

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**SIMONA BLATNIK**

**DIPLOMSKA NALOGA**

**VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE  
BIOMEDICINE**

**Ljubljana, 2011**

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO



SIMONA BLATNIK

**DOLOČANJE DELEŽA DISIALOTRANSFERINA IN  
ASIALOTRANSFERINA Z NEFELOMETROM IN  
KAPILARNO ELEKTROFOREZO**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko nalogo sem opravljala v Diagnostičnem laboratoriju Splošne bolnišnice Novo mesto.

### **ZAHVALA**

Za strokovno pomoč, vodenje in vzpodbudo pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju prof. dr. Borutu Božiču, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorici asist. mag. Danijeli Furlan, spec. med. biokem.. Za pomoč pri laboratorijskem delu se zahvaljujem vsem sodelavcem Diagnostičnega laboratorija Splošne bolnišnice Novo mesto.

### **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Božiča, mag. farm., spec. med. biokem. in somentorstvom asist. mag. Danijejele Furlan, spec. med. biokem..

Simona Blatnik

Ljubljana, 2011

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Darko Černe

Član diplomske komisije: asist.dr. Simon Žakelj.mag. farm

# **KAZALO**

*POVZETEK*

*SEZNAM OKRAJŠAV*

*SEZNAM SLIK*

*PREGLEDNICE*

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	JETRA .....	1
1.1.1	Lega in zgradba jeter .....	1
1.1.2	Delovanje in glavne naloge jeter .....	2
1.1.3	Jetrne bolezni .....	4
1.2	OBLIKE TRANSFERINA .....	5
1.2.1	Transferin .....	5
1.2.2	Izooblike transferina .....	6
1.2.3	CDT .....	7
1.2.3.1	Kdaj pride do lažno zvišanih vrednosti? .....	9
1.2.4	Principi določanja CDT .....	9
1.2.4.1	Ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC) .....	10
1.2.4.2	Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) .....	10
1.2.4.3	Kapilarna elektroforeza (CE) .....	11
1.2.4.4	Imunonefelometrična metoda .....	11
<b>2</b>	<b>NAMEN DELA</b> .....	<b>12</b>

<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b>	<b>13</b>
3.1	PREISKOVANCI / VZORCI	13
3.2	REAGENTI	13
3.2.1	Reagenti za delo na analizatorju BN ProSpec	13
3.2.2	Reagenti za delo na analizatorju Minicap CDT	14
3.2.3	Oprema	14
3.3	METODE	14
3.3.1	Nefelometrično določanje CDT	14
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>17</b>
4.1	REZULTATI VZPOREDNIH DOLOČITEV %CDT	17
4.2	REZULTATI Z UPOŠTEVANJEM PRAŽNIH VREDNOSTI	19
<b>5</b>	<b>SKLEP</b>	<b>22</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>23</b>
	<b>PRILOGA</b>	<b>25</b>
	<i>Priloga I: Rezultati vzporednih določitev deleža CDT v serumu na dveh različnih analizatorjih z dvema različnima metodama</i>	25
	<i>Priloga II: Primerjava rezultatov, ki so višji od praznih vrednosti (cut off) &lt;2,5% za nefelometrijo</i>	28
	<i>Priloga III: Primerjava rezultatov, ki so višji od praznih vrednosti (cut off &lt;1,3%) za kapilarno elektroforezo</i>	29

## POVZETEK

Transferrin z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (CDT; carbohydrate deficient transferrin) je biokemijski označevalec, ki je učinkovit in danes najbolj razširjen pripomoček v diagnostiki in spremljanju škodljivega uživanja alkoholnih pijač. Njegovo zvišano serumsko vrednost lahko povzroči že neprekinjeno dnevno uživanje 50 do 80 g etanola vsaj 14 dni zaporedoma. CDT je v literaturi označen kot najbolj specifičen označevalec za odkrivanje in spremljanje kronične uporabe alkohola. V zadnjih letih je CDT v središču pozornosti zaradi relativno visoke diagnostične specifičnosti (97%) in le nekoliko nižje diagnostične občutljivosti (93%). Med uporabljenimi metodami nobena ne velja za referenčno.

Namen naše naloge je bil ugotoviti skladnost rezultatov meritev deleža CDT z nefelometrično metodo z rezultati, predhodno pridobljenimi s kapilarno elektroforezo. V serumskih vzorcih naključno izbranih preiskovancev (n=102) smo v serumu nefelometrično določali delež CDT in primerjali rezultate s predhodnimi meritvami CDT s kapilarno elektroforezo. Ugotovili smo, da se nefelometrično pridobljeni rezultati ne razlikujejo bistveno od elektroforezno pridobljenih, saj je korelacijski koeficient  $r = 0,9697$ .

Primerjava rezultatov po obeh metodah z upoštevanjem praznih vrednosti za CE  $<1,3\%$  in nefelometrijo  $<2,5\%$  je pokazala neujemanje pri enajstih rezultatih. Deset meritev, ki so bile pri kapilarni elektroforezi nad prazno vrednostjo ( $>1,3\%$ ), je bilo z nefelometrično metodo pod prazno vrednostjo ( $< 2,5\%$ ). Vseh deset rezultatov je bilo pri kapilarni elektroforezi v nizkem območju (od  $1,3\%$  -  $1,6\%$ ), za katerega se priporoča ponovna analiza. Pri enem vzorcu je bila razlika v rezultatu na drugi decimalki, ki je meritve v kapilarni elektroforezi ne upoštevajo ( $2,54\%$  napram  $2,5\%$ ). Primerjava rezultatov CDT je potrdila ustreznost uvedbe in uporabe nefelometrične metode v rutinsko delo medicinskega laboratorija sekundarne ravni.

## ***SEZNAM OKRAJŠAV***

Tf	transferin
CDT	transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (angl.: Carbohydrate-Deficient Transferrin)
CDG	prirojena motnja glikozilacije (angl.: Congenital disorder of glycosylation)
CE	kapilarna elektroforeza (angl.: Capillary Electrophoresis)
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl.: High Performance Liquid Chromatography)
IEC	ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo (angl.: Ion Exchange Columns with Immunoturbidimetric Detection)
IEF	izoelektrično fokusiranje (angl.: Isoelectric Focusing)
r	Pearsonov koeficient korelacije
pI	izoelektrična točka
ADH	aldehidna dehidrogenaza

## **KAZALO SLIK**

<b>Slika 1:</b> Prikaz lege jeter v trebušni votlini.....	1
<b>Slika 2:</b> Shematski prikaz delovanja jeter.....	3
<b>Slika 3:</b> Shematski prikaz molekule Tf z dvema oligosaharidnima verigama in dvema vezavnima mestoma za Fe <sup>3+</sup> .....	5
<b>Slika 4:</b> Izooblike transferina glede na sializiranost.....	6
<b>Slika 5:</b> Prikaz ločenih izooblik transferina na elektroferogramu pri kapilarni elektroforezi (CE).....	11
<b>Slika 6:</b> Analizator BN ProSpec.....	15
<b>Slika 7 :</b> Direktno določanje CDT.....	15
<b>Slika 8:</b> Princip reakcije za določitev CDT.....	16
<b>Slika 9:</b> Delež preiskovancev po spolu.....	17
<b>Slika 10:</b> Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 102 vzorca, izmerjenih na analizatorju BN ProSpec in Minicap CDT.....	18
<b>Slika 11:</b> S stolpčnim grafikonom so predstavljeni deleži vzorcev s zvišanimi vrednostmi %CDT določenimi vzporedno iz istih vzorcev z nefelometrijo in kapilarno elektroforezo.....	19

## **PREGLEDNICA**

<b>Preglednica I</b> Prikaz statistično obdelanih rezultatov določitve deleža CDT z obema metodama .....	18
--	----



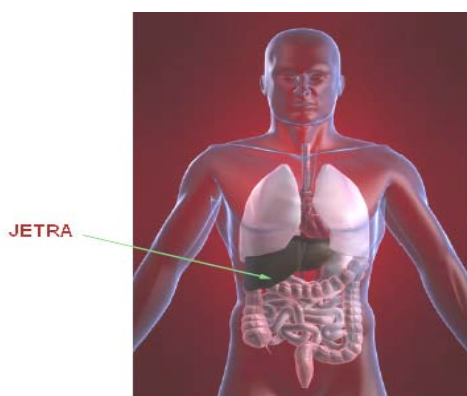
# 1 UVOD

## 1.1 JETRA

Jetra so največja žleza v človeškem telesu. So tesno povezana s prebavili, čeprav dejansko niso njihov del. So največji in eden najpomembnejših notranjih organov. Delujejo kot kemična tovarna in so najvažnejši metabolni organ, saj opravljajo številne življenjsko pomembne naloge. V jetrih poteka 60% vseh metabolnih procesov. So organ za skladiščenje snovi in proizvajajo žolč. So eden redkih notranjih organov, ki so sposobni naravne regeneracije. Lahko se popolnoma obnovijo tudi, kadar je ostala le še četrtnina neprizadetega tkiva (1).

