

Hacia una estandarización de las mediciones de transferrina deficiente en hidratos de carbono (TDH).

I. Definición del analito y propuesta de un método de referencia

Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico (IFCC)

Grupo de Trabajo sobre Estandarización de la Transferrina Deficiente en Hidratos de Carbono (IFCC-WG-CDT)

- Jan-Olof Jeppsson¹, Torsten Arndt², François Schellenberg³, Jos P.M. Wielders⁴, Raymond F. Anton⁵, John B. Whitfield⁶ y Anders Helander^{7*}

-
1. Malmö University Hospital, Malmö, Sweden
 2. Bioscientia Institut für Medizinische Diagnostik GmbH, Ingelheim, Germany
 3. Hôpital Trousseau, CHRU, Tours, France
 4. Meander Medisch Centrum, Amersfoort, The Netherlands
 5. Alcohol Research Center, Medical University of South Carolina, Charleston, SC, USA
 6. Royal Prince Alfred Hospital, Sydney, Australia
 7. Karolinska Institutet and Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

Esta traducción fue autorizada por la IFCC. Sin embargo, la IFCC no acepta ninguna responsabilidad por la exactitud de la misma. El documento definitivo continúa siendo el original en inglés.

Resumen

Un cambio, asociado con el alcohol, en el patrón sérico de la glicofoma de transferrina, la transferrina deficiente en hidratos de carbono (TDH), se utiliza como biomarcador del consumo crónico de alcohol de moderado a excesivo. Una de las limitaciones actuales del análisis de TDH es la falta de estandarización, lo cual dificulta la comparación clínica y analítica entre los estudios. Esta situación impulsó la creación de un Grupo de Trabajo (WG) sobre la Estandarización de TDH con el auspicio de la Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico (IFCC). El trabajo de estandarización tiene como objetivo definir y validar el analito, seleccionar un método de referencia, elaborar procedimientos para la producción de materiales de referencia y realizar sugerencias para el uso clínico de TDH. La primera recomendación del WG es que la disialotransferrina debería ser la molécula blanco primaria para la medición de TDH y el analito simple en el que se base la estandarización de TDH. Además, se recomienda que la HPLC sea el principio analítico considerado como base de un método de referencia provisorio hasta que se establezca un método de referencia de espectrometría de masas apropiado. En el uso clínico, la TDH debería expresarse en una cantidad relativa (% TDH) para compensar por las variaciones en la concentración de transferrina total.

Palabras clave: biomarcador de alcohol * transferrina deficiente en hidratos de carbono * disialotransferrina * cromatografía líquida de alta definición * estandarización

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

La Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico (IFCC) ha autorizado a Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana a traducir al español los documentos aprobados por los distintos Comités de la División Científica de la entidad. Esto significa una distinción para nuestra publicación pero al mismo tiempo el compromiso de transformarla en una sección permanente.

Antecedentes históricos: transferrina deficiente en hidratos de carbono (TDH) y métodos analíticos

La transferrina, principal glicoproteína para el transporte de hierro en humanos, muestra una microheterogeneidad distintiva debida a variaciones en la secuencia de los aminoácidos, a la estructura oligosacárida (N-glicano) y a la carga de hierro (1) (2). En la década del setenta, Stibler y sus colaboradores compararon los patrones de transferrina en suero y en líquido cefalorraquídeo utilizando la técnica del enfoque isoeléctrico (IEF) recientemente desarrollada, e identificaron un patrón con una isoforma de transferrina anormal (glicofoma) que estaba relacionado con el abuso de alcohol (3). Las glicofomas asociadas con el alcohol mostraban puntos isoeléctricos en un pH de 5,7 o mayor en el estado saturado con hierro y se demostró que poseían un menor contenido de ácido siálico si se las comparaba con la glicofoma más importante, la tetrasialotransferrina; por ende se la llamó transferrina "deficiente en carbohidrato" o TDH en su forma abreviada (4). A la TDH originariamente se la definió como la suma de las glicofomas asialo-, monosialo- y disialotransferrina. Estudios posteriores revelaron que la disialo- y la asialotransferrina no solamente no poseen los residuos terminales ácidos siálicos sino que tampoco tienen un N-glican completo en el caso de la disialo-transferrina o ambos N-glicanos en el caso de la asialo-transferrina (5) (6).

