

Un marcatore biologico per la diagnosi di abuso alcolico: CDT

VALERIA CRESPI*, URSULA ANDREOTTA*, ELENA TETTAMANZI*, M.M. FERRARIO **,**

* Laboratorio di Tossicologia, UO Medicina del Lavoro e Preventiva, Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi, Varese

** Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, Università degli studi dell'Insubria, Varese

KEY WORDS

Alcohol dependence; biological marker; Carbohydrate-Deficient-Transferrin (CDT)

SUMMARY

«**CDT: a biological marker of alcohol abuse**». **Background:** *Laboratory tests may be useful tools in the identification of heavy drinkers, in identifying the etiological role of alcohol in the onset of the disease, and in monitoring changes in alcohol intake.* **Objectives:** *An ideal diagnostic marker of alcohol abuse should: be characterized by high specificity and sensitivity; show an high specific correlation with alcohol metabolism; be dependent on alcohol intake and have a relatively short half-life ($t_{1/2}$) so as to be able to monitor abstinence periods.* **Conclusions:** *CDT (Carbohydrate-Deficient-Transferrin) meets all these requirements and offers the physician a significant tool as a marker of chronic alcohol abuse. CDT can reveal a daily alcohol consumption of 50-80 g of ethanol, corresponding to a bottle of 11°-13° wine, for two consecutive weeks, with normalization after two weeks of abstinence ($t_{1/2}$ of CDT is 15 days). Compared with other more common alcohol abuse markers, such as GGT or MCV, CDT is more specific and provides more detailed information.*

RIASSUNTO

I tests di laboratorio possono essere utili nel ricercare i forti bevitori, nell'individuare il ruolo dell'alcol come agente eziologico della malattia, nel follow-up e nel monitoraggio di cambiamenti nel consumo di alcol. Un marcatore diagnostico ideale di abuso alcolico cronico dovrebbe avere: un'elevata specificità, un'elevata sensibilità, essere correlato in modo specifico con il metabolismo dell'alcol, essere dipendente dal consumo di alcol e avere un tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$) relativamente breve in modo da poter monitorare l'astinenza. La CDT o Carbohydrate-Deficient-Transferrin, risponde a queste caratteristiche e offre al medico un rilevante apporto come marcatore di abuso cronico di alcol. La CDT rivela un consumo di alcol di 50-80 g di etanolo al giorno, equivalenti ad una bottiglia di vino a 11-13 gradi, per 2 settimane consecutive, con una normalizzazione dopo 2-4 settimane di astinenza ($t_{1/2}$ CDT=15 giorni). Rispetto ai marcatori di abuso alcolico più comuni, come GGT e MCV, la CDT è il marcatore più specifico e fornisce in abbinamento, informazioni più complete.

Pervenuto il 28.5.2007 - Accettato il 5.9.2007

Corrispondenza: Crespi Valeria, Medicina del Lavoro e Preventiva, Laboratorio di Tossicologia, Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi di Varese, Via O.Rossi 9, 21100, Varese - Tel. 0332270631 - Fax 0332270634 - E-mail: valeria.crespi@ospedale.varese.it

INTRODUZIONE

Le problematiche correlate al consumo di bevande alcoliche, si ripercuotono in ambito sociale, medico e psicologico, coinvolgendo gran parte della popolazione adulta della società odierna. Il problema *alcolismo* si presenta di estrema rilevanza in ambito lavorativo sia per le ripercussioni di tipo economico, per gli elevati costi sociali, dovuti alla ridotta produttività, all'aumento degli infortuni, all'assenteismo, che per la salute e la sicurezza dei lavoratori e dei loro compagni di lavoro (22).

Il fenomeno "abuso alcolico", ha richiesto da parte del laboratorio di analisi, un impegno crescente nel tempo, per cercare di mettere a disposizione del clinico dei bio-marcatori che gli permettessero di risolvere problemi sia diagnostici che pronostici.

Un marcatore diagnostico ideale di abuso alcolico dovrebbe rispondere ad alcune caratteristiche quali:

- essere il prodotto biochimico correlato in modo specifico con la presenza o con il metabolismo dell'alcol;
- essere dipendente dal consumo di alcol;
- essere abbastanza sensibile da permettere una valutazione dei livelli di consumo alcolico minimi che si associano a danni fisici e psichici;

- essere caratterizzato da una cinetica di eliminazione nota, cioè avere un tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$) relativamente breve in modo da poter monitorare l'astinenza (6).

In quest'ottica si inserisce uno dei relativamente recenti marcatori biologici di abuso alcolico: la CDT (carbohydrate-deficient-transferrin) o transferrina desialata, che possiede tutte queste caratteristiche e i cui livelli sierici aumentano in caso di consumo elevato di alcol (2, 29).