### 1.1.1 Lega in zgradba jeter

Jetra ležijo desno zgoraj v trebušni votlini priraščena ob trebušno prepono tako, da na njej vise (slika 1). Zgornja in spodnja ploskev organa je gladka in zaobljena, tako da se prilega preponi. Imajo obliko stožca. Na spodnji strani skozi jetrno lino vstopajo in izstopajo žile, živci, mezgovnice in žolčna izvodila. Spodnji rob jeter sega pod levi rebri lok. Manjši levi del jeter sega še preko sredine v levo proti žlički in deloma prekriva želodec (2).



**Slika 1:** Prikaz lege jeter v trebušni votlini

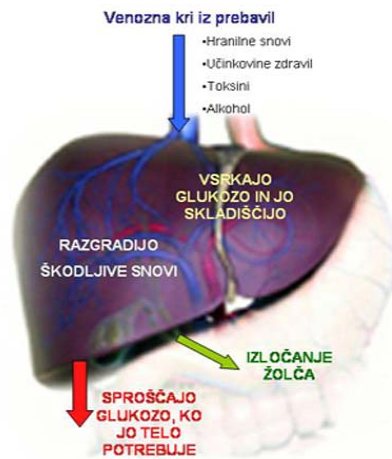
V jetrih je na milijone jetrnih celic ali hepatocitov, ki tvorijo perenhim in uravnavajo sestavo krvi. Nenehno kontrolirajo različne snovi, ki so se vsrkale v kri. V veliki krvni obtok prepuščajo le tiste snovi, ki so trenutno potrebne v telesnih tkivih druge snovi pa jetrne celice prestrežejo, jih uskladiščijo ali primerno preobrazijo, manjši del pa porabijo za lastno vzdrževanje. Uskladiščene in predelane snovi oddajajo celice po potrebi v kri ali pa

jih izločajo z žolčem. Žolč je zelenkasto rumena tekočina, ki nastaja v jetrih. V njem je približno 97 odstotkov vode, vsebujejo pa tudi razne odpadne snovi (holesterol, barvilo bilirubin, žolčne kisline in njihove soli, anorganske soli..). Žolč steče v dvanajstnik med samo prebavo, kadar pa ne prebavljamo pa se žolč zateka v žolčnik. Žolčnik zbira žolč iz jeter in ga zgoščuje tako, da iz njega odstrani vodo in nekatere snovi, ki se ponovno vsrkajo v kri. Za pravilno delovanje jeter je velikega pomena dvojni dotok krvi. Značilen pretok krvi v jetrih omogoča jetrnim celicam, da dobivajo sproti dovolj kisika za živahno presnovno delo.

### **1.1.2 Delovanje in glavne naloge jeter**

Kot žleza z zunanjim izločanjem jetra proizvajajo žolč in ga po žolčnih odvodilih oddajajo v dvanajstnik. Jetra so v telesu osrednji organ presnove, ki zagotavlja telesnim celicam uravnovešeno trenutnim potrebam prilagojeno oskrbo z življenjsko pomembnimi snovmi. To obsežno nalogo opravljajo jetra na različne načine: iz krvi prestrezajo oziroma preoblikujejo tiste snovi, ki so se vsrkale v kri v neprimerni obliki.

Poleg osrednje vloge jeter v prebavi, jetrne celice razstrupljajo strupene in odpadne snovi ter različne kemikalije (npr. alkohol) in tvorijo snovi, ki so vitalnega pomena za organizem (npr. holesterol, plazemske beljakovine, lipoproteine). Privzemajo tudi odvečna hranila iz krvi in jih uskladiščijo za poznejše potrebe (slika 2). Iz razpoložljivega materiala izdelujejo vrsto snovi, ki jih telesne celice trenutno najbolj potrebujejo in te snovi oddajajo v kri. Zaradi tako pomembne vloge je jetrnih celic več, kot jih potrebujemo. Tudi če se del jeter okvari ali odstrani, se lahko manjkajoči del hitro in enostavno obnovi. Vsa kri iz celotnih prebavil se zbira v veliko dovodno veno (veno porte). S to krvjo pritekajo v jetra skoraj vsa zaužita hranila za nadaljnjo kemično predelavo in porabo. Jetrni krvni obtok prinaša kri, bogato s hranilnimi snovmi, iz trebušnih organov neposredno v jetra. Kri teče skozi jetra počasi, da lahko jetrne celice odvzamejo iz krvi aminokisline, maščobne kisline in glukozo. Istočasno jetrni fagociti odstranijo in uničijo bakterije, ki jim je uspelo priti skozi steno prebavnega trakta v kri (4,5).



**Slika 2:** Shematski prikaz delovanja jeter.

Glavne naloge jeter so:

- Uravnavanje sladkorja v krvi

Vsrkavajo čezmerno glukozo in jo shranjujejo v obliki glikogena.

Sproščajo glukozo v kri, ko se v njej zmanjša količina sladkorja.

- Presnavljanje beljakovin

Zbirajo aminokislino in iz njih izdelujejo beljakovine.

V procesu deaminacije razgradijo odvečne količine aminokislin.

- Presnavljanje maščob

Spreminjajo maščobe v obliko, primerno za shranjevanje ali razgradnjo in sproščanje energije.

Izdelujejo večino telesnega horesterola.

- Izdelava žolča

Izdelujejo žolč in snovi, ki so v njem raztopljene.

- Razstrupljanje

S povečanjem topnosti nekaterim strupenim kemičnim snovem pomagajo k lažjemu odstranjevanju iz krvi.

➤ Shranjevanje vitaminov

Shranjujejo več vitaminov med njimi tudi A, D in B<sub>12</sub>.

➤ Shranjevanje rudnin

Shranjujejo železo in baker, rudnini, ki ju telo potrebuje za izdelavo hemoglobina.

➤ Razgradnja hormonov

Iz krvi odstranjujejo hormone in jih razgradijo.

➤ Tvorba krvnih telesc pred rojstvom

➤ Produkcija toplote (3)

### **1.1.3 Jetrne bolezni**

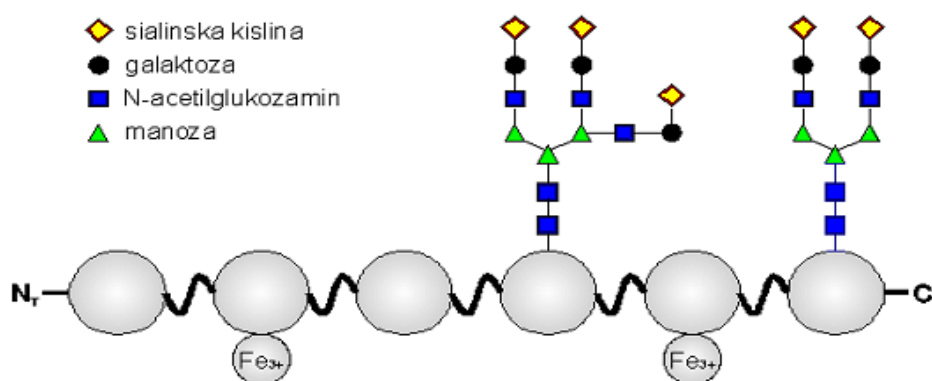
Jetra obolijo iz različnih vzrokov med katerimi so virusne okužbe, avtoimunske motnje in metabolne motnje (ikterus ali zlatenica). Med metabolnimi motnjami so pomemben vzrok bolezni toksične snovi, predvsem organska topila (poklicne bolezni) in nezumno uživanje alkohola. Čezmerno pitje alkohola vodi v okvaro jeter, ki je lahko nepovratna. Alkohol razgrajuje encim aldehydna dehidrogenaza (ADH) in ker imajo ženske teh encimov manj kot moški, so bolj izpostavljene tveganju. Kot posledica dolgotrajnega prekomernega pitja alkoholnih pijač se lahko pojavi alkoholna jetrna bolezen. Razvoj alkoholne jetrne okvare ni vezan na vrsto alkoholnih pijač, ampak na količino vnesenega etanola, pogostost uživanja alkoholnih pijač, trajanje uživanja alkoholnih pijač, trajanje obdobja abstinence; odvisen je tudi od spola, dednih dejavnikov, imunoloških nepravilnosti, prehranjenosti in hitrosti presnove etanola ter od drugih dejavnikov, ki hkrati obremenjujejo jetrni metabolizem. Histološko se lahko pokaže v različnih oblikah: kot maščobna infiltracija jeter (steatoza), alkoholni hepatitis in alkoholna ciroza. Alkoholna ciroza se razvije pri 10 % hudih alkoholikov, alkoholni hepatitis pri 10 do 35 % in steatoza pri 90 do 100 % hudih pivcev. Ko zaužijemo alkohol se nekaj alkohola izloči z urinom ali izdiha skozi pljuča, večino pa encimi v jetrih pretvorijo v acetaldehid. Tako alkohol kot acetaldehid poškodujeta jetrne celice. Alkoholna okvara jeter se začne z nenormalnim kopičenjem