Se han publicado desde entonces cientos de estudios sobre distintas aplicaciones clínicas de la TDH como biomarcador para la detección y el seguimiento del consumo excesivo, crónico, de alcohol, aunque se ha hecho menos hincapié en los temas analíticos (2) (4) (7-9). La determinación de la TDH tradicionalmente se ha basado en las diferencias en la carga (es decir, punto isoeléctrico) entre las glicofomas de la transferrina saturada con hierro, mediante la IEF de proteínas en suero seguida por inmunofijación utilizando anticuerpos anti-transferrina, que durante mucho tiempo fue considerado el método estándar. Recién en 1992 se lanzó un equipo comercial de pruebas para TDH (CDTectTM; Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Suecia) (10). En el método CDTect, que ya no se utiliza más, la TDH se separaba de las glicofomas no-TDH por medio de pequeñas columnas de intercambio aniónico, seguidas de la medición de cantidades absolutas de TDH (en mg/L o U/L) utilizando un inmunoensayo de transferrina. Los equipos de prueba de TDH posteriores (por ejemplo, %TDH TIA, %TDH) mantuvieron el principio original de la separación en columnas seguido por un inmunoensayo de transferrina, pero implicaban modificaciones en el procedimiento de separación, lo cual dio lugar a la inclusión

de proporciones variables de trisialotransferrina en la fracción TDH, o en la parte inmunoquímica, cuantitativa de la prueba (11-13). Se demostró posteriormente que la inclusión de la trisialotransferrina resultaba ser desfavorable para las pruebas de TDH, ya que las muestras de suero que contenían un alto nivel de esta glicofoma, que no está relacionada con el abuso de alcohol, pueden producir resultados falsamente elevados en los inmunoensayos de TDH (14-17).

Otro cambio importante respecto del método original CDTect consistió en expresar la TDH como concentración relativa (% TDH) en vez de concentración absoluta. La normalización de los valores de TDH a la concentración total de transferrina contribuyó a una mejora significativa del análisis de TDH (18-21) al compensar por los valores falsamente altos y falsamente bajos en casos de aumento (por anemia, embarazo, anticonceptivos orales) o disminución (por enfermedad crónica, carcinoma) de las concentraciones de transferrina. Una desventaja existente en las combinaciones de inmunoensayo de transferrina/separación en columna es que separan las glicofomas TDH de las glicofomas no-TDH basadas en diferencias en punto isoeléctrico y carga, sin ningún control de las subfracciones individuales diluidas. De ese modo, estos métodos pueden proporcionar resultados imprecisos para cualquier cambio en el punto isoeléctrico, tales como el que sucede en los polimorfismos genéticos de transferrina y en los desórdenes raros congénitos de la glicosilación (CDG) (2) (4) (15) (22). En un número de casos limitado pero significativo, esto podría dar lugar a resultados de TDH falsamente altos o bajos que podrían originar identificaciones de consumo abusivo de alcohol falso-positivas o falso-negativas con consecuencias indeseadas desde el punto de vista clínico y forense.

También se han introducido otras técnicas analíticas para la determinación de rutina de TDH, incluyendo HPLC comercial y no comercial (23-26) y métodos de electroforesis capilar (EC) (27-29). A pesar de que son generalmente más trabajosos y que consumen más tiempo que los inmunoensayos, las ventajas específicas de los métodos de HPLC y EC consisten en que se pueden documentar de manera visible los patrones de glicofomas de transferrina y, por lo tanto, la posibilidad de detectar potenciales interferencias analíticas como las variantes genéticas de transferrina, CDG, y cantidades relativas elevadas de mono- y trisialotransferrina (15) (17) (22) (30). Al diferenciar entre consumo de alcohol moderado y excesivo, el análisis de la curva de características receptor-operador (ROC) también demostró que el área bajo la curva para HPLC era significativamente mayor que para el método de la minicolumna (CDTect) (24).

Además de estos métodos, el primer inmunoensayo directo de TDH (N Latex CDT) para ser usado en los sistemas Dade Behring BNTM (Dade Behring, Marburg,

Alemania) se lanzó recientemente (31) (32). El N Latex CDT es un ensayo inmunonefelométrico directo basado en un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente la estructura de las glicofomas de transferrina que carecen de uno o ambos N-glicanos completos, que se corresponden con la disialo-, monosialo- y asialotransferrina (es decir, las glicofomas TDH), y en un inmunoensayo simultáneo de transferrina total. Los valores relativos (% TDH) se calculan automáticamente.

