

Richtlijn van de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie
en Laboratoriumgeneeskunde

Geschiktheid van CDT analysemethoden ten behoeve van onderzoek
naar chronisch overmatig alcohol gebruik

Korte titel: NVKC Richtlijn CDT

Op initiatief van de Nederlandse Vereniging Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde

Opgesteld door de werkgroep CDT van de NVKC

Richtlijn geaccordeerd door voorzitter NVKC dd 15 oktober 2008
Richtlijn geactualiseerd 20 december 2012

Colofon

Intentieverklaring bij deze Richtlijn

Deze richtlijn is de Nederlandse leidraad voor het meten van CDT, zoals in het kader van CBR keuringen gevraagd wordt. Richtlijnen geven aan wat binnen de beroepsgroep van professionals als 'state of the art' geldt, en waar zonder goede onderbouwing niet van afgeweken mag worden. Deze richtlijn is gebaseerd op wetenschappelijke literatuur en inzichten van experts en wordt gedragen door de NVKC.

Samenstelling van de NVKC werkgroep CDT anno december 2012

dr. ir. JPM Wielders, klinisch chemicus te Amersfoort, voorzitter
drs. FJM Bergkamp, klinisch chemicus te Haarlem
dr. Ir. SAJ Coolen, klinisch chemicus te Delft
dr. FPL van der Dijs, klinisch chemicus te Delft
dr. RMJ Hoedemakers, klinisch chemicus te 's Hertogenbosch
dr. E. Sanders, klinisch chemicus te Bergen op Zoom

Correspondentie: jpm.wielders@meandermc.nl

© NVKC, Utrecht 15 oktober 2008 / 20 december 2012

Inhoudsopgave

Samenvatting van de richtlijn

- 1) Algemene inleiding
- 2) Definities
- 3) Werkwijze en eisen
- 4) Bevindingen
- 5) Discussie en nadere toelichting
- 6) Conclusies

Bijlagen

- A1) Overige eisen m.b.t. CDT analyses voor het CBR
- A2) Tabel methodekarakteristieken
- A3) Berekening van kritisch verschil en de afkapgrens voor %CDT en %DST
- A4) Literatuur

Samenvatting

In 2008 moest een opvolger aangewezen worden voor de tot dan gehanteerde Axis-Shield methode voor de bepaling van %CDT in het kader van CBR keuringen door psychiaters. De werkgroep CDT van de NVKC heeft eisen opgesteld waaraan methoden moeten voldoen. De werkgroep is na inventarisatie van beschikbare methoden en toetsing aan de eisen tot een selectie van methoden gekomen, die geschikt is voor dit doel.

Na wetenschappelijke toetsing heeft de NVKC in oktober 2008 de voordracht van de werkgroep CDT overgenomen en de volgende methoden geschikt verklaard: de nefelometrische N-Latex CDT van Siemens, de ClinRep CDT methode van RECIPE (een HPLC methode) en de CEofix CDT methode van Analis (een CE methode). Als referentie methode wordt de HPLC methode volgens Helander en Jeppsson benoemd, zoals gepubliceerd in 2003.

In 2011 is de NVKC Richtlijn CDT integraal opgenomen in de richtlijn van de Nederlandse Vereniging voor Psychiatrie over CBR keuringen. Anno 2012 zijn aanvullende gegevens beschikbaar voor de Capillarys CDT methode van Sebia (een CE methode) en de %CDT HPLC methode van Bio-Rad. Op basis daarvan zijn beide laatste methoden met ingang van 20 december 2012 eveneens geschikt bevonden voor CBR keuringen.

Voor de bepaling van CDT met een scheidingsmethode (HPLC of CE) is een nieuwe eenheid geïntroduceerd: %DST dit is de verhouding van disialotransferrine t.o.v. transferrine. Voor de oude Axis methode en voor de immunochemische N-Latex methode wordt als eenheid gebruikt %CDT, dit is de verhouding CDT t.o.v. transferrine.

Referentiegebieden worden vastgesteld voor alle geschikte methoden, evenals het zogenaamde kritische verschil. De som van de bovengrens plus het kritische verschil levert het zogenaamde afkappunt. Bij de overschrijding van dit afkappunt kan met 95% zekerheid worden vastgesteld dat deze CDT uitslag buiten het referentie gebied valt.

Voor de reeds in 2008 goedgekeurde methoden zijn bovengrenzen en afkappunten herberekend, en waar nodig bijgesteld.

1 Algemene inleiding

De diagnose van “overmatig en riskant alcoholgebruik” (ORAG) is moeilijk te stellen, omdat vele personen overmatig alcoholgebruik ontkennen of relativeren, en er geen diagnostische parameter bestaat, die zowel met hoge sensitiviteit als specificiteit wijst op ORAG. Zowel vanuit medisch als vanuit maatschappelijk oogpunt is er behoefte aan tijdige opsporing en juiste beoordeling van ORAG. Een voorbeeld hiervan is de beoordeling van de rijgeschiktheid van een persoon door het CBR (Wegenverkeerswet art. 13 I). Zo wordt in het kader van de vorderingsprocedure van het rijbewijs al vele jaren laboratoriumonderzoek gebruikt als onderdeel van een psychiatrisch onderzoek. In dit pakket laboratoriumonderzoek vormt carbohydraat deficiënt transferrine (CDT) de parameter met de hoogste diagnostische nauwkeurigheid

In 2002 is op verzoek van het Centraal Bureau Rijvaardigheidsbewijzen (CBR) een commissie van laboratorium deskundigen samengesteld, die het CBR kon adviseren over de bepaling en interpretatie van laboratoriumparameters bij ORAG. Teneinde een onafhankelijk advies te kunnen garanderen is dit zogenaamde Deskundigen panel in 2008 met instemming van alle betrokkenen (NVKC, CBR, NVvP overgegaan in de werkgroep CDT van de NVKC.

Vanaf circa 2000 tot eind 2008 is voor CBR keuringen bij onderzoek naar alcoholgebruik bij 'vordering' en 'eigen verklaring' procedures (ref 1) de CDT methode van de firma Axis-Shield gebruikt. Daarnaast wordt zonodig de door de HPLC methode van Jeppson en Helander (ref 2) gebruikt bij confirmatie onderzoek. Anno 2008 is de aanwijzing van alternatieven voor de Axis-Shield methode noodzakelijk, zowel op basis van nieuwe inzichten, als ook door het van de markt verdwijnen van de Axis-Shield methode. De voorliggende NVKC Richtlijn CDT voorziet daarin en benoemt in 2008 een drietal commercieel verkrijgbare methoden als geschikt voor dit doel.

De werkwijze van de CDT werkgroep en de NVKC Richtlijn CDT is in 2008 getoetst door de wetenschapscommissie van de NVKC, het commentaar is verwerkt en de uiteindelijke versie is geaccordeerd door de commissie Kwaliteit en Richtlijnen en tenslotte bekrachtigd door het NVKC bestuur op 15 oktober 2008.

In 2011 is deze NVKC Richtlijn CDT integraal overgenomen in de NVvP Richtlijn Diagnostiek van stoornissen in het gebruik van alcohol in het kader van CBR-keuringen (kortweg aangeduid als NVvP Richtlijn CBR keuringen. (ref 3)

Voor enkele nieuwe methoden zijn de karakteristieken en aanvullende gegevens in 2012 getoetst aan de in 2008 vastgelegde eisen en geschikt bevonden. Daardoor wordt in de “actualisatie 2012” het aantal goedgekeurde methoden in 2012 uitgebreid tot vijf.

2 Definities

Afkappunt

Het afkappunt, zoals gebruikt in deze richtlijn, is de getalsmatige uitslag, waarboven met 95% zekerheid gesteld mag worden dat de betrokken uitslag niet bij de normale verdeling behoort. Het afkappunt wordt berekend door optellen van de bovengrens van het referentiegebied plus het kritisch verschil. Nadere informatie in paragraaf 5 en bijlage A3

Calibrator

Een door een bevoegd orgaan gecertificeerd referentiemateriaal, geschikt voor ijking.

CDT

Carbohydraat Deficiënt Transferrine, een biomarker voor overmatig alcoholgebruik. CDT is een speciale vorm van het ijzertransporterend eiwit transferrine, waar ten gevolge van alcohol gebruik minder koolhydraatketens aan gebonden zijn.

CE

Capillaire elektroforese, een analysetechniek waarmee een mengsel in fracties gescheiden wordt en vervolgens de componenten kwantitatief bepaald kunnen worden.

Confirmatie onderzoek

Onderzoek van een monster met behulp van de referentiemethode, ter bevestiging of ter correctie van eerder onderzoek op hetzelfde (correct bewaarde) monster met een andere, onafhankelijke methode. Bij voorkeur door een ander laboratorium uitgevoerd. Ter vermijding van begripsverwarring wordt het gebruik van de term contra-expertise ontraden, aangezien dit ook herhaald onderzoek kan betekenen met de oorspronkelijke methode.

EQUALIS, INSTAND, GTFCH

Organisatie die externe kwaliteit controle onderzoeken voor de CDT-bepaling uitvoeren.

HPLC

High Performance Liquid Chromatography, een analyse techniek waarmee een mengsel in fracties gescheiden wordt, zodat vervolgens de componenten kwantitatief bepaald kunnen worden.

Herhaald onderzoek

Onderzoek van een monster met dezelfde methode als voorheen, teneinde een toevallige fout in de analyse op te kunnen sporen. Binnen een meetsessie: een duplo, anders een hernieuwd onderzoek aan hetzelfde monster. Onder herhaald onderzoek wordt niet verstaan een onderzoek op een ander monster van diezelfde persoon.

Kritisch verschil (t.o.v. bovengrens normaal)

Het verschil tussen een analyseresultaat en de bovengrens van normaal, dat minimaal vereist is om met 95 procent zekerheid vast te kunnen stellen dat dit verschil niet veroorzaakt kan zijn door de normale biologische en analytische variaties. Het kritisch verschil is methode afhankelijk en wordt berekend uit de biologische variatie en de inter-laboratorium variatie (zie bijlage A3)

ORAG

Overmatig en Riskant Alcohol Gebruik, hieronder verstaat de WHO/ISBRA de chronische inname van minimaal 60 g alcohol/dag voor mannen en minimaal 40 g alcohol/dag voor vrouwen. Zie verder ref 3.

Routinemethode voor CDT

Een eenduidig gedefinieerde en van een CE markering voorziene analysemethode voor CDT, welke voldoet aan de eisen die gesteld werden door de NVKC werkgroep CDT.

Referentiemethode voor CDT

De door Helander/Husa/Jeppson in 2003 beschreven HPLC methode voor CDT, uitgevoerd door een referentielaboratorium, kortweg ook als Helander's HPLC aangeduid (ref. 2). De referentiemethode moet gezien worden als een analytische 'gouden standaard', maar gebruik van deze uitdrukking wordt niet aanbevolen om begripsverwarring te voorkomen.

Referentiegebied

Binnen het referentiegebied (het bereik tussen de bovengrens en ondergrens van "normaal"), valt de centrale 95% van de analyse resultaten, verkregen bij onderzoek van een geselecteerde "normale" gezonde bevolkingsgroep. Het referentiegebied wordt ook als normaal(waarden) gebied aangeduid.

Rapportage en eenheden.

Bij HPLC methoden en CE methoden wordt gerapporteerd als %DST (fractie disialotransferrine t.o.v. totaal transferrine) en bij de N-Latex methode als %CDT (fractie CDT t.o.v. totaal transferrine). Het laboratorium dient de uitslag te rapporteren met vermelding van de betreffende methode en het daarvoor vastgestelde referentiegebied, conform tabel 3 van deze richtlijn.

Integratiemethode

Voor HPLC en CE methoden worden de verhoudingen van de diverse transferrine isovormen bepaald door integratie van piekoppervlakte. Voor HPLC is een basislijn integratie vereist, maar CE werkt beter met een valley to valley integratie. Alle fracties vanaf asialo- t/m pentasialo transferrine dienen meegenomen te worden in de noemer bij de berekening van het %DST.

Uitslag

Het resultaat van de meting van CDT, weergegeven als numerieke waarde plus bijbehorende eenheid.

3 Werkwijze CDT werkgroep en eisen gesteld aan methode en laboratorium

De werkgroep CDT van de NVKC heeft een aantal eisen opgesteld waaraan naar haar oordeel een analysemethode voor CDT t.b.v. CBR-keuringen moet voldoen, deze zijn weergegeven in tabel 1. Aan alle betrokken diagnostica firma's is gevraagd om via onderzoeksresultaten en peer reviewed literatuur aan te tonen dat hun product voldoet aan de gestelde eisen.

Tabel 1: NVKC eisen gesteld aan de CDT methode

- a) De opzet en de validatie moet duidelijk beschreven zijn in een peer reviewed internationaal wetenschappelijk tijdschrift.*
 - b) De tussenlaboratoriumvariatie van de methode moet bekend zijn en mag maximaal 10% bedragen.*
 - c) De juistheid moet herleidbaar zijn naar de referentiemethode.*
 - d) Het opgegeven referentiegebied (centraal 95% gebied) moet afkomstig zijn van een voldoende breed onderzoek, waarbij een opzet volgens CLSI als richtlijn voor dit onderzoek geldt. Alternatief is een berekening volgens Bhattacharya.*
 - e) De methode mag geen fout-positieve of fout-negatieve uitslagen opleveren bij aanwezigheid van transferrinevarianten, onvolledige scheidingen bij HPLC of CE, of door interfererende proteïnen*
 - f) Resultaten van klinisch onderzoek moeten zijn beschreven in een peer reviewed internationaal wetenschappelijk tijdschrift. Een sensitiviteit > 40% bij een specificiteit > 90% wordt gevraagd.*
-

De voornaamste aanvullend eisen voor de laboratoria, opgesteld door de NVKC en door het CBR gehanteerd, zijn summier in tabel 2 opgenomen. De volledige opsomming is te vinden in bijlage A1.

Tabel 2 : NVKC eisen gesteld aan laboratoria (voor uitgebreide tabel zie bijlage A1)

- a) Zowel het uitvoerende als monsterafnemende laboratorium zijn CCKL of ISO15189 geaccrediteerd*
 - b) Onderzocht materiaal wordt tot één jaar na afname bij -20°C op het uitvoerende laboratorium bewaard, en is aldaar opvraagbaar door cliënt en/of aanvrager*
 - c) De analyse SOP is opvraagbaar door het CBR en door de NVKC werkgroep CDT*
 - d) Het uitvoerende laboratorium neemt met goed gevolg (zie bijlage A1 punt 11) deel aan de SKML of een vergelijkbaar extern QC-programma voor CDT*
 - e) Het uitvoerende laboratorium gebruikt naast controles uit de kit, minimaal één poolserum (waarde rond afkapgrens)*
 - f) De resultaten van interne en externe QC worden een jaar opgeslagen, en zijn volgens geldende juridische procedures opvraagbaar door aanvrager of CBR*
-

4 Bevindingen

De beschikbare gegevens van de diverse methoden zijn geanalyseerd en verwerkt tot de tabel “Methodekarakteristieken” in bijlage A2. Op basis van het al dan niet voldoen aan gestelde eisen (tabel 1) is door de werkgroep CDT van de NVKC in 2008 beoordeeld of de bestaande methoden als “geschikt voor CBR keuringen” moet worden geclassificeerd

Op basis van genoemde criteria concludeerde de werkgroep CDT van de NVKC dat vanaf 15 oktober 2008 naast de referentiemethode (HPLC volgens Helander) als routinemethode geschikt zijn:

de N-Latex CDT methode van Siemens

de ClinRep® CDT HPLC methode van Recipe

de CEofix® CDT CE methode van Analis

Vanzelfsprekend kan de Helander HPLC referentiemethode ook als routine methode gebruikt worden.

In 2012 zijn de kenmerken van bovenstaande methoden gecontroleerd en enkele nieuwe methoden beoordeeld. De werkgroep concludeert dat eveneens aan de criteria voldoen en daardoor vanaf 20 december 2012 als routinemethode voor het CBR geschikt zijn:

de Capillarys® CDT CE methode van Sebia

de Ready-Prep %CDT by HPLC™ methode met Agilent HPLC systeem

Ten aanzien de CE methoden van Sebia en Analis geldt de verplichting (zie tabel 1, eis e) dat monsters waarbij storingen optreden door interferentie met andere proteïnen, met een HPLC methode herhaald geanalyseerd moeten worden (ref 11).

Voor de Bio-Rad methode bestaan diverse varianten met significante verschillen in uitvoering en resultaten. Alleen goedgekeurd is de normale methode met behulp van Agilent apparatuur (en integratie methode), of via reguliere validatie bewezen equivalente apparatuur.

Ten aanzien van alle geschikte CDT methoden is het gebruik van calibratoren niet toegestaan, met uitzondering van door de IFCC goedgekeurde calibratoren.

Er wordt nadrukkelijk gewezen op het verschil tussen enerzijds de scheidingsmethoden HPLC en CE met een **rapportage eenheid %DST** en anderzijds de immunochemische methode (N-Latex CDT) met **rapportage eenheid %CDT**. Zie verder de paragraaf discussie en toelichting..

In tabel 3 wordt een overzicht gegeven van het referentiegebied per methode en de bij de methode behorende afkappunten. Meer details over de methoden zijn te vinden in bijlage A2, Methode karakteristieken.

Tabel 3 (bijgewerkt en aangevuld in 2012)

Overzicht per goedgekeurde methode van de interlaboratorium variatie rond de bovengrens, het referentie gebied of de bovengrens en het berekend afkappunt voor CBR keuringen

Methode	Methode beschrijving (literatuur)	Interlaboratorium variatiecoëfficiënt (bron)	Referentiegebied of bovengrens (bron)	Afkappunt voor CBR incl. kritisch verschil (meting in enkelvoud*)
Helander HPLC (referentie methode)	Ref 2	8,8% EQUALIS 2011	0,7 – 1,7 %DST (ref 2)	1,67 + 0,37 = 2,04%DST Afkappunt 2,0 % DST
ClinRep CDT HPLC methode (RECIPE, München)	Ref 5	9,8% INSTAND 2010	1,6 %DST **	1,61 + 0,38 = 1,99 %DST Afkappunt 2,0 % DST
Ready-Prep %CDT Agilent HPLC (Bio-Rad, München)	Ref 13	7,4% EQALIS 2011	0,5 – 1,5 % DST **	1,49 + 0,30 = 1,79 %DST Afkappunt = 1,8 % DST
CEofix CDT (Analis, Namur)	Ref 6	9 % *** ARVECON / GTFCH	1,5 %DST **	1,51 + 0,36 = 1,87%DST Afkappunt = 1,9% DST
N-Latex CDT nefelometrie (Siemens, Marburg)	Ref 4	6,6% EQUALIS 2011	2,2 %CDT (**)	2,16 + 0,41 = 2,57 %CDT Afkappunt 2,6% CDT
Capillarys CDT CE methode (Sebia, Evry)	Ref 10	6, 4% at 1.7 RfB Ringversuch	0,5 – 1,4 %DST (ref 10 **)	1,40 + 0,26 = 1,66 %DST Afkappunt 1,7 % DST

Opmerkingen bij tabel 3

* Bij de huidige methoden en interlab variatie < 10 % kan met één meting in enkelvoud volstaan worden

** Bhattacharya berekening van het centrale 95% referentiegebied zijn uitgevoerd volgens een Gauss en volgens een Gamma benadering. Gekozen is voor de gemiddelde bovengrens van beide benaderingen (zie ook bijlage A2).

*** Schatting op basis van beperkte data.

Actualisatie in tabel 3 t.o.v. 2008

De bovengrenzen van de referentiegebieden en de inter-laboratorium variatie voor de diverse methoden zijn waar mogelijk herberekend met recente gegevens. Door toevoeging van twee nieuwe geschikte methoden en genoemde herberekeningen, is het niet meer mogelijk om afkappunten te clusteren naar technieken.

Vanaf de geldigverklaring van voorliggende richtlijn per 20 december 2012 moeten de in bovenstaande tabel 3 vermelde afkappunten en bovengrenzen worden gehanteerd.

5 Discussie en nadere toelichting

Aangezien deze richtlijn geschreven is vanuit de klinische chemie, maar in de praktijk gebruikt zal worden door zowel laboratoriumspecialisten als ook keurende psychiaters, is hieronder een aantal zaken toegelicht. Aan de orde komen een toelichting van de methoden, vaststellen en gebruik van referentiewaarden en afkapgrens, en het toepassen van een kritisch verschil bij de interpretatie van de uitslag.

Historische ontwikkeling en toelichting CDT methoden

Oorspronkelijk werd de zogenaamde CDTECT methode van Pharmacia gebruikt (gebaseerd op het werk van Stibler et al uit 1986), die echter mede afhankelijk was van fluctuaties in de transferrine concentratie. De Axis-Shield CDT bepaling was een verbeterde versie van deze CDTECT, waarbij de %CDT als fractie van transferrine werd uitgedrukt. De CDT fractie werd geïsoleerd door scheiding van transferrine fracties via een ionenwisselaar kolommetje, vervolgens werd zowel het CDT als het transferrine separaat gekwantificeerd en de verhouding CDT / transferrine uitgerekend en als %CDT gerapporteerd. Voor de kwantificering van zowel CDT als transferrine waren diverse analytische principes gebruikt, uitgevoerd op een breed scala van analysers. Deze verschillende Axis-Shield methoden waren allen geïkt op de HPLC methode van Helander en Jeppsson.

Vanaf ongeveer 2000 kwamen nieuwe analysemethoden op de markt. Herkenbaar zijn drie groepen: vloeistofchromatografie (HPLC), capillaire elektroforese (CE) en directe nefelometrie gebaseerd op een specifieke immunochemische bepaling met Latex versterking. Deze nieuwere CDT methoden hebben een hogere specificiteit, (zie reviews van Arndt en Bortolotti) en een hogere precisie dan de Axis-Shield methode (bron EQUALIS enquêtes). Deze kwaliteitsverbeteringen plus het van de markt verdwijnen van de Axis-Shield methode, vormden de reden voor het aanwijzen van geschikte opvolgers voor de tot en met 2008 gebruikte en voor het CBR gehanteerde Axis-Shield methode. Bij de zogenaamde scheidingsmethoden HPLC en CE, worden de fracties (isovormen) van transferrine op basis van onder meer ladingsverschillen gescheiden, afzonderlijk in beeld gebracht en gekwantificeerd. Belangrijkste isovorm is het disialotransferrine (DST), gebaseerd op de aanbevelingen van de IFCC CDT werkgroep voor CDT standaardisatie (ref 14,15) In navolging van de Scandinaviërs wordt de ratio disialotransferrine t.o.v. transferrine als %DST gerapporteerd. De immunochemische methode N-Latex CDT (ref 4) is gebaseerd op het meten met behulp van antilichamen van transferrine vormen waarvan een of twee N-glycaan ketens afwezig zijn, aangeduid als CDT. Het CDT wordt vervolgens als ratio van het afzonderlijk gemeten transferrine uitgedrukt en als %CDT gerapporteerd.

Één of meerdere methoden voor routine analyse?

Bij de selectieprocedure voor de opvolging van de Axis-Shield CDT methode komt de vraag waarom niet is gekozen voor één methode, die slechts in een beperkt aantal daarvoor gecertificeerde laboratoria wordt uitgevoerd.

Ofschoon het gebruik van slechts één analysemethode de interpretatie voor psychiaters en CBR vereenvoudigt, wordt dit door de meerderheid van de werkgroep niet als een noodzakelijke randvoorwaarde gezien. Immers, het toestaan van meerdere daartoe gekwalificeerde methoden voorkomt een continuïteitsprobleem bij disfunctioneren van één CDT methode. Daarnaast worden internationaal voor hetzelfde medische en forensische doel de door ons getoetste methoden al meerdere jaren naast elkaar gebruikt.

In het kader van de vrije markt, is al jaren geleden gekozen voor een opzet waarbij elk geaccrediteerd laboratorium in principe CDT metingen met daartoe geschikt verklaarde methoden voor het CBR kan uitvoeren. Natuurlijk is borging van de betrouwbaarheid door het stellen van een aantal duidelijke criteria daarbij een vereiste.

De werkgroep stelt nadrukkelijk dat een goedkeuring 'voor CBR gebruik' in moet houden dat de specifieke methode gepubliceerd, gestandaardiseerd en gevalideerd is, met een verificatie in het uitvoerende laboratorium. Tevens moet er voldoende informatie over analytische spreiding (met name de interlaboratorium variatie) beschikbaar zijn, zodat de variatie tussen de laboratoria niet zal leiden tot verwarring dan wel misbruik. Verder moet de respons van de methode op aanwezigheid van

transferrine varianten en andere interferenties bekend zijn en niet het gemeten resultaat beïnvloeden, dan wel duidelijk herkenbaar zijn, zodat op een andere methode kan worden overgeschakeld. Zie tabel 1 en 2.

Indien door aanwezigheid van transferrine varianten geen betrouwbare uitslag verkregen kan worden, dan adviseert de werkgroep het monster naar een (IFCC) referentie laboratorium door te sturen voor aanvullend onderzoek en of confirmatie.

Gebruiken van referentiegebied of van beslisgrens?

Betreffende het referentiegebied is uit de literatuur bekend dat op basis van de CDT uitslag geen onderscheid kan worden gemaakt tussen volledige abstinentie en het gebruik van maximaal 20 g alcohol per dag. Als bovengrens van normaal hanteert de werkgroep de bovengrens van het centrale 95% gebied van een groep niet-drinkers ofwel het 97,5^e percentiel bij een normale verdeling, conform de IFCC definitie van een referentiegebied. De bovengrens van 'normaal' mag niet beschouwd worden als de ondergrens van ORAG, zie ook de uitleg in bijlage A3. Voor de vaststelling van een ondergrens oftewel beslisgrens voor ORAG moeten we constateren dat er geen studies voorhanden zijn, waarbij de gemiddelde CDT waarde, passend bij de ondergrens van ORAG voor de diverse methoden is vastgelegd. Daarom is gekozen voor het gebruik van het afkappunt als beslisgrens, waarbij voor één enkel individu beoordeeld wordt of een incidentele enkelvoudige meting in een geaccrediteerd laboratorium met een geschikt bevonden methode (lees, door de NVKC goedgekeurd) met hoge mate van zekerheid niet meer tot de groep normale uitslagen kan behoren. Deze benadering is verwant aan de hantering van een grijs gebied bij de constatering van een overschrijding van de snelheidlimiet bij verkeerscontroles.

Kritisch verschil en meetonzekerheid

Teneinde het resultaat van een meting met zekerheid te kunnen classificeren als buiten het referentiegebied vallend, gaat deze richtlijn uit van de bovengrens van normaal plus een per methode te berekenen kritisch verschil volgens Punt et al (ref 7). Deze benadering sluit aan bij het standpunt van de IFCC omtrent omgaan met de meetonzekerheid volgens ISO15189. De vastgestelde referentiegebieden en bijbehorende kritische verschillen leiden opgeteld tot te hanteren afkappunten zoals vermeld in tabel 3 en verduidelijkt in figuur 1 (Bijlage A3). Aan het CBR en de keurende psychiaters wordt nadrukkelijk gevraagd om gebruik te maken van tabel 3 voor het juiste afkappunt, bij het trekken van hun conclusie t.a.v. het niet behoren tot de normale populatie op basis van een enkelvoudige bepaling van CDT.

Methode verschillen leiden nu tot verschillende referentiegebieden en afkappunten

Door verschillen in meetprincipes en/of calibratie zijn de referentiegebieden en afkappunten niet gelijk, zoals blijkt uit tabel 3. Ontwikkeling van een set calibratoren voor CDT analyses vindt momenteel plaats via de IFCC-WG CDT. Uiteindelijk moet dit ertoe leiden dat alle goedgekeurde en IFCC gecalibreerde methoden vergelijkbare resultaten opleveren. Zodra deze IFCC calibratoren verkrijgbaar zijn, moeten deze minimaal elk kwartaal gebruikt worden door de uitvoerende laboratoria. Daarnaast is het noodzakelijk om via een poolserum in elke serie een controle op lange termijn drift uit te voeren.

Confirmatieonderzoek bij een dispuut over de uitslag

Er bestaan verschillende inzichten over het aanvragen van confirmatieonderzoek bij het in twijfel trekken van het resultaat. Wanneer is dit van toepassing en door wie is dit aan te vragen. De werkgroep CDT van de NVKC is van mening dat deze mogelijkheid van conformatieonderzoek bredere bekendheid moet krijgen. Confirmatieonderzoek kan door de betrokken cliënt of diens advocaat worden aangevraagd, maar het geniet de voorkeur als deze mogelijkheid in een vroege fase door de keurend psychiater of het CBR wordt benut.

7 Conclusies

%CDT of %DST (rapportage eenheid)

Deze richtlijn gebruikt de aanduiding %DST als eenheid voor de rapportage van carbohydraat deficiënt transferrine, in navolging van de naamgeving van de IFCC werkgroep. Voor de scheidingsmethoden zal uitsluitend %DST worden gebruikt, dwz de verhouding van disialotransferrine t.o.v. totaal transferrine. Voor de immunochemische methode wordt als eenheid het bekende %CDT gehandhaafd. Bij de uitslag moet altijd de methode en de eenheid vermeld worden.

Referentiemethode en routine methoden

Goedgekeurd als referentiemethode én tevens als routine methode voor CDT in het kader van CBR keuringen, is de HPLC methode volgens Helander (Clin Chem 2003).

Goedgekeurd als routinemethode voor CDT voor CBR keuringen is de N-Latex CDT methode van Siemens, de CEofix CDT van Analis, de ClinRep CDT methode van Recipe, de Capillarys CDT van Sebia en de Ready-Prep %CDT van Bio-Rad, conform de specificaties gegeven in tabel 3.

Afkappunten

Voor de gehele groep goedgekeurde methoden zijn de bovengrens van normaal en het afkappunt opnieuw berekend en vastgesteld. Dat heeft geleid tot actualisatie van tabel 3 t.o.v. de 2008 versie van de richtlijn. CDT uitslagen boven het afkappunt vallen met 95% zekerheid buiten het referentiegebied.

Bijlage A1 Overige eisen m.b.t. CDT analyses voor het CBR

1. Het laboratorium (zowel het laboratorium waar de bloedafname plaatsvindt als het laboratorium waar het feitelijke onderzoek wordt uitgevoerd) dient geaccrediteerd te zijn door een bevoegde instelling. In Nederland is de RvA (waarin de CCKL is opgegaan) de bevoegde instelling voor accreditatie van medische laboratoria.
2. Bloedafname dient te geschieden door een bevoegde medewerker. Bij de bloedafname dient persoonsidentificatie plaats te vinden aan de hand van een geldig identiteitsbewijs en dient het nummer van het identiteitsbewijs voor minimaal een jaar te worden vastgelegd.
3. De pre-analytische fase dient nauwkeurig vast te liggen in de laboratorium voorschriften met beschrijving van de werkwijze van afname, transport, opslag en verwerking van bloed, evenals de administratieve handelingen hieromtrent.
4. CDT-bepalingen dienen te worden uitgevoerd met een door de NVKC goedgekeurde methode. Verificatie (een beperkte validatie) van de bepalingmethode van CDT dient te geschieden volgens de CCKL / ISO 15189 normen.
5. Validatie gegevens dienen te zijn vastgelegd volgens het kwaliteitssysteem van het betreffende laboratorium en de betrokken gegevens moeten desgevraagd kunnen worden getoond.
6. Het laboratorium dient de gehanteerde referentiewaarden voor CDT te verifiëren en de betrokken gegevens desgevraagd te kunnen overleggen. Voor CBR onderzoek mogen uitsluitend de in de voorliggende richtlijn aangegeven (tabel 3) grenzen worden gebruikt.
7. De analysegang dient nauwkeurig te zijn beschreven in een analysevoorschrift met vermelding van uitvoeringsgegevens, methode, reagentia, kwaliteitscontrolemonsters (inclusief poolserum) en kwaliteitsbewaking. Eveneens dient te zijn beschreven hoe te handelen bij afwijkende uitslagen van de kwaliteitscontrolemonsters.
8. De analyse van CDT mag in enkelvoud geschieden bij meebepalen van twee kwaliteitscontrolemonsters en een poolserum per serie. Indien de resultaten van twee controles meer dan 10% afwijkt van de streefwaarde, dient de serie in zijn geheel te worden herhaald.
9. CDT-uitslagen buiten het referentiegebied dienen zo nodig op verzoek te kunnen worden geconfirmeerd. Dit hoeft echter niet in hetzelfde laboratorium plaats te vinden, maar wel met oorspronkelijk monster (zie punt 10).
10. Na de analyse dienen alle sera één jaar bewaard te blijven bij $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ op het laboratorium waar de analyse werd uitgevoerd. Monsters zijn opvraagbaar door opdrachtgever, cliënt of diens advocaat.
11. Het laboratorium dient deel te nemen aan het kwaliteitsbewakingprogramma voor CDT, georganiseerd door SKML. De resultaten uit deze controlemonsters mogen maximaal 10% afwijken van de consensuswaarde. Indien dit voor één van beide monsters twee achtereenvolgende keren niet wordt gehaald, dient dit te worden gemeld aan het CBR. In het kwaliteitssysteem van het laboratorium dient de werkwijze bij afwijkende resultaten in het kader van SKML rondzendingen te zijn vastgelegd.
12. Alle gegevens, inclusief die van alle kwaliteitscontrole- en calibratiemonsters, dienen minimaal een jaar bewaard te blijven.
13. De cumulatieve gegevens van de CDT uitslagen in alle kwaliteitscontrolemonsters, inclusief die van het kwaliteitsbewakingprogramma van de SKML, zijn volgens geldende juridische procedures opvraagbaar door aanvrager of CBR
14. Indien de uitvoering van de CDT bepaling wordt uitbesteed aan een ander laboratorium, dient het verzendend laboratorium zich ervan te verzekeren dat het uitvoerend laboratorium zich aan de aanbevelingen houdt.