maščob v jetrih (maščobna jetra). Včasih je posledica vnetja ali alkoholnega hepatitisa. Če osebe z maščobnimi jetri ali alkoholnim hepatitisom ne prenehajo s pitjem alkohola, obstaja velika verjetnost, da bo stanje napredovalo v cirozo ali jetrno odpoved. Alkoholna ciroza je najhujša oblika jetrne bolezni, ki je tudi med abstinenco ireverzibilna ter lahko vodi v jetrno dekompenzacijo in smrt. Ciroza je kronična bolezen pri kateri se tkivo jeter nadomešča z vezivnim tkivom. Ciroza pomeni zabrazgotinjenje jeter ko mrtve hepatocite nadomesti vezivo (6).

## 1.2 OBLIKE TRANSFERINA

### 1.2.1 Transferin

Transferin (Tf) je serumska beljakovina, ki ima pomembno vlogo pri prenašanju železa. Po svojih značilnostih je glikoprotein z molekularno maso 80 000. Njegova najpomembnejša funkcija je v prenašanju železa. Sestavljen je iz ene same polipeptidne verige s 679 aminokisljinami, na katero sta na N-koncu na mestih 413 in 611 vpeti dve oligosaharidni verigi z molekularno maso 4400. Ogljikohidratna veriga vsebuje N-acetilglukozamin, manozo, galaktozo in sialinsko kislino (slika 3). Molekula Tf je strukturno urejena v dve globularni domeni (N-terminalna domena, katero predstavljajo aminokisljine od 1 do 336 in C-terminalna domena, katero predstavljajo aminokisljine od 337 do 679), ki neodvisno druga od druge vežeta po en ion železa.



**Slika 3:** Shematski prikaz molekule Tf z dvema oligosaharidnima verigama in dvema vezavnima mestoma za Fe<sup>3+</sup>.

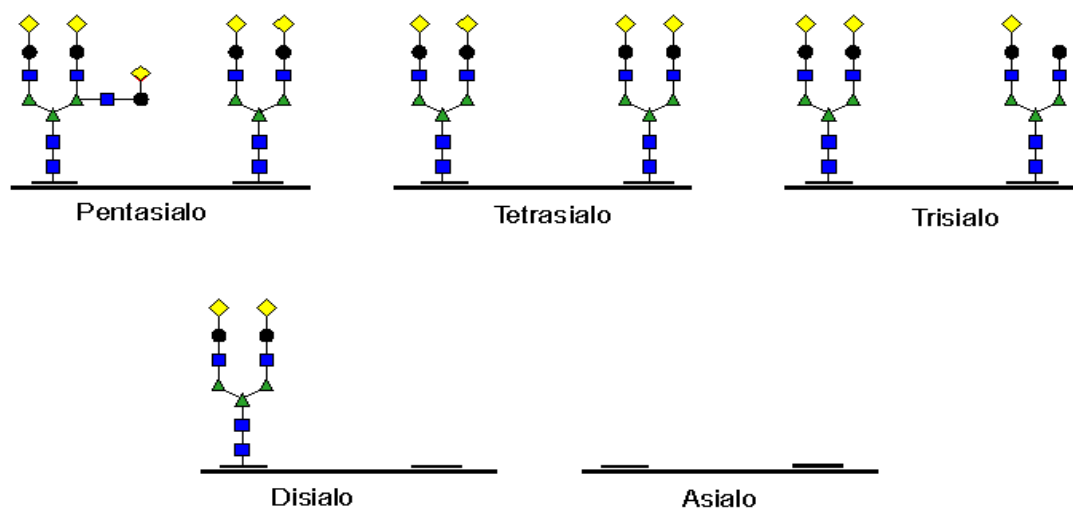
Vsaka N-glikanska veriga se konča z negativno nabito molekulo sialinske kisline, ki je edini negativno nabiti ogljikohidrat v Tf. N-glikanski verigi se razlikujeta v stopnji

razvejanosti (di-, tri- in tetraantenska struktura). Tf je v serumu v velikih koncentracijah, pojavlja pa se tudi v drugih bioloških tekočinah. Večinoma se sintetizira v jetrih (v hepatocitih) in v manjši meri v retikuloendoteltnem sistemu oziroma v endokrinih žlezah, kot so moda in jajčniki. Tf se po glikozilaciji izloča v plazmo z eksocitozo, kjer potem opravlja svojo funkcijo. Njegova razpolovna doba je približno 15 dni. Pri katabolizmu Tf v normalnih pogojih se najprej odstrani sialinska kislina, asialoglikoproteinski receptorji jetrnih parenhimskih celic pa nato odstranijo desialinizirane proteinske verige. Tf ni homogena molekula, ampak izkazuje mikroheterogenost. Zaradi tega se, glede na stopnjo sialiniziranosti, lahko v serumu pojavijo različne izooblike Tf (7,8).

### 1.2.2 Izooblike transferina

Lahko se pojavi 9 različnih izooblik: od oblik brez sialinskih kislin (asialo-Tf) do oblik z osmimi sialinskimi kislinami (oktasialo-Tf) (slika 4).

Prevladujoča izooblika je tetrasialo-Tf, ki predstavlja 64 do 80 % celotnega Tf. Heptasialo-Tf predstavlja manj kot 1,5 %, heksasialo-Tf od 1 do 3 %, pentasialo-Tf od 12 do 18 %, trisialo-Tf od 4,5 do 9 % in disialo-Tf manj kot 2,5 % celotnega Tf. Izooblike asialo-, monosialo- in oktasialo-Tf so pri zdravih ljudeh, abstinentih in ljudeh, ki uživajo zmerne količine alkoholnih pijač, prisotne le v sledih manj kot 0,5% asialo-Tf in manj kot 0,9% monosialo Tf (7). Pri ljudeh, ki pa uživajo prekomerne količine alkohola pa so izooblike, ki so drugače le v sledih, prisotne v višjih deležih.



**Slika 4:** Izooblike transferina glede na sializiranost.

Število sialinskih kislin in položaj le teh določa izoobliko Tf in njegovo izoelektrično točko (pI). Z vsako sialinsko kislino vezano na N-glikansko verigo, se izoelektrična točka zniža za 0,1 pH enote. Vsaka molekula Tf lahko veže največ dva iona železa, v obliki  $\text{Fe}^{3+}$ . Normalno je z železom nasičenega okoli 30 % celokupnega serumskega Tf. Nasičenost je odvisna od zalog železa v organizmu. V primeru pomanjkanja železa se zasičenost Tf zmanjša in v krvi so prisotne večje količine Tf z vezanim samo enim ionom železa oziroma brez vezanega iona železa (apotransferin). V primeru hemokromatoze (kopičenje železa v tkivih) pa se zasičenost Tf poveča in v krvi so večinoma prisotne oblike Tf z vezanima dvema ionoma železa. Tudi železo vpliva na izoelektrično točko transferina. Vsak na transferin vezan železov ion zniža izoelektrično točko za 0,2 pH enoti. Različne izoelektrične točke pri popolni nasičenosti z železom pomagajo pri ločitvi izooblik transferina glede na samo stopnjo sialiniziranosti (7).

Najpogostejše transferinske izooblike imajo naslednje pI (9,10):

- pentasialotransferin pI= 5,2
- tetrasialotransferin pI= 5,4
- trisialotransferin pI= 5,6
- disialotransferin pI= 5,7
- monosialotransferin pI=5,8
- asialotransferin pI= 5,9

Ker je Tf najpomembnejši prenašalec ionov železa v telesu pri ljudeh, lahko na izooblike Tf vplivajo tudi fiziološki faktorji, ki imajo vpliv na presnovo samega železa. Na presnovo lahko vpliva spremenjeno hormonsko stanje, ki se pri ženskah pojavi pri nosečnosti, ob uporabi kontraceptivov in v primeru prehoda iz menstrualnega cikla v menopavzo. Vsebnost Tf v plazmi je uravnavana z razpoložljivostjo železa. Pri pomanjkanju železa se nivo Tf v plazmi poviša (7).