Necesidad de una estandarización de las mediciones de TDH

Durante los últimos 15 años aproximadamente, la introducción de un amplio rango de técnicas y métodos analíticos para la cuantificación de TDH en distintas cantidades absolutas (mg/L o U/L) o relativas (por ejemplo, % TDH respecto de transferrina total o tetrasialotransferrina), cada una con sensibilidad y especificidad analíticas diferentes (2) (4) (9), además de la inclusión de distintas glicofomas de transferrina en "TDH", ha complicado la comparabilidad de los resultados analíticos y clínicos entre los estudios (2) (15) (33). La amplia gama de valores de corte asociados para TDH (que varían de 0,8% a 6,0% para los valores relativos) utilizada para detectar ingestas de alcohol perjudiciales también ha ocasionado mucha confusión entre el personal médico cuando se utiliza esta prueba de manera clínica para el *screening* y seguimiento del consumo excesivo de alcohol. Además, la complejidad estructural de las glicofomas de la TDH ha impedido el desarrollo de materiales de referencia sobre los cuales se pueda basar la estandarización inter-ensayo necesaria para una supervisión regulatoria de la calidad del laboratorio clínico y la validez de los resultados.

Estos problemas promovieron el inicio de un Grupo de Trabajo sobre Estandarización de la TDH (WG-TDH) auspiciado por la Federación Internacional de Química Clínica y Laboratorio Clínico (IFCC). Las metas iniciales de este trabajo consisten en definir el analito más apropiado para TDH, seleccionar un método de referencia para la medición de TDH, y diseñar procedimientos para la producción y distribución de materiales de referencia para el analito seleccionado. Las metas futuras son validar el analito, el método de referencia y los materiales de referencia en estudios multicéntricos. Además, el WG va a realizar recomendaciones sobre las aplicaciones clínicas para la TDH.

El WG se reunió por primera vez en 2005 en el Congreso conjunto de la IFCC/AACC en Orlando, Florida, y hubo una reunión analítica del subgrupo que se realizó en marzo de 2006 en Ingelheim, Alemania. El trabajo inicial hacia la estandarización de las mediciones de TDH ha centrado su atención en la definición

del analito y en la propuesta de un método de referencia. El trabajo a futuro se dedicará a la preparación de los materiales de referencia basados en la disialotransferrina en suero humano purificada, y al uso de tales materiales para evaluar y comparar diferentes métodos de TDH.

DEFINICIÓN DEL ANALITO

En gran medida debido a razones analíticas relacionadas con la separación de las glicofomas de transferrina utilizando los métodos iniciales, a la TDH originalmente se la definía como la suma de asialo-, monosialo- y disialotransferrina (4). Entre ellas, la monosialotransferrina no es considerada conveniente como analito blanco para la medición de TDH, debido a que la cantidad de esta glicofoma en suero está principalmente asociada con un alto nivel de trisialotransferrina en la muestra y no con la ingesta de alcohol (15).

Por otro lado, la asialo- y la disialotransferrina están claramente relacionadas con un excesivo consumo crónico de alcohol, a pesar de que muestran diferente sensibilidad y especificidad (25) (28) (34) (35). La disialotransferrina aumenta con la ingesta de alcohol y se observan concentraciones elevadas luego de un consumo sostenido de alcohol, de moderado a excesivo (36). Con los métodos analíticos actuales para TDH, la asialotransferrina no se puede medir en sujetos abstinentes y que beben alcohol socialmente, pero se transforma en elevada con el alto consumo de alcohol (37) y luego acompaña un ya elevado nivel de disialotransferrina (25) (26). Por consiguiente, la sensibilidad diagnóstica de la asialotransferrina es más baja en comparación con la disialotransferrina, y demasiado baja para la detección del consumo crónico pero moderado de alcohol. Debido a que cualquier mejora en la especificidad diagnóstica obtenida al medir la asialotransferrina sola no justifica la significativa reducción en la sensibilidad diagnóstica si se la compara con la disialotransferrina (25) (26), y debido a que el trabajo de estandarización debería enfocarse en una sola sustancia, se acordó que la disialotransferrina debería ser el analito elegido en primer lugar para la estandarización de TDH.

El nivel de saturación con hierro de la transferrina también necesita ser considerado en la definición del analito debido a que esto influye en el punto isoeléctrico y en la estructura, y, por lo tanto, en las propiedades químicas y analíticas (y probablemente también en las antigénicas). Por consiguiente, para los métodos analíticos de TDH que dependen de diferencias en la carga (punto isoeléctrico) entre la disialotransferrina de la molécula elegida y las otras glicofomas, la medición debería realizarse luego de una saturación completa con hierro de la transferrina en la muestra. Además, debido a que la disialotransferrina teóricamente

puede ser glicosilada en dos posiciones diferentes (en Asn-413 o Asn-611) se considera que es de importancia también elucidar la estructura del analito.