Bijlage A2: Methodekarakteristieken (aangepast en aangevuld t.o.v. 2008)

Naam	Helander/Jeppsson (HPLC methode)	Recipe ClinRep CDT (HPLC methode)	Analys CEofix (CE methode)	Siemens N Latex CDT (Immunochemische methode)
Primaire literatuur referentie	Helander, Husa en Jeppsson 2003 ref 2	Arndt 2008 ref	Joneli et al, J Chrom A 1130, (2006) 272-280	Delanghe Helander Wieters et al 2007 ref 4
Principe	Ion exch. HPLC met gradient en spec detectie 470 nm, base line integratie	Ion exch. HPLC met gradient en spec detectie 460 nm, base line integratie	CE met UV meting bij 200nm (peptide band), valley-to-valley integr.	Directe immuno inhibitie nefelometrie met Latex versterking
Juistheid	Dit is de referentie methode	Lineaire correlatie met Helander HPLC (Opm 3)	Lineaire correlatie met Helander HPLC (Opm 3)	Lineaire correlatie met Helander HPLC (Opm 3)
VC intra assay	3,1 tot 4,6 %	3,5 – 4,6 %	1,9 tot 3,2 %	1,9 tot 7,0 %
VC inter assay	2,9 tot 4,4 %	3,8 – 5,0 %	3,6 %	3,4 tot 10,4 %
inter lab VC	Helander 2003	Bron Recipe	Joneli 2006	Delanghe
	EQUALIS 8,8 %	INSTAND 9 %	GTFCH 9 % schatting	EQUALIS 6,6 %
Specificiteit	92,8 % at 1,7 cut-off Bergström	Opm 4	94% (m) bij 1.7 Pekelharing	95 % bij 2.0% cut off Whitfield 95% bij 2,35 Schellenberg 96% bij 2,3% DeLanghe
Sensitiviteit	51,1 % at 1.7 cut-off Bergström	Opm 4	72% (m) bij 1.7 Pekelharing	72% bij 2,35% Schellenberg 93% bij 2,3 % Delanghe
Ref waarde (lit. ref.) Opm 5	Disialo 0.67-1.67% (Helander 2003)	≤ 1.70% DST (Arndt 2008) ≤ 1,61 % met Bhattacharya n=12441	0,81 – 1,57%DST (Lanz 2004) ≤ 1,51% met Bhattacharya n=15690	2,35 (Delanghe 2007) ≤ 2,16 % CDT met Bhattacharya n =4953
Storende factoren (Opm 1 en 2)	In chromatogram doorgaans herkenbaar	In chromatogram doorgaans herkenbaar	In electroferogram doorgaans herkenbaar	Alleen bij CDG syndroom fout hoge waarde
Opmerkingen				Na drift in 2007 is calibratie aan Helanders HPLC “verankerd”
Geschikt voor rechtszaken ?	Ja	Nee	Nee	Nee
Geschikt voor routine	Ja	Ja	Ja	Ja

Opm 1 Bij een CDG syndroom is de cliënt herkenbaar geretardeerd, in zeer zeldzame gevallen is de klinische afwijking marginaal en dit kan bij alle technieken tot een foutieve interpretatie lijden.

Opm 2 Bij aanwezigheid van erfelijke varianten is een exacte kwantitatieve analyse met HPLC of CE niet mogelijk, voor aanvullend onderzoek svp doorsturen naar (IFCC) referentie lab

Opm 3 Lineairiteit is geverifieerd tot ca twee maal de waarde van het afkappunt.

Opm 4 Geen geschikte klinische data aangeleverd. Op grond van zeer goede correlatie met referentie methode, wordt aangenomen dat sensitiviteit en specificiteit vergelijkbaar zijn met referentie methode.

Opm 5: Bhattachary berekeningen uitgevoerd door Naus & Wieters (unpubl), het gemiddelde van de Gauss en de Gamma benadering is aangehouden

Vervolg Bijlage A2

Naam	Ready-Prep %CDT	Capillarys CDT
Primaire literatuur referentie	Helander, Bergström CCA 2006	Schellenberg, Wiolders CCA 2010
Principe	Ion exch. HPLC met gradient en, spec detectie 460 nm, base line integratie	CE met UV meting bij 200nm (peptide band), base-line integratie
Juistheid	Lineaire correlatie met Helanders HPLC	Lineaire correlatie met Helander HPLC
VC intra assay	6,2 – 9,4 % Helander 2006	3,4% Schellenberg 2010
VC inter assay	8,5% Helander 2006	6,4% Schellenberg 2010
inter lab VC	7,4% Equalis 2011	6,4 RfB Ringversuch
Specificiteit	87% Schellenberg 2008	91% Schellenberg 2007
Sensitiviteit	74% Schellenberg 2008	74% Schellenberg 2007
Ref waardes Opm 5	0,52 – 1,49 %DST met Bhattacharya N = 8190	≤1,4 % DST met Bhattacharya (Schellenberg & Wiolders 2010)
Storende factoren (Opm 1 en 2)	In chromatogram doorgaans herkenbaar	In electropherogram doorgaans herkenbaar
Opmerkingen	HPLC met Agilent apparatuur of equivalent Geen BioRad calibratie gebruiken	Methode heeft een grotere gevoeligheid voor interferenties door andere proteïnen
Geschikt voor rechtszaken ?	Nee	Nee
Geschikt voor routine	Ja	Ja

Berekening van kritisch verschil en de afkapgrens voor %CDT en %DST

Uitgangspunt is dat bij de beoordeling of een gevonden uitslag –die behept is met een vastgestelde meetonzekerheid- een afgesproken grenswaarde met voldoende zekerheid overschreden moet worden om als afwijkend van die grenswaarde te mogen worden beschouwd. De extra bandbreedte die voortkomt uit deze gezochte zekerheid is het 'kritisch verschil'.