### **1.2.3 CDT**

Pri čezmernem uživanju alkoholnih pijač se začne struktura Tf spreminjati, tako da začnejo nastajati oblike disialo-, monosialo- in asialo-Tf. CDT ali transferin z zmanjšano

vsebnostjo ogljikovih hidratov (carbohydrate deficient transferrin) je torej definiran kot delež disialo-, monosialo- in asialotransferina glede na celotno količino Tf. Najpogostejša oblika je diasialo-Tf.

Pri zdravih ljudeh je manj kot 1%, medtem ko se pri čezmernem uživanju alkohola delež lahko zveča tudi deset do petnajstkrat. Asialo-Tf se pojavi šele pri uživanju izjemoma velikih količin alkohola. CDT- izooblike transferina nastanejo zaradi škodljivega učinka etanola oziroma njihovih metabolitov v telesu (predvsem acetaldehida). Aktivnost glikoziltransferaze v hepatocitih se zmanjša in to moti normalno glikozilacijo beljakovinskih molekul, ki nastajajo v jeternih celicah. Zato se ob povečanem vnosu etanola pojavljajo nepopolnoma oziroma nizko sializirane izooblike Tf (9,11,12).

O CDT-ju so prvič poročali že leta 1976, ko so njegovo prisotnost dokazali v cerebrospinalni tekočini in v serumu alkoholikov. Od takrat naprej je bil predmet mnogih raziskav in je danes uporaben kot zanesljiv, objektivni, biokemični označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač. CDT torej predstavljajo izooblike transferina z izoelektrično točko  $\geq 5,7$ . Po razvoju imunometričnih metod za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov so v CDT vključevali tudi 50 % trisialo-Tf. Ker pa so raziskave pokazale, da ni korelacije med škodljivim vnosom alkoholnih pijač in trisialo-Tf, da se trisialo-Tf pojavlja v enakih koncentracijah pri povišanih in znižanih vrednostih CDT in da nima diagnostične vrednosti pri škodljivi rabi alkoholnih pijač, se trisialo-Tf od leta 2000 ne določa več v okviru CDT. Povišana vrednost CDT v serumu potrди sum prekomernega oziroma škodljivega uživanja alkoholnih pijač. Dnevno uživanje 50 do 80 g etanola 14 dni zaporedoma že lahko povzroči povišano serumsko vrednost CDT. Vrednost Tf z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov se normalizira po treh do štirih tednih abstinence, odvisno od stopnje povišanja. CDT trenutno velja za najbolj specifičen biokemični označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač. V različnih virih so navedene različne vrednosti njegove diagnostične občutljivosti in diagnostične specifičnosti. Odvisne so od preiskovane populacije (abstinenti, zmerni pivci, ljudje, ki tvegano pijejo alkoholne pijače, ljudje, ki uživajo prekomerne-škodljive količine alkoholnih pijač, ženska populacija, moška populacija...) in od uporabljene metode določevanja CDT. Primarno se CDT uporablja kot biokemični označevalec škodljive rabe alkoholnih pijač, njegove vrednosti pa se lahko spremenijo tudi pri določenih bolezenskih stanjih in s tem znižajo njegovo diagnostično specifičnost (8,9,10,11).



### **1.2.3.1 Kdaj pride do lažno zvišanih vrednosti?**

Lažno pozitivni rezultati CDT so lahko prisotni pri bolnikih z napredovalo jetrno boleznijo, npr.: pri bolnikih s primarno biliarno cirozo, kroničnim virusnim hepatitisom, hepatocelularnim karcinomom in pri bolnikih, ki imajo z zdravili povzročeno jetrno insuficienco. Vrednosti CDT so povišane tudi pri redkih genetskih variantah transferina (D varianta), CDG sindromu (Congenital Disorder of Glycosylation syndrome, prirojena motnja glikozilacije), v nosečnosti, pri uporabi estrogenov, v primeru anemije zaradi pomanjkanja železa, v primeru zmanjšanih vrednosti feritina, povišanega celokupnega Tf in pri sočasni presaditvi ledvic in trebušne slinavke. Pri zelo redki B genetski varianti Tf se lahko pojavijo lažno negativni rezultati CDT (7,11,13,14,15).

### **1.2.4 Principi določanja CDT**

Analiza CDT sodi med zahtevne analize. Vzrok temu je mikroheterogenost samega Tf, strukturne podobnosti CDT izooblik Tf z izooblikami, ki so normalno prisotne in zaradi prisotnosti CDT izooblik v zelo nizkih koncentracijah. Zato so za analizo CDT potrebne selektivne, specifične in občutljive metode. V prvi fazi analize je potrebna predpriprava vzorcev običajno z nasičenjem transferinskih molekul z železom. Popolna in stabilna nasičenost transferina z železom je temelj zanesljive analize CDT. Nepopolna nasičenost transferina z železom je lahko eden izmed vzrokov za lažno pozitivne rezultate. Osnova metod za določanje CDT je kvantifikacija ločenih izooblik transferina glede na njihov naboj in izoelektrično točko (pI od 5,2 do 5,9). Vrednosti CDT se lahko izrazijo kot absolutne vrednosti CDT (vrednosti izooblik transferina s  $pI \geq 5,7$ ), oziroma kot delež nizko sialiniziranih oblik transferina glede na celokupno koncentracijo transferina. Ker je koncentracija transferina v telesu spremenljiva; spreminja se ob določenih fizioloških in patofizioloških procesih, je bolj priporočljivo CDT izraziti kot delež (%CDT) glede na celokupno koncentracijo transferina.

CDT se običajno določa s kromatografskimi in elektroforetskimi metodami. Sprva se je CDT določal z izoelektričnim fokusiranjem (IEF), ki je do nedavnega veljalo za referenčno metodo. Nato so se po letu 1990 pojavile tudi številne druge polavtomatizirane kromatografske in elektroforezne metode za določanje CDT: tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC- high performance liquid chromatography), kapilarna elektroforeza (CE- capillary electrophoresis), nato pa je čez nekaj časa bila predstavljena

na tržišču novost in sicer reagenčni komplet za neposredno določanje CDT z nefelometrično detekcijo. Reagenčni komplet proizvajalca Siemens se uporablja za neposredno določanje CDT, brez predhodne priprave vzorca s homogenim, nefelometričnim principom (8,11,12,16).

Danes se za določanje CDT najpogosteje uporabljajo naslednje metode:

#### **1.2.4.1 Ionsko izmenjevalna kromatografija z imunoturbidimetrično detekcijo (IEC)**

Sodi med kromatografske metode, katerih temelj je porazdelitev vzorca med stacionarno in mobilno fazo. V mobilni fazi je raztopljen vzorec, katerega molekule v odvisnosti od topnosti in adsorpcije, potujejo po stacionarni fazi. Izooblike transferina se ločijo v anionsko izmenjevalnih kolonah na osnovi različnih pI po predhodnem nasičenju z železom. Izooblike imajo zaradi različnega naboja različno afiniteto do nasprotno nabitih funkcionalnih skupin stacionarne faze na katere se vežejo. V reagentu za določanje koncentracije transferina so prisotna specifična antitransferinska protitelesa, ki s transferinom tvorijo slabo topne imunske komplekse. Koncentracijo celokupnega transferina in CDT-izoblik transferina se izmerijo turbidimetrično z merjenjem prepustnosti svetlobe reakcijske zmesi, ki je zmanjšana zaradi povečane motnosti. Delež CDT (%CDT) se izračuna kot razmerje med transferinskimi izooblikami z nizko vsebnostjo ogljikovih hidratov in celokupno koncentracijo transferina. Referenčna vrednost, ki jo priporoča proizvajalec, je do 3,0 % (8).

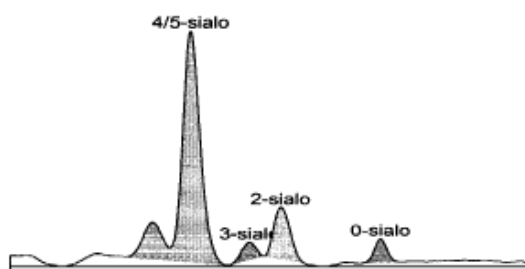
#### **1.2.4.2 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti prav tako kot IEC sodi med kromatografske metode. Glede na kemične in fizikalne interakcije z mobilno in stacionarno fazo se komponente vzorca ločijo med seboj. Reakcije so specifične in odvisne od analita, ter od sestave obeh faz. Gradientna HPLC je modifikacija klasičnega HPLC postopka pri kateri gre za stopenjsko spreminjanje elucijske moči mobilne faze. Vzorce je potrebno pred nanosom na kolono nasititi z železom in oboriti lipoproteine. Izooblike transferina se ločijo v gradientnem sistemu HPLC z anionsko izmenjevalno stacionarno fazo in pufrom različnih ionskih moči. Detekcija ločenih izooblik poteka pri valovni dolžini 460 nm, pri kateri ima specifično absorpcijski maksimum kompleks Tf-železo. Rezultat analize je

kromatogram z ločenimi frakcijami izooblik transferina: asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo-, pentasialo- in heksasialo-Tf. Vrednost %CDT se določi kot delež površine pod krivuljo posameznih CDT frakcij glede na celokupni transferin (8).

#### 1.2.4.3 Kapilarna elektroforeza (CE)

To je tehnologija, pri kateri se molekule ločijo po velikosti in naboju znotraj tanke kapilare. Ločevanje nabitih delcev poteka pri visoki napetosti, ki omogoči potovanje delcev po kapilari. Metoda temelji na delovanju dveh nasprotno usmerjenih tokov v kapilari: endosmoznega in električnega. Nabiti delci se ločijo v stekleni kapilari s SiO<sub>2</sub>, pri napetosti 9,2 kV, glede na njihovo elektroforezno gibljivost v alkalnem pufri (pH 8,8) in elektroosmozem toku pufra. Ločene izooblike Tf se zaznajo na katodnem delu kapilare pri 200 nm, kjer se nahaja detekcijska celica. Izooblike Tf so grafično prikazane kot ločene frakcije asialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo- in pentasialo-Tf (slika 5) (8,18,20,21).



**Slika 5:** Prikaz ločenih izooblik transferina na elektroferogramu pri kapilarni elektroforezi (CE).

#### 1.2.4.4 Imunonefelometrična metoda

Analiza temelji na reakciji monoklonskih protiteles, ki prepoznajo strukturo CDT izooblik Tf (metoda je specifična za disialo-Tf) ob sočasni določitvi celokupnega Tf. Rezultat analize je delež CDT, ki je zaradi sočasne določitve Tf izračunan avtomatsko. Določitev je narejena s primerjavo s standardom znane koncentracije (17,19).

## 2 NAMEN DELA

CDT ali transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (carbohydrate deficient transferrin) je definiran kot delež disialo-, monosialo- in asialotransferina glede na celotno količino Tf.

Namen diplomske naloge je, da ugotovimo skladnost rezultatov meritev deleža CDT v serumu z dvema različnima rutinskima preiskavama. Želimo uvesti nov parameter (delež CDT) v spektru preiskav v diagnostičnem laboratoriju Novo mesto, zato bomo s primerjavo rezultatov ugotavljali primernost nefelometrične metode. V serumskih vzorcih naključno izbranih preiskovancev (n=102) bomo določali delež asialo-Tf in disialo-Tf (CDT) z nefelometrično metodo proizvajalca Siemens in primerjali rezultate z rezultati, pridobljenimi s kapilarno elektroforezo (CE) francoskega proizvajalca Sebia, kar bo pomembno za potrditev uvedbe nove metode v laboratorijsko diagnostiko Splošne bolnišnice Novo mesto.

## **3 MATERIALI IN METODE**

### **3.1 PREISKOVANCI / VZORCI**

Za določanje CDT (deleža asialo-Tf in disialo-Tf) smo uporabili serumske vzorce 102 naključno izbranih preiskovancev, ki so imeli ob sistematskem pregledu naročeno preiskavo deleža CDT. Vzorci so bili najprej analizirani na Univerzitetnem Kliničnem centru Ljubljana, Inštitutu za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB), nato pa smo istim vzorcem izmerili delež CDT v Diagnostičnem laboratoriju Splošne bolnišnice Novo mesto.

Kri je bila odvzeta po standardnem postopku za vakuumski odzem, za katerega smo uporabili epruvete brez antikoagulantnih sredstev (rdeč zamašek). 30 minut po odvzemu krvi smo vzorce centrifugirali 10 minut pri centrifugalni sili 15,000 x g in s tem ločili celice od seruma. Serum je tekoča frakcija krvi brez celic in brez fibrinogena.

Primeren vzorec je humani serum hranjen največ 7 dni pri 2 - 8°C ali pa zamrznjen. Hranimo ga lahko 3 mesece pri -20°C, če je zamrznjen v 24 urah po odvzemu. Serum mora biti popolnoma koaguliran in po centrifugiranju ne sme vsebovati nobenih delcev ali sledi fibrina (17).

Vsem vzorcem smo določili CDT z dvema metodama na dveh različnih analizatorjih. Biološke vzorce, s katerimi smo rokovali, smo obravnavali kot potencialno kužne in smo zato upoštevali vsa splošna navodila za varno rokovanje s kužnim materialom in analitskim sistemom.

### **3.2 REAGENTI**

#### **3.2.1 Reagenti za delo na analizatorju BN ProSpec**

Za merjenje deleža CDT smo uporabljali tovarniško pripravljene reagente. Uporabljali smo analizni komplet N Latex CDT Kit, Code No.OPCS (17):

- N CDT Reagent 1
- N CDT Reagent 2
- N CDT Supplementary Reagent
- N CDT Standard SL

- N CDT Control SL/1
- N CDT Control SL/2

Tudi za merjenje koncentracije transferina z imunonefelometrično metodo smo uporabili reagente, standard in kontrolo firme Siemens:

- Za določitev transferina pa še analizni komplet, ki vsebuje:
- N Atiserum to Human Transferin;
- N Protein Standard SL (human);
- N/T Protein Control SL/L (human);
- N Reaction Buffer
- N Diluent.

### **3.2.2 Reagenti za delo na analizatorju Minicap CDT**

Za merjenje deleža CDT so uporabili tovarniško pripravljene reagente analiznega kompleta Capillarys CDT kit (Sebia. PN. 2008) za delo na analizatorju minicap CDT (Sebia, Francija) (18).

### **3.2.3 Oprema**

Za merjenje % CDT v serumu smo uporabili: nefelometer BN ProSpec (Siemens, Nemčija), epruvete, pipete, stojala, rokavice, kivete. Analizator BN ProSpec ima 45 mest za epruvete z vzorci. Za merjenje se uporabljajo tekoči reagenti, ki so že tovarniško pripravljene in takoj uporabni za delo. Analizator sprejema naše ukaze preko računalnika.

## **3.3 METODE**

### **3.3.1 Nefelometrično določanje CDT**

Nefelometrično meritev smo izvajali na analizatorju BN ProSpec (Siemens). Metoda je popolnoma avtomatizirana. Kalibracijo in nastavitve ustreznih pogojev analizatorja ter samo analizo smo izvedli po navodilih proizvajalca (17). Za analizo vzorcev smo uporabili reagente, standarde in kontrole firme Siemens. Reagente smo pripravili po navodilih

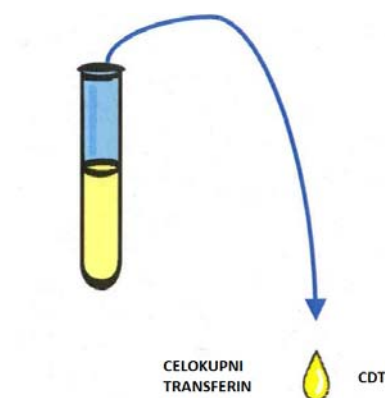
proizvajalca. Analize CDT in Tf smo izvajali sočasno. Analizator BN ProSpec (slika 6) sprejema naše ukaze preko računalnika, na katerem lahko izberemo kontrolo, proces vzdrževanja ali pa vrsto preiskave.



**Slika 6:** Analizator BN ProSpec

Vzorci v epruveh smo najprej vpisali v računalnik in jih po vrsti vstavili v krožnik. Na računalniku smo izbrali preiskavo CDT in pričeli analizo. CDT določamo direktno. Analizator izračuna %CDT z merjenjem CDT in Tf hkrati (slika 7).

#### Direktno določanje CDT



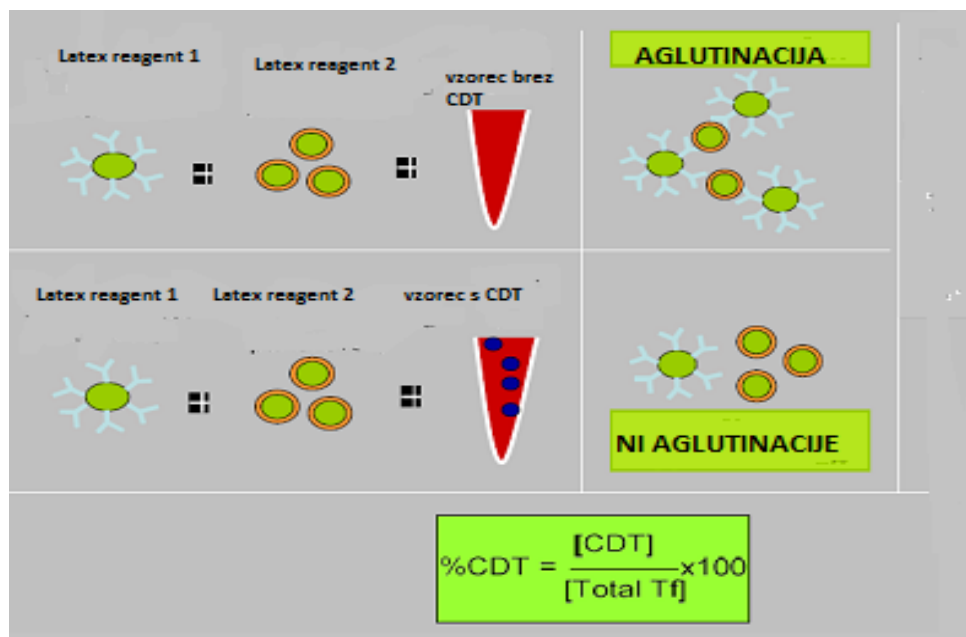
CDT protitelesa + Tf protitelesa  $\rightleftharpoons$  %CDT

$$\% \text{ CDT} = \text{CDT} / \text{transferin} * 100$$

**Slika 7 :** Direktno določanje CDT

CDT v vzorcu in CDT, ki je vezan na polistirenske delce v reagentu, tekmujeta za vezavna mesta na specifičnih monoklonskih protitelesih proti humanemu CDT, ki so prav tako vezana na polistirenske delce. V prisotnosti CDT v vzorcu, je kopičenje polistirenskih delcev majhno ali pa ga ni (ni aglutinacije polistirenskih delcev). V odsotnosti CDT v vzorcu, pa se polistirenski delci kopičijo (aglutinacija polistirenskih delcev) (slika 8). Višja kot je vsebnost CDT, nižji je signal sipane svetlobe. Če je koncentracija previsoka, analizator avtomatsko redči vzorec po protokolu. Rezultati, ki se izpišejo na ekran računalnika, so odčitani iz kalibracijske krivulje, ki je izvedena s standardom znane koncentracije (19).

Pražna vrednost (cut off) za %CDT je < 2,5%.



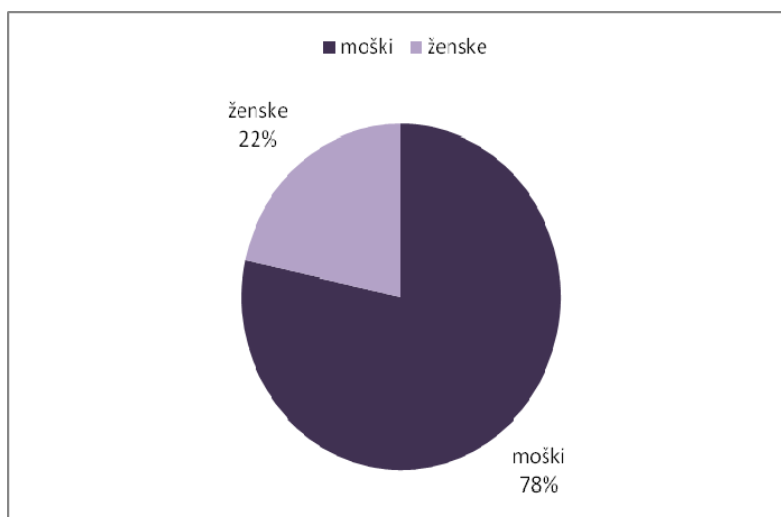
**Slika 8:** Princip reakcije za določitev CDT



## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 REZULTATI VZPOREDNIH DOLOČITEV %CDT

Pri našem delu smo obravnavali 102 serumskih vzorcev naključno izbranih preiskovancev. V obravnavani skupini je bilo 80 (78%) preiskovancev moškega spola in 22 (22%) ženskega spola (slika 9).



**Slika 9:** Delež preiskovancev po spolu

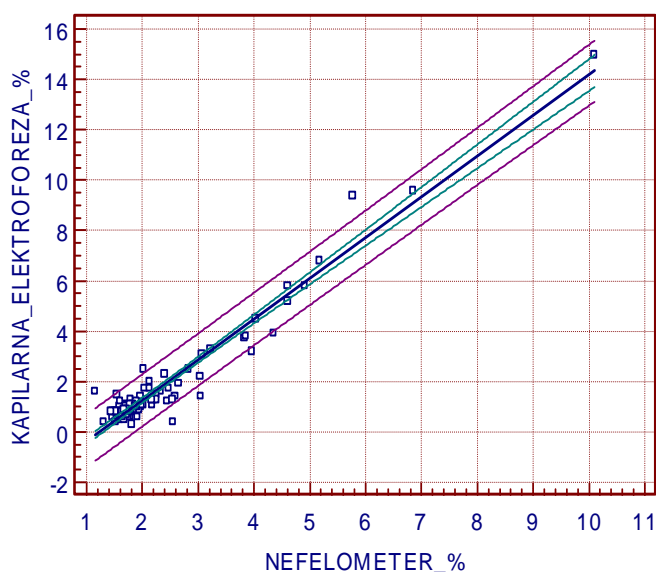
Izvedli smo analizo za delež CDT z nefelometrijo in rezultate primerjali s predhodno pridobljenimi rezultati analiz istih vzorcev v UKC Ljubljana s kapilarno elektroforezo (priloga I). Za rezultate določene z obema metodama smo izračunali aritmetično sredino, standardni odklon, minimalno in maksimalno vrednost. Rezultati na nefelometru so bili od 1,2 do 10,1% s povprečno vrednostjo 2,3% (priloga II). Rezultati kapilarne elektroforeze pa so se gibali od 0,3 do 15,0%, povprečna vrednost pa je znašala 1,7% (priloga III). Izračunali smo enačbo regresijske premice in korelacijski koeficient (slika 13). Na sliki 10 je prikazana regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 102 vzorcev, izmerjenih na analizatorju BN ProSpec in Minicap CDT.

	Pražna vrednost	Aritmetična sredina	Standarni odklon	Minimum	Maximum
Kapilarna elektroforeza	< 1,3%	1,7	2,1	0,3	15,0
Nefelometrija	< 2,5%	2,3	1,3	1,2	10,1

**Preglednica I:** Prikaz statistično obdelanih rezultatov določitev deleža CDT z obema metodama.

Analizo korelacije smo izvedli, da bi ocenili moč povezave (korelacije) med rezultati nefelometrične metode in kapilarne elektroforeze. V analizo smo vključili podatke vseh preiskovancev.

Enačba premice:  $y = -1,9606 + 1,6147 x$ .

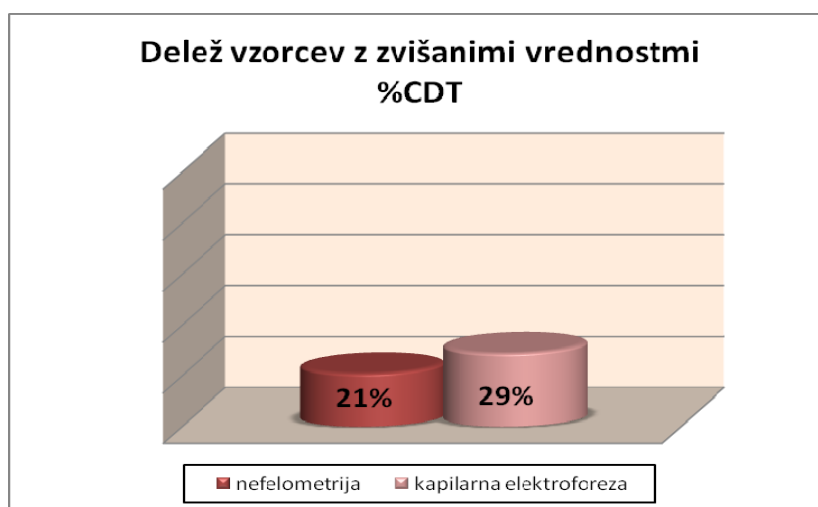


**Slika 10:** Regresijska premica in 95% napovedna vrednost ter 95% meja zaupanja parnih rezultatov za 102 vzorca, izmerjenih na analizatorju BN ProSpec in Minicap CDT.