PROPUESTA DE UN MÉTODO DE REFERENCIA PARA TDH

Se recomienda que cualquier método de referencia para TDH sea "público" o independiente de cualquier tecnología patentada. También debería ser aplicable a muestras de pacientes con variantes genéticas de transferrina y otras glicofomas de transferrina, o al menos poder identificar esas muestras. La espectrometría de masas probablemente sea la mejor técnica para un método de referencia, pero en la actualidad la HPLC es considerada el mejor candidato como método de referencia provisorio para TDH, por las siguientes razones:

- a) La medición de la absorbancia transferrina-hierro a 460-470 nm hace que esta técnica sea específica y sensible y que tenga un bajo riesgo de interferencia analítica (38);
- b) Permite que se realice una separación adecuada de las glicofomas de transferrina;
- c) La cuantificación de cualquiera de las concentraciones de disialotransferrina, la absoluta o la relativa, puede obtenerse midiendo el área del pico o su altura; y
- d) El trazado de HPLC proporciona un registro fácil de comprender para la identificación del pico.

Se ha publicado un método de HPLC bien definido para la cuantificación de las glicofomas de transferrina utilizando materiales disponibles comercialmente (25) y podría establecerse una red internacional de laboratorios de referencia.

La EC fue considerada menos conveniente como método de referencia debido a que se basa en la medición un tanto no específica de la absorbancia de la unión péptido en ~200 nm, en el que muchas otras biomoléculas con puntos isoelectrónicos similares (por ejemplo, proteína C-reactiva, cadenas livianas, y factores del complemento) podrían interferir al estar presentes en concentraciones mayores (28) (39) (40). Se ha informado que la sensibilidad analítica de la EC también ha sido menor que para HPLC (29), a pesar de que se están desarrollando métodos de EC mejorados.

Conclusiones

La definición de la disialotransferrina como objetivo primario para la medición de TDH y de analito para la estandarización de TDH, y la recomendación de

la HPLC como el principio analítico para un método de referencia provisorio hasta que se pueda acceder a un método de espectrometría de masas, representan los primeros pasos hacia una estandarización de las mediciones de TDH. En el uso clínico, los valores de TDH deberían expresarse como una cantidad relativa (% TDH) para compensar por los valores falsamente altos y bajos en caso de disminución o aumento de la concentración total de transferrina. El WG-TDH espera que las recomendaciones que aquí se presentan puedan mejorar el rendimiento diagnóstico de la medición de TDH como biomarcador de consumo de alcohol crónico de moderado a alto y avanzar en la comparabilidad de las pruebas clínicas y analíticas de TDH. Como resultado de esto se logrará una mayor capacidad del laboratorio de ayudar en el trabajo forense, una asistencia más valiosa al personal médico en el diagnóstico y, finalmente, se logrará, nada más y nada menos, mejorar la atención al paciente.

Referencias bibliográficas

1. de Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 1990; 190: 1-46.
2. 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.
3. 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.
4. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991; 37: 2029-37.
5. Landberg E, Pahlsson P, Lundblad A, Arnetorp A, Jeppsson J-O. Carbohydrate composition of serum transferrin isoforms from patients with high alcohol consumption. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 210:267-74.
6. Flahaut C, Michalski JC, Danel T, Humbert MH, Klein A. The effects of ethanol on the glycosylation of human transferrin. *Glycobiology* 2003; 13:191-8.
7. Allen JP, Litten RZ, Anton RF, Cross GM. Carbohydrate-deficient transferrin as a measure of immoderate drinking: remaining issues. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 799-812.
8. Fleming MF, Anton RF, Spies CD. A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 1347-55.
9. 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.

10. 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.
11. Helander A, Fors M, Zakrisson B. Study of Axis-Shield new %CDT immunoassay for quantification of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in serum. *Alcohol Alcohol* 2001; 36: 406-12.
12. Schwarz MJ, Domke I, Helander A, Janssens PM, Van-Pelt J, Springer B, et al. Multicentre evaluation of a new assay for determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Alcohol* 2003; 38 :270-5.
13. Alden A, Ohlson S, Pahlsson P, Ryden I. HPLC analysis of carbohydrate deficient transferrin isoforms isolated by the Axis-Shield %CDT method. *Clin Chim Acta* 2005; 356:143-6.
14. Dibbelt L. Does trisialo-transferrin provide valuable information for the laboratory diagnosis of chronically increased alcohol consumption by determination of carbohydrate-deficient transferrin? *Clin Chem* 2000; 46: 1203-5.
15. Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson J-O. Interference of transferrin isoform types with carbohydrate deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 2001; 47: 1225-33.
16. Arndt T, Korzec A, Bär M, Kropf J. 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:CR411-8.
17. Arndt T, Gressner A, Herwig J, Meier U, Sewell AC. Argininosuccinatelyase deficiency (ASL) and carbohydrate deficient transferrin (CDT): experience with four independent CDT analysis methods – misleading results given by the %CDT TIA assay. *Clin Chim Acta* 2006; 373: 117-20.
18. Schellenberg F, Benard JY, Le Goff AM, Bourdin C, Weill J. Evaluation of carbohydrate-deficient transferrin compared with Tf index and other markers of alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res* 1989; 13: 605-10.
19. Sorvajärvi K, Blake JE, Israel Y, Niemelä O. Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol abuse are significantly influenced by alterations in serum transferrin: comparison of two methods. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20:449-54.
20. Keating J, Cheung C, Peters TJ, Sherwood RA. Carbohydrate deficient transferrin in the assessment of alcohol misuse: absolute or relative measurements? A comparison of two methods with regard to total transferrin concentration. *Clin Chim Acta* 1998; 272: 159-69.
21. Helander A. Absolute or relative measurement of carbohydrate-deficient transferrin in serum? Experiences with three immunological assays. *Clin Chem* 1999; 45:131-5.
22. Helander A, Bergström J, Freeze HH. Testing for congenital disorders of glycosylation by HPLC measurement of serum transferrin glycoforms. *Clin Chem* 2004; 50: 954-8.
23. Jeppsson J-O, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 1993; 39: 2115-20.
24. Turpeinen U, Methuen T, Alfthan H, Laitinen K, Salaspuro M, Stenman UH. Comparison of HPLC and small column (CDTect) methods for disialotransferrin. *Clin Chem* 2001; 47: 1782-7.
25. Helander A, Husa A, Jeppsson J-O. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003; 49: 1881-90.
26. Helander A, Bergström JP. Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum using the Bio-Rad %CDT by HPLC test. *Clin Chim Acta* 2006; 371: 187-90.
27. Wuyts B, Delanghe JR, Kasvosve I, Gordeuk VR, Gangaidzo IT, Gomo ZA. Carbohydrate-deficient transferrin and chronic alcohol ingestion in subjects with transferring CD-variants. *Clin Chem Lab Med* 2001; 39: 937-43.
28. Legros FJ, Nuyens V, Minet E, Emonts P, Boudjeltia KZ, Courbe A, et al. Carbohydrate-deficient transferrin isoforms measured by capillary zone electrophoresis for detection of alcohol abuse. *Clin Chem* 2002; 48: 2177-86.
29. Helander A, Wielders JP, Te Stroet R, Bergström JP. Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 2005; 51: 1528-31.
30. Carchon HA, Chevigne R, Falmagne JB, Jaeken J. Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin. *Clin Chem* 2004; 50: 101-11.
31. Helander A, Dahl H, Swanson I, Bergström J. Evaluation of Dade Behring N Latex CDT: a novel homogeneous immunoassay for carbohydrate-deficient transferrin (abstract). *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28(Suppl):33A.
32. Kraul D, Hackler R, Althaus H. A novel particle-enhanced assay for the immunonephelometric determination of carbohydrate-deficient transferrin (abstract). *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28(Suppl):34A.
33. Arndt T, Keller T. Forensic analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT): implementation of a screening and confirmatory analysis concept is hampered by the lack of CDT isoform standards. *Forensic Sci Int* 2004; 146: 9-16.
34. Mårtensson O, Härlin A, Brandt R, Seppä K, Sillanaukee P. Transferrin isoform distribution: gender and alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 1710-5.
35. Arndt T. Asialotransferrin – an alternative to carbohydrate-deficient transferrin? *Clin Chem* 2003; 49: 1022-3.
36. Schellenberg F, Schwan R, Mennetrey L, Loiseaux MN, Pages JC, Reynaud M. 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.
37. Schwan R, Loiseaux MN, Albuisson E, Legros FJ, Nuyens V, Malet L, et al. Performance of asialotransferrin in detecting alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 81–3.
 38. Jeppsson J-O. Isolation and partial characterization of three human transferrin variants. *Biochim Biophys Acta* 1967; 140: 468–76.
 39. 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.
 40. Ramdani B, Nuyens V, Codden T, Perpete G, Colicis J, Lenaerts A, et al. Analyte comigrating with trisialotransferrin during capillary zone electrophoresis of sera from patients with cancer. *Clin Chem* 2003; 49: 1854–64.