28: 793-797.
23. Bean P, Husa A, Liegmann K, Sundrehagen E. Semi-automated carbohydrate-deficient transferrin in primary biliary cirrhosis: a pilot study. *Alcohol Alcohol* 1998; 33: 657-660.
24. Van Pelt J, Azimi H. False positive CDTect values in patients with low ferritin values. *Clin Chem* 1998; 44: 2219-2220.
25. Burke V, Puddey IB, Rakic V, et al. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of change in alcohol intake in men drinking 20 to 60 g of alcohol per day. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 1973-1980.
26. Van Pelt J, Keijzer JJ, Goevaers CGC, Leusink CL. Reference values, sensitivity and specificity of CDTect in perimenopausal women. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 180A.
27. Oslin DW, Pettinati HM, Luck G, et al. Clinical correlations with carbohydrate-deficient transferrin levels in women with alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 1998; 22: 1981-1985.
28. Doyle KM, Cluette-Brown JE, Dube DM, et al. Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake. *J Am Med Ass* 1996; 276: 1152-1156.
29. Laposata M. Fatty acid ethyl esters. Ethanol metabolites with a role in ethanol-induced organ damage and in monitoring of ethanol intake. *Lab Media International* 1997; 14: 12-14.
30. Whitfield JB, Fletcher LM, Murphy TL, et al. Smoking, obesity and hypertension alter the dose-response curve and test sensitivity of carbohydrate deficient transferrin as a marker of alcohol intake. *Clin Chem* 1998; 44: 2408-2409.
31. Martensson O, Schink E, Brandt R. Diurnal variability and in vitro stability of carbohydrate deficient transferrin. *Clin Chem* 1998; 44: 2226-2227.

Summary

Carbohydrate deficient transferrin, the use as marker for alcohol abuse. Kreutzer HJH and Pelt J van. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 166-169.

There is a urgent need for tests that can detect chronic alcohol abuse. Several studies are published on the influence of high ethanol intake on the reduced glycosylation of transferrin, resulting in carbohydrate-deficient transferrin.

Methods for the separation of carbohydrate-deficient transferrin involve either iso-electric focussing or ion exchange chromatography. The latter principle is used for routine assays with automated equipment for the transferrin determination.

Possibly, the percentage of the deficient isoforms to the total transferrin amount is less susceptible to variations in the total transferrin concentration as the absolute concentration of carbohydrate-deficient transferrin.

The CDT test, in combination with the GGT, has a very high specificity and the sensitivity is acceptable merely when the test is used for patients with serious suspicion of alcohol abuse. In other cases, up to 50% false negatives can be detected.