Regresijska premica je pokazala zelo dobro korelacijo rezultatov med metodama, kar nam dokazuje zelo visok korelacijski koeficient 0,9697.

## 4.2 REZULTATI Z UPOŠTEVANJEM PRAŽNIH VREDNOSTI

Primerjali smo rezultate deležev CDT izmerjene z obema metodama, pri čemer smo bili pozorni na vzorce z zvišanim CDT. Zanimalo nas je ujemanje rezultatov na obeh analizatorjih z upoštevanjem praznih vrednosti za CE < 1,3% in za nefelometrijo < 2,5% (priloga II, III). Najprej smo upoštevali prazno vrednost za nefelometrijo in pregledali rezultate vzporednih meritev na kapilarni elektroforezi, nato pa še obratno. Ugotovili smo, da je na nefelometričnem analizatorju BN ProSpec 81 meritev pod prazno vrednostjo < 2,5% in 21 (21%) meritev nad to vrednostjo. Pri kapilarni elektroforezi pa je 72 meritev v praznem območju < 1,3% in 30 (29%) meritev nad to vrednostjo pri istih vzorcih (slika 11). Primerjava rezultatov po obeh metodah z upoštevanjem praznih vrednosti za CE < 1,3% in nefelometrijo < 2,5% je pokazala neujemanje pri enajstih rezultatih. Deset meritev, ki so bile pri kapilarni elektroforezi nad prazno vrednostjo (>1,3%), je bilo z nefelometrično metodo pod prazno vrednostjo (< 2,5%). Vseh deset rezultatov je bilo po CE v nizkem območju (od 1,3% - 1,6%), za katerega se priporoča ponovna analiza. Pri enem vzorcu je bila razlika v rezultatu na drugi decimalki, ki je meritve v CE ne upoštevajo (2,54% napram 2,5%).



**Slika 11:** Deleži rezultatov z zvišanimi vrednostmi deleža CDT, določenimi vzporedno iz istih vzorcev z nefelometrijo in kapilarno elektroforezo.

Ker so CDT izooblike normalno prisotne v telesu v zelo nizkih koncentracijah in so strukturno zelo podobne ostalim prisotnim izooblikam, lahko vplivajo na rezultat analize, kot tudi nekateri predanalitski dejavniki. Najpomembnejša med njimi sta čas in temperatura shranjevanja vzorcev, zato so za analizo CDT najbolj primerni sveže odvzeti

vzorci. Stabilnost Tf v vzorcih je izrednega pomena za analizo CDT in je zagotovljena s shranjevanjem vzorcev seruma 48 ur pri 20-25 °C, 7 dni pri +2 do +8 °C ali 3 mesece pri -20 °C. Vzorcem, ki so shranjeni predolgo časa na neustrezni temperaturi, ne moremo določiti verodostojnih rezultatov. Vrednosti deleža CDT v takšnih vzorcih bi bile lažno zvišane zaradi razgradnje stranske ogljikohidratne verige in razgradnje proteinov (11,17).

Ko so v vzorcu prisotne moteče snovi, je pravilna interpretacija rezultatov otežena, kljub pravilnim analiznim rezultatom. Dejavniki, ki onemogočajo pravilno interpretacijo rezultatov so:

- Hemoglobin in fibrinogen: Preiskavo moti močna hemoliza vzorca ter prisotnost antikoagulantov (citrat, EDTA), ki onemogočata vezavo železa na transferin, zato analiza v plazmi ni možna;
- Star ali nepravilno shranjen vzorec seruma;
- Nekatere genske variante Tf;
- Huda okvara jeter (22).

Pri zdravih ljudeh in pri ljudeh, ki zmerno uživajo alkoholne pijače, prevladuje tetrasialo-Tf, ki predstavlja 80% celotnega serumskega Tf. Diasialo-Tf je običajno manj kot 1% celotnega transferina. Pri prekomernem uživanju alkohola ta odstotek naraste tudi za 10 – 15 krat. Pojavi se lahko tudi asialo-Tf. Izooblike Tf disialo-, monosialo- in asialotransferin predstavljajo transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov (CDT) (8,9).

Dnevno uživanje 50 – 80 g etanola na dan 14 dni zaporedoma vodi v zvišanje vrednosti CDT. Vrednosti CDT padejo oziroma se normalizirajo po 14 dneh abstinence(13,14). CDT je v literaturi označen kot najbolj specifičen označevalec za odkrivanje in spremljanje kronične uporabe alkohola. V zadnjih letih je CDT v središču pozornosti zaradi relativno visoke diagnostične specifičnosti (97%) in le nekoliko nižje diagnostične občutljivosti (93%) (9).

Testirane analize metode so avtomatizirane in so primerne za rutinsko uporabo v kliničnih laboratorijih. Danes je vedno večje povpraševanje po določanju CDT, zato morajo biti te metode hitre, zanesljive in z nizkim časom analize vzorca ter morajo omogočati sledenje in neposredno dokumentiranje rezultatov. Glede tega ima prednost popolnoma avtomatiziran

postopek določanja CDT s kapilarno elektroforezo Minicap CDT, kjer lahko analiziramo 20 vzorcev na uro, predpriprava vzorcev se izvede v analizatorju ter omogoča grafični pregled ločenih izooblik. Vrednosti deleža CDT smo določili tudi z direktno nefelometrično metodo, pri kateri vzorci prav tako ne potrebujejo nobene predhodne priprave (ni ločbe izooblik transferina v koloni). Tudi ta metoda je popolnoma avtomatizirana, paziti pa moramo na možnost napak, ki so posledica različnega pristopa in dela analitika (predanalitska in poanalitska faza dela). Pri kapilarni elektroforezi je čas analize 8 minut, pri nefelometriji pa 20 minut od vstavitve vzorca v aparat, kar je v primerjavi s polavtomatskimi metodami velika pridobitev (9,13,21,22).

Določitev CDT zagotavlja pomemben prispevek pri prepoznavanju bolnikov, ki uživajo visoke količine alkohola, pri sledenju sprememb v uživanju alkohola in spremljanju abstinence. Različne študije kažejo, da je CDT eden od specifičnih pokazateljev za prikaz večjega uživanja alkohola v daljšem časovnem obdobju.

Bolezni, ki niso inducirane zaradi alkohola, pa vseeno povzročajo zvišane vrednosti CDT vključujejo kronični aktivni hepatitis, primarno žolčno cirozo, jetrni propad in izjemno redko tudi CDG sindrom (glikoprotein z zmanjšanim deležem ogljikovih hidratov). Izračun %CDT iz CDT in transferina omogoča, da zmanjšamo vplive transferina, železa in jetrne funkcije na rezultat. Dodaten napredek pri diagnostični natančnosti lahko dosežemo s kombinacijo CDT in GGT (gama glutamiltransferazo) (12).

Genske variante so molekule transferina, ki lahko povzročijo ne samo lažno pozitiven, ampak tudi lažno negativen rezultat. Med potekom kapilarnega CDT testa, se glavni tetrasialo-Tf upošteva kot referenca in predstavlja osrednji vrh; B varianta kaže isti osrednji vrh skupaj z dodatnimi vrhovi proti anodi in D varianta kaže dodatne vrhove proti katodi. B varianta daje s kapilarno elektroforezo lažno negativne rezultate in D varianta nam daje lažno pozitivne rezultate. Podobno tudi mikro kolone CDT metode prav tako proizvajajo lažno pozitivne variante Tf tipa D. Na Siemensovo nefelometrično metodo ne vpliva prisotnost B ali D fenotipa, zaradi monoklonskih protiteles, ki ne reagirajo z transferinskimi genskimi variantami. To je močna konkurenčna prednost za novo avtomatizacijo testa CDT (23).

## 5 SKLEP

Namen naše naloge je bil ugotoviti skladnost rezultatov meritev deleža CDT z nefelometrično metodo z rezultati, predhodno pridobljenimi s kapilarno elektroforezo. V serumskih vzorcih naključno izbranih preiskovancev (n=102) smo v serumu nefelometrično določali delež CDT in primerjali rezultate s predhodnimi meritvami CDT s kapilarno elektroforezo. Ugotovili smo, da se nefelometrično pridobljeni rezultati ne razlikujejo bistveno od elektroforezno pridobljenih, saj je korelacijski koeficient  $r = 0,9697$ .

Primerjava rezultatov po obeh metodah z upoštevanjem praznih vrednosti za CE  $<1,3\%$  in nefelometrijo  $<2,5\%$  je pokazala neujemanje pri enajstih rezultatih. Deset meritev, ki so bile pri kapilarni elektroforezi nad prazno vrednostjo ( $>1,3\%$ ), je bilo z nefelometrično metodo pod prazno vrednostjo ( $< 2,5\%$ ). Vseh deset rezultatov je bilo po CE v nizkem območju (od  $1,3\% - 1,6\%$ ), za katerega se priporoča ponovna analiza. Pri enem vzorcu je bila razlika v rezultatu na drugi decimalki, ki je meritve v CE ne upoštevajo ( $2,54\%$  napram  $2,5\%$ ). Primerjava rezultatov CDT je potrdila ustreznost uvedbe in uporabe nefelometrične metode v rutinsko delo.

## 6 LITERATURA

1. Williams A, Brewer D, Smith T, Jackson A, Payne F, Sahota P. The human Body. London, Dorling Kindersley Limited 1995; 57 - 66
2. Štiblar Martinčič M, Cor A, Cvetko E, Marš T. Anatomija, histologija, fiziologija, Ljubljana, Medicinska fakulteta, 2007;
3. Burnie D. Leksikon človeškega telesa. Ljubljana, Mladinska knjiga, 1999; 117 - 123
4. Pocajt M, Širca A. Anatomija in fiziologija za medicinske šole. Ljubljana. DZS 1997, 99 – 105
5. Šeruga M, Lainščak J. Dieta pri bolezni jeter, žolča in vnetju trebušne slinavke. Ljubljana, Domus 1998; 10 – 17
6. Štepec S. Alkoholna jetrna bolezen. v: Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D. Interna medicina, tretja izdaja, Založba Littera Picta, Ljubljana, 2005; 589-592
7. Kumar Das S, Vasudevan D-M. Should we use carbohydrate deficient transferrin as a marker for alcohol abusers. Indian Journal of Clinical Biochemistry, 2004; 19 (2): 36-44
8. Finderle P, Prezelj M. Primerjava metod za določanje transferina z zmanjšano vsebnostjo ogljikovih hidratov. Farmaceutski vestnik 2008; 59: 311-317
9. Kravos M, Malešič I. Transferin z zmanjšanim deležem ogljikovih hidratov (CDT) kot označevalec sindroma odvisnosti od alkohola. Zdravstveni Vestnik 2008; 189-198
10. Jeppsson O-J. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in: Thomas L. Clinical laboratory diagnostics: use and assessment of clinical laboratory results 1.ed, Frankfurt/Main: TH Books-Verl.-Ges., 1998; 658-662

11. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation. Clin Chem 2001; 47(1): 13-27
12. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. Clin Chem 1991; 37: 2029-2037
13. Srokovno srečanje Dade Behring. A specific marker for detection and monitoring of high alcohol consumption CDT. Marburg Nemčija, Julij 2005
14. Delanghe J, Helansder A, Weilders J. Development and multicenter evolution of the N Latex CDT direct immunonephelometric assay for serum Carbohydrate-Deficient transferrin. Clin Chem 2007. 53: 1115-1121
15. Prezelj M, Zorec-Karlovšek M. Transferin z zmanjšano vsebnostjo ogljikohidratov v diagnostiki škodljive rabe alkohola. Farmaceutski vsetnik 2002; 53: 41-49
16. 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, 96-109
17. N Latex CDT kit; izdaja april 2006
18. Navodila proizvajalca Cappilarys CDT. Sebia, referenca 2208, 2005
19. Standardni operativni postopek CDT. Diagnostični laboratorij Splošne bolnišnice Novo mesto; 2009
20. <http://www.bionuclear.com/downloads/FinalMinicapGB.pdf>; september 2010
21. [http://www.sebia-usa.com/products/cappilarys CDT.html](http://www.sebia-usa.com/products/cappilarys%20CDT.html); avgust 2010
22. [http://kclj.si/kikkb/preiskave/cdt\\_01\\_03\\_2006.pdf](http://kclj.si/kikkb/preiskave/cdt_01_03_2006.pdf); avgust 2010
23. Bean P. Evolution of carbohydrate-deficient transferrin testing: Tehnologics, diagnostic performance and benefits. Perspectives 2008; 20-24



## PRILOGA

*Priloga I: Rezultati vzporednih določitve deleža CDT v serumu na dveh različnih analizatorjih z dvema različnima metodama.*

ZAPOREDNA ŠTEVILKA	BN ProSpec - Nefelometrija	Minicap CDT – Kapilarna elektroforeza
1	1,74	1
2	1,69	1,1
3	1,62	0,6
4	1,61	0,8
5	1,65	1
6	1,64	0,8
7	4,61	5,8
8	2,04	1,6
9	10,1	15
10	1,65	0,9
11	1,54	0,5
12	1,67	1
13	1,63	1
14	1,58	0,8
15	1,46	0,6
16	3,06	3,1
17	2,47	1,6
18	2,01	1,1
19	2,84	2,5
20	2,18	1,1
21	1,71	0,8
22	2,02	2,5
23	1,65	0,6
24	1,31	0,4
25	1,63	0,9
26	4,91	5,8
27	2,34	1,6
28	3,03	2,2
29	4,61	5,2
30	1,76	1
31	2,44	1,2
32	2,2	1,3
33	1,96	1
34	1,71	0,7

35	4,03	4,5
36	1,79	0,6
37	1,54	0,5
38	1,77	1
39	3,22	3,3
40	1,76	0,6
41	1,75	1
42	2,25	1,5
43	1,92	0,6
44	1,6	0,8
45	1,8	0,8
46	3,05	1,4
47	1,7	0,9
48	1,78	0,9
49	1,61	0,5
50	1,66	0,5
51	3,82	3,7
52	1,97	1,3
53	1,55	0,8
54	1,93	1
55	1,73	0,7
56	1,47	0,8
57	1,8	0,3
58	1,6	0,8
59	2,59	1,4
60	1,77	1
61	1,79	0,8
62	1,78	0,9
63	1,9	1,1
64	1,79	1,3
65	1,97	1,4
66	1,7	1
67	1,88	1,2
68	2,13	1,7
69	4,36	3,9
70	1,9	0,9
71	2,13	2
72	2,39	2,3
73	1,82	1,1
74	2,25	1,3
75	1,94	0,9
76	1,64	0,8
77	1,52	0,4
78	1,78	0,9

79	1,91	1
80	1,78	1,1
81	1,59	1
82	1,57	0,8
83	2,16	1,3
84	1,15	1,6
85	1,54	1,5
86	2,56	0,4
87	5,17	6,8
88	1,52	0,8
89	1,6	1,2
90	6,86	9,6
91	2,54	1,3
92	3,96	3,2
93	1,73	0,9
94	1,87	1
95	1,63	0,8
96	1,67	0,9
97	2,65	1,9
98	1,64	0,6
99	2	1,1
100	5,77	9,4
101	3,86	3,8
102	1,43	0,8
n=102	2,3 ± 1,3	1,7 ± 2,1

**Priloga II:** Primerjava rezultatov, ki so višji od praznih vrednosti (cut off) <2,5%) za nefelometrijo.

Zaporedna številka	BN ProSpec Nefelometrija %	– Minicap CDT - Kapilarna elektroforeza %
1	4,61	5,8
2	10,1	15
3	3,06	3,1
4	2,84	2,5
5	4,91	5,8
6	3,03	2,2
7	4,61	5,2
8	4,03	4,5
9	3,22	3,3
10	3,05	1,4
11	3,82	3,7
12	2,59	1,4
13	4,36	3,9
14	2,56	0,4
15	5,17	6,8
16	6,86	9,6
17	2,54	1,3
18	3,96	3,2
19	2,65	1,9
20	5,77	9,4
21	3,86	3,8

**Priloga III:** Primerjava rezultatov, ki so višji od praznih vrednosti (cut off <1,3%) za kapilarno elektroforezo.

Zaporedna številka	Minicap CDT – Kapilarna elektroforeza %	BN ProSpec – Nefelometrija %
1	5,8	4,61
2	1,6	2,04
3	15	10,01
4	3,1	3,06
5	1,6	2,47
6	2,5	2,84
7	2,5	2,02
8	5,8	4,91
9	1,6	2,34
10	2,2	3,03
11	5,2	4,61
12	4,5	4,03
13	3,3	3,22
14	1,5	2,25
15	1,4	3,05
16	3,7	3,82
17	1,4	2,59
18	1,4	1,97
19	1,6	2,13
20	3,9	4,36
21	2	2,13
22	2,3	2,39
23	1,6	1,15
24	1,5	1,54
25	6,8	5,17
26	9,6	6,86
27	3,2	3,96
28	1,9	2,65
29	9,4	5,77
30	3,8	3,86