Daarbij spelen onderstaande parameters en aandachtspunten een rol.

- De geldende meetonzekerheid; deze heeft meestal een relatie tot het uitslagniveau. Uitgegaan wordt van de meetonzekerheid rond de bovengrens van normaal voor de betrokken methode.
- Wordt de meetonzekerheid binnen één laboratorium (intralaboratorium variatie) of tussen laboratoria (interlaboratoriumvariatie) beschouwd? Normaliter is de binnen-laboratoriumvariatie lager dan de tussen-laboratoriumvariatie. Voor een landelijk te hanteren beslisgrens (afkapwaarde) bij uitvoering van de analyses in meerdere laboratoria moet voor de tussen-laboratoriumvariatie worden gekozen.
- De gekozen bovengrens: De referentiewaarden zijn in de klinische chemie per consensus gedefinieerd als het gebied tussen de 2,5^e en de 97,5^e percentielen van de frequentieverdeling van de normale populatie: het centrale 95% deel is normaal en per definitie heeft daardoor 5% van de gezonde bevolking een afwijkende testuitslag.. Een groep van 2,5% van de normalen wordt hierdoor per definitie als 'verhoogd' gezien.
- De samenstelling van de normale populatie die als referentie geldt. Bestaat deze uit geheelonthouders, of uit geheelonthouders gecombineerd met sociale gebruikers, en zo ja in welke verhouding? Dat laatste heeft weliswaar een effect op de bovengrens, maar Schellenberg toonde aan dat de stijging van CDT zelfs tot alcoholgebruik van 20 g/dag zeer gering is. De werkgroep acht studies met populaties zonder alcoholgebruik of maximaal 20 g/dag geschikt voor het vaststellen van de referentiewaarden. Een aantrekkelijk alternatief vormt het bepalen van referentiewaarden volgens Bhattacharya, waarbij op basis van minimaal enkele duizenden test resultaten (mix van normaal en verhoogd) de Gauss verdeling van "normalen" gereconstrueerd kan worden.
- De notie dat de bovengrens van normaal niet hetzelfde is als de ondergrens is van overmatig en riskant alcoholgebruik (ORAG). De ondergrens voor ORAG is gemiddeld 40 g per dag voor vrouwen en gemiddeld 60 gram per dag voor mannen. Er zijn nog steeds niet voldoende gegevens om deze alcoholinname te correleren aan een CDT waarde voor de diverse methoden. Schellenberg onderzocht deze relatie voor de Axis methode, maar onderzocht moet nog worden of deze dose-response relatie omgezet kan worden naar andere CDT analyse methoden.
- De biologische variatie: elk individu kent voor elke te analyseren stof een zekere variatie in de concentratie in de tijd, dat betekent dat zelfs met een ideale methode fluctuerende uitslagen worden verkregen bij een enkelvoudige afname. De biologische variatie wordt daarom meegenomen in het kritische verschil.
- Een normaalwaardengebied is gebaseerd op een grote groep geselecteerde normale personen voor de betrokken parameter. Doel van de CBR keuring is om vast te stellen of een individu behoort tot de normale groep, dan wel dat er sprake is van een significante zekerheid dat het individu buiten de groep valt. Voor het individu geldt dat er zowel een meetonzekerheid bestaat t.a.v. het laboratorium dat de test uitvoerde (inter lab variatie) als ten aanzien van intra-individuele variatie. Op basis hiervan is een kritisch verschil berekend dat bovenop de bovengrens moet worden gelegd teneinde voldoende zeker te zijn dat dit individu niet tot de groep normalen behoort.

Kortom: de onzekerheid in een numerieke laboratoriumuitslag kan worden gemaskeerd door het feit dat een laboratorium een schijnbaar absoluut getal rapporteert. Diegene die de uitslag interpreteert heeft vaak een beperkte kennis heeft van het betrouwbaarheidsinterval van die uitslag.

Desondanks kan, rekening houdend met bovenstaande beperkingen en keuzes, een berekening uitgevoerd worden om op dezelfde wijze als voor de methode van Axis-Shield (zie Punt et al., 2002) een grens te benoemen waarboven met significante zekerheid gesteld mag worden dat de uitslag niet hoort bij een "normaal persoon" . Andersom wordt de hypothese 'ORAG' in elk geval niet ondersteund bij uitslagen kleiner of gelijk aan het afkappunt (beslisgrens).

Bij het vergelijken van een uitslag (met een bepaalde meetonzekerheid) t.o.v. een gekozen grenswaarde (met een onbekende onzekerheid) geldt voor het vaststellen van het kritisch verschil de formule

$$\mu_1 - \mu_0 = z \times \text{Wortel}[2] \times \text{Wortel}[CV_{A,B}^2 + CV_{B,W}^2] \times GW/100$$

waarbij:

$\mu_1 - \mu_0$ = kritisch verschil

$CV_{A,B}$ = analytische variatiecoëfficiënt (B = between labs)

$CV_{B,W}$ = biologische intra-individuele variatiecoëfficiënt (W = within person)

GW = de grens waarop de beoordeling betrekking heeft

z = het aantal standaarddeviaties, passend bij de gekozen zekerheid

(bij 95% past 1,65, bij 99% past 2,33); omdat het gaat om een verandering in één richting (n.l. hoger) geldt een unidirectionele z-score.

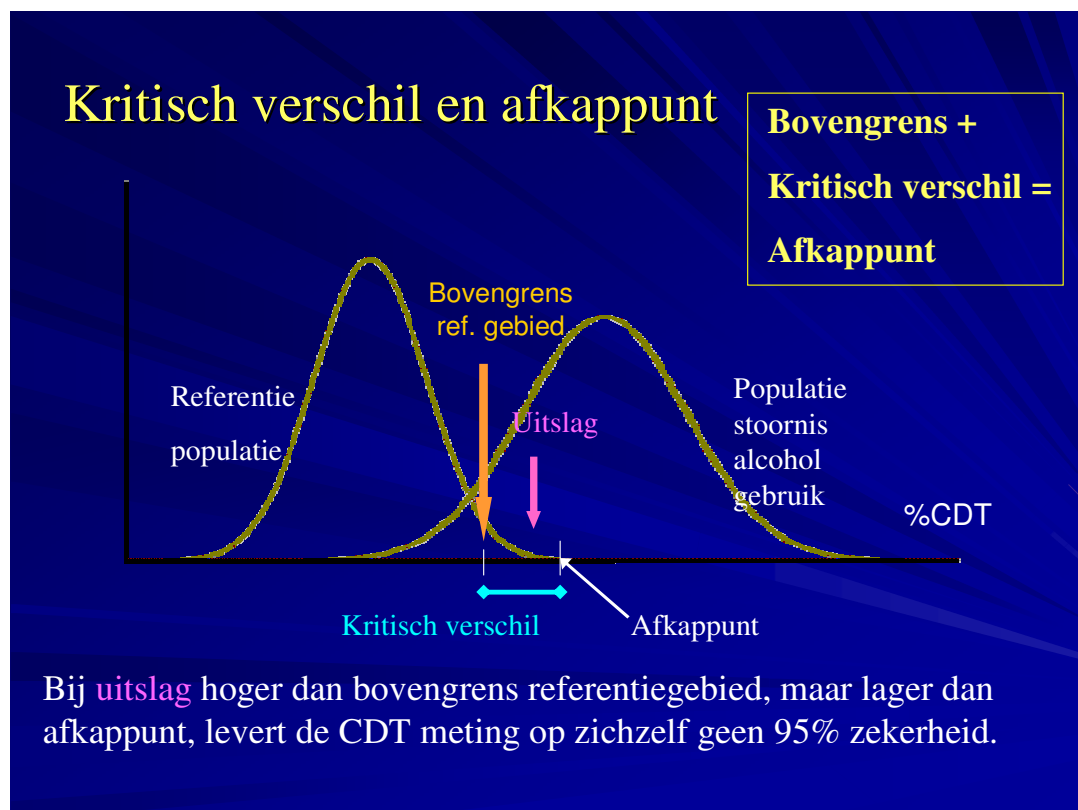
Voorbeeld berekening kritisch verschil voor de HPLC methode van Helander

Bij een uitspraak met een gewenste zekerheid van 95%, een bovengrens van 1,67, een tussenlaboratorium-CV van 8,8% [Equalis], een biologische CV van 4,7% [bron:Helander] en een bepaling in enkelvoud (hetgeen bij HPLC vanzelfsprekend is, en –mits de apparatuur in een stabiele toestand verkeert— ook betrouwbaar moet worden geacht) past een kritisch verschil van 0,37

Dat wil zeggen dat voor een individueel bloedmonster gemeten in enkelvoud in een geaccrediteerd NL laboratorium met grote zekerheid geconcludeerd mag worden dat de uitslag niet meer normaal is voor deze HPLC methode als de %DST uitslag minimaal 2,1 is. Dit wordt geïllustreerd in onderstaande figuur

Onderstaande figuur dient als toelichting.

De normale of referentie populatie links overlapt met de populatie overmatig alcoholgebruik rechts. Om voor 95% zeker te zijn dat een individu niet onterecht beschuldigd wordt van overmatig alcoholgebruik, moet een afkappunt gehanteerd worden, waarin zowel de spreiding binnen een individu als ook tussen verschillende laboratoria verwerkt is.



Bijlage A4: Literatuur

- 1 Vorderingsprocedure en Eigen verklaring CBR <http://www.cbr.nl/vorderingsprocedure.pp>
Zie ook <http://www.cbr.nl/10872.pp>
- 2 Helander A, Husa A, Jeppsson J-O. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 2003;49:1881-1890
- 3 NVvP Richtlijn “Diagnostiek van stoornissen in het gebruik van alcohol in het kader van CBR keuringen” (De Tijdstroom 2011)
- 4 Delanghe JR, Helander A, Wielders JPM, et al. Development and multicenter evaluation of the N Latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 2007;53:1115-21.
- 5 Arndt T, Guessregen B, Hallermann D, et al. Forensic analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by HPLC. Statistics and extreme CDT values. *Forensic Sci Int*. 2008;175:27-30
- 6 Lanz C, Kuhn M, Deiss V, Thormann W. Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. *Electrophoresis* 2004;25:2309-18
- 7 Punt JMHM et al. Over de betekenis van de %CDT-uitslag bij de beoordeling van het patroon van alcoholgebruik. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2002; 27:271-8.
- 8 Joneli J, Lanz C, Thorman W. Capillary zone electrophoresis determination of carbohydrate-deficient transferrin using the new CEofix reagents under high-resolution conditions. *J Chromatography* 2006
- 9 Bergström JP, Helander A. Clinical characteristics of carbohydrate-deficient transferrin (%disialotransferrin) measured by HPLC *Alcohol Alcoholism* 2008;43:436-41
- 10 Schellenberg F, Wielders JPM. Evaluation of capillary electrophoresis assay for CDT on SEBIA’s Capillarys System: Intra and inter laboratory precision, reference interval and cut-off *Clin Chim Acta* 2010;1888-1893
- 11 Kenan A, Husand S, Helander A. Importance of HPLC confirmation of problematic CDT results from a multicapillary electrophoresis routine method. *Clin Chim Acta* 411 (2010) 1945-50
- 12 Schellenberg F, Girre G, Nalpas B. Analytical evaluation of a new capillary electrophoresis method for carbohydrate-deficient transferrin measurement *Clin Chim Acta* 2007; 382:48-53
- 13 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: 187-190
- 14 Jeppsson J-O, Arndt T, Schellenberg F et al Towards standardization of CDT measurement I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45:558 – 562
- 15 Helander A, Wielders JPM, Jeppsson J-O et al Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: II. Performance of a laboratory network running the HPLC candidate reference measurement procedure and evaluation of a candidate reference material *Clin Chem Lab Med* 2010; 48:1585-92
- 16 Naus AJ, Borst A, Kuppens PS The use of patient data for the calculation of reference values for some haematological parameters *J Clin Chem Clin Biochem* 1980;18:621-25

Algemene literatuur

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

Bortolotti F et al. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: A critical review of the literature 2001–2005 *J Chrom. Biomed* 2006; 841:96-109.

Fleming MF et al. A Review of Genetic, Biological, Pharmacological, and Clinical Factors That Affect Carbohydrate-Deficient Transferrin Levels *Alcoh Clin & Exp Research*. 2004; 28:1347-55

Wielders JPM, Stroet te R. Forever an alcoholic? The Dutch approach in using CDT as alcohol biomarker in forensic medicine. *Ned Tijdschr Klin Chemie Laboratorium Geneeskunde* 2012;37:74-76