L'abuso alcolico interferisce nella glicosilazione proteica di vari tipi di glicococoniugati, il più studiato dei quali è la transferrina.

ASPETTI BIOCHIMICI

La transferrina, (figura 1) glicoproteina con peso molecolare di 79.5 kD, è la principale proteina deputata al trasporto di ferro nell'organismo. È composta da una singola catena polipeptidica di 679 amminoacidi, che si avviluppa in due compatte regioni strutturali, o domini, ognuno dei quali accoglie in un sito specifico di legame un atomo di ferro ferrico (Fe^{3+}) (11). La transferrina è poi legata a due catene complesse di glicani (12).

Queste strutture eterogenee e ramificate di glucidi, mostrano una notevole variabilità anche in

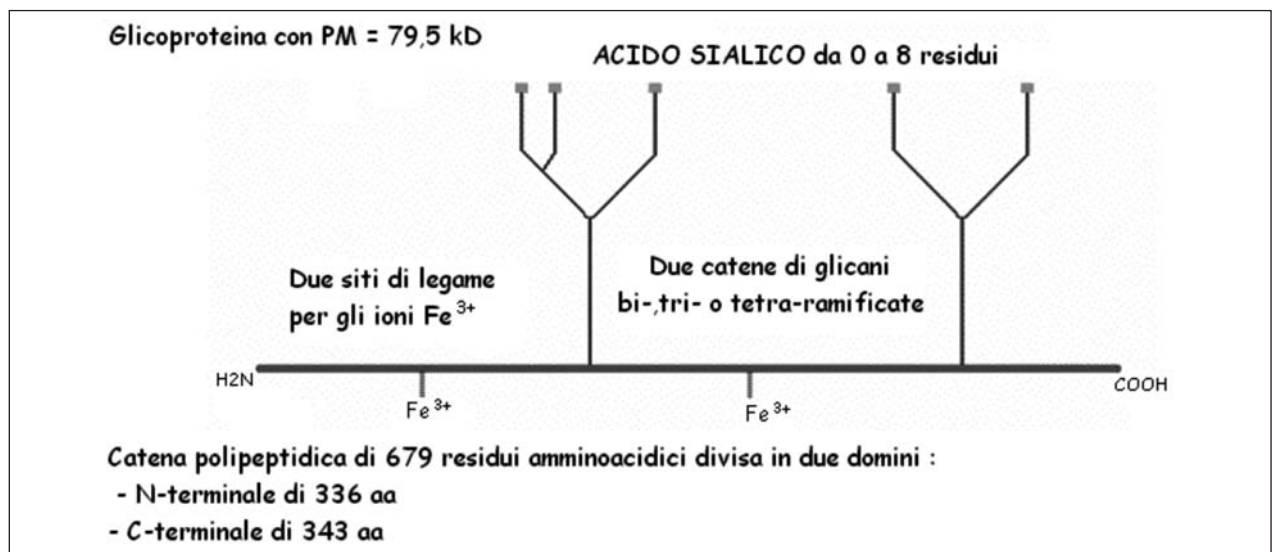


Figura 1 - Struttura della transferrina
Figure 1 - Transferrin structure

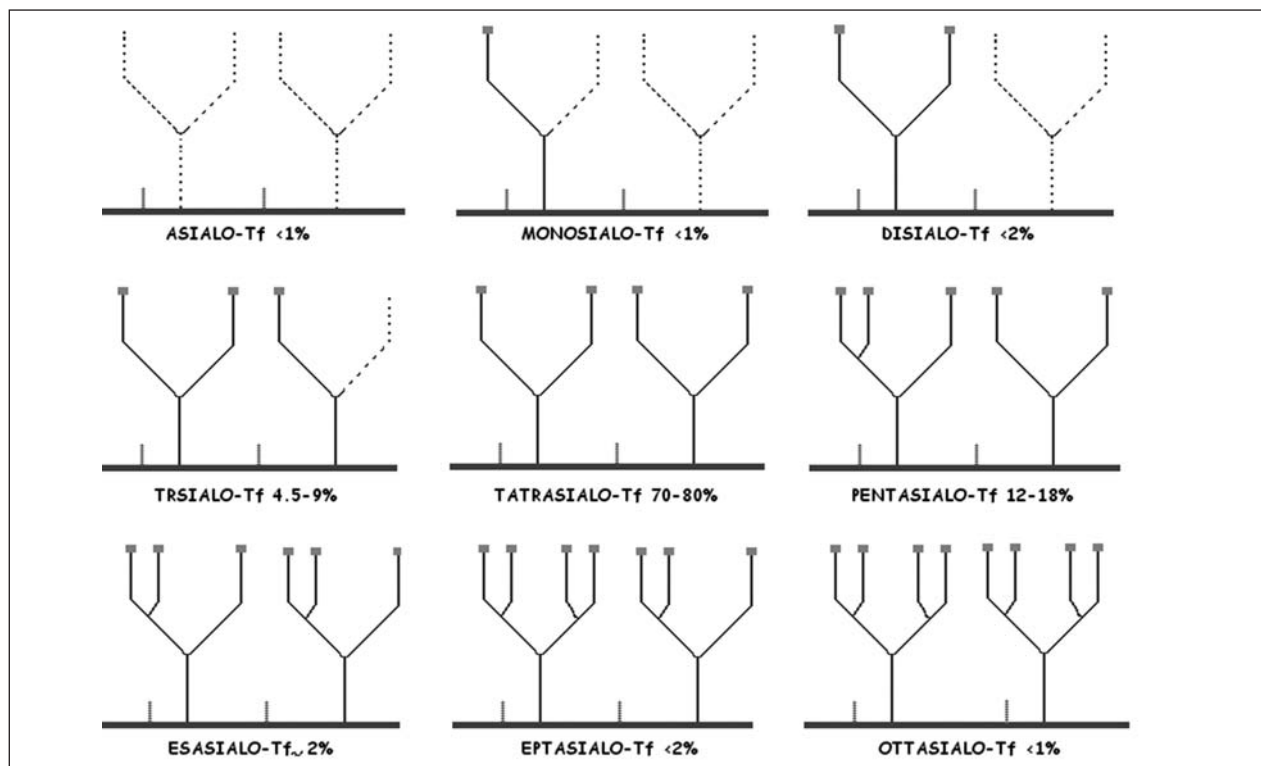


Figura 2 - Isoforme della transferrina

Figure 2 - Transferrin isoforms

condizioni non patologiche e determinano la microeterogeneità della molecola. La natura delle catene di N-glicani, contenenti N-acetil-glucosamina, Mannosio, Galattosio e Acido sialico, determina l'esistenza di diverse isoforme della transferrina.

In accordo con il livello di ramificazione, le due catene di N-glicani mostrano strutture bi-, tri- e tetra ramificate ed ogni ramificazione termina con un residuo di acido sialico.

Nel siero sono rilevabili isoforme della transferrina con legate un numero di molecole di acido sialico che varia da 0 nella Asialo-Tf a 8 nella octasialo-Tf.

In condizioni non patologiche, sul totale delle isoforme di transferrina nel siero, le forme asialo, monosialo e octasialo non sono rilevabili, essendo inferiori all' 1%; la forma preponderante è la tetrasialo-Tf (64-80%), seguita nell'ordine dalla pentasialo-Tf (12-18%), dalla trisialo-Tf (4,5-9%), dalla disialo-Tf (<2%) e dalla epto e dalla esasialo-Tf (circa 2% complessivamente) (4) (figura 2).

Tutte le isoforme sono caratterizzate da un diverso punto isoelettrico (pI).

CAUSE DELL'AUMENTO DELLA CDT

L'abuso cronico di alcol (50-80 g di alcol al giorno, corrispondenti ad una bottiglia di vino da 750 mL di 11-13°) (tabella 1), porta ad un'alterazione nella biosintesi della transferrina con riduzione della glicosilazione che si traduce spesso in un elevato valore di CDT. Il probabile meccanismo è l'inibizione delle glicotransferasi epatiche (N-acetil-glucosaminil-transferasi e galattosio- e sialil-transferasi).

Tabella 1 - Grado alcolico bevande

Table 1 - Alcoholic content of beverages

Bevande	Volume	g Alcol/giorno x 15 g che alterano la CDT
Vino 11°-13°	0.75 L	50-80 g
Birra 5°	1.5 L	50-80 g
Super alcolici ~ 40°	0.20 L	50-80 g

si) da parte dell'acetaldeide prodotta dal catabolismo dell'etanolo (21, 30). Questa alterazione si combina con una significativa aumentata formazione delle isoforme con basse ramificazioni come l'asialo, monosialo e disialo transferrina.

Per queste isoforme è stato creato il termine di CDT (carbohydrate deficient transferrin), transferrina carente in carboidrati, che definisce la somma percentuale delle tre frazioni sopracitate rispetto alla transferrina totale.

Il valore patologico della CDT è raggiunto approssimativamente dopo due settimane di abuso di alcol. Dopo astinenza, il tempo di dimezzamento (t 1/2) della CDT, è di 10-15 giorni con una normalizzazione del valore dopo circa 2-4 settimane (7, 20, 29).

La CDT si presenta, quindi, come un marcatore indipendente, a medio termine, non soggetto a variazioni causate da altre alterazioni fisiologiche determinate ad esempio dall'assunzione di farmaci, diabete, obesità, epatopatie, disordini ematologici.

Rispetto ai marcatori tradizionali di abuso cronico di alcol (GGT, MCV, ALT e AST) (tabella 2), dal punto di vista clinico, la CDT è il marcatore più specifico con valori intorno al 94% (26). In caso di disordini epatici o ematologici, la sola determinazione dell'enzima gammaglutammil transferasi (GGT) o del volume corpuscolare medio eritrocitario (MCV), può portare a delle conclusioni falsamente positive. Per questa ragione, l'alterazione di questi test dovrebbe essere verificata con la determinazione aggiuntiva del test CDT (3, 5, 10, 13, 14, 17, 29).

La sensibilità diagnostica della CDT dipende da numerosi fattori come l'età, la massa corporea, l'abitudine al bere e il sesso (4). È intorno al 55% (26)

Tabella 2 - Sensibilità e specificità dei bio-marcatori per abuso cronico di etanolo

Table 2 - Bio-markers sensibility and specificity for alcoholic chronic abuse

Test	Sensibilità	Specificità	Emivita
GGT	34-85%	20-85%	3-4 settimane
MCV	40-90%	60-90%	3 mesi
AST	15-69%	Bassa	2-3
ALT	26-58%	Bassa	settimane
CDT	66-80%	90-97%	2 settimane

per le donne e al 78% (26) per gli uomini. Secondo alcuni autori intorno allo 80% (16). Un risultato diagnostico negativo della sola CDT, per queste ragioni, non può escludere in modo sicuro un abuso alcolico cronico, e oltre all'anamnesi devono comunque essere utilizzati gli altri parametri diagnostici di utilizzo comune.

Sono riportati in letteratura, valori occasionali di CDT al di sopra degli intervalli di riferimento anche in non forti bevitori.

Epatopatie gravi come la cirrosi biliare primaria, l'epatite virale cronica e il carcinoma epatico, le sindromi CDG (*Congenital Disorders of Glycosilation*), le varianti genetiche di tipo D della transferrina possono, in alcuni casi, interferire con la CDT come marcatore di abuso alcolico (8-10, 24, 25, 27, 28, 31), ma la frequenza di falsi positivi dipendenti da queste cause è circa dello 0,3%. Di contro, varianti genetiche di tipo B e una anomala bassa concentrazione totale della transferrina possono essere causa di risultati falsamente negativi (15, 32)

La CDT può essere utilizzata anche nella diagnosi dei disturbi congeniti della glicosilazione (23), indicate come sindromi CDG (*Congenital disorder of glycosilation*) dove, o per mancata sintesi di parte delle catene di carboidrati, o per difetto di sintesi delle catene di glicani, si riscontra un aumento delle isoforme carenti in carboidrati con un notevole aumento della CDT con valori in percentuale, molto più alti rispetto a quelli osservati nei casi di abuso alcolico.

Esistono poi le varianti genetiche della CDT, determinate dalla sostituzione di amminoacidi nella catena polipeptidica. Sono state caratterizzate 38 varianti. Il tipo più comune è la transferrina C (Tf-C) con una frequenza > al 95%. La Tf-B e la Tf-D, contrariamente al tipo Tf-C omozigote, possono interferire con l'analisi della CDT. Nella popolazione europea queste varianti appaiono come eterozigoti Tf-CB e Tf-CD con una frequenza dello 0.7% e 0.2% rispettivamente (18).

APPLICAZIONI DEL DOSAGGIO DELLA CDT

Il dosaggio della CDT viene effettuato per scopi clinici :

- identificazione di potenziali individui a rischio di abuso alcolico;
- monitoraggio di pazienti in terapia di riabilitazione da tale abuso (sia per controllare l'astinenza che per individuare le ricadute);
- differenziazione di malattia epatica dovuta ad assunzione o non di alcol;
- individuare pazienti ad aumentato rischio di complicazioni post-operatorie o post-traumatiche;
- individuare le sindromi CDG.

Per scopi medico legali:

- valutazione della idoneità al rinnovo della patente di guida in seguito a sospensione per violazione dell'art.186 del Codice della Strada, in associazione ad altri markers di abuso (GGT, MCV, ALT e AST, Bilirubina);
- rilascio di altri permessi quali il porto d'armi.

METODI DI LABORATORIO

L'entità della specificità e sensibilità della CDT è strettamente legata al tipo di tecnica analitica utilizzata.

Le tecniche comunemente utilizzate in laboratorio sono test immunologici (di recente introduzione un test basato su reazione antigene-anticorpo), elettroforesi capillare e tecniche in HPLC.

I test immunologici, in genere, si basano sulla iniziale separazione attraverso microcolonne a scambio anionico sulla base del punto isoelettrico delle diverse frazioni e sulla determinazione immunochimica delle isoforme eluite.

Due sono le problematiche di questa tecnica :

1. che la frazione CDT che viene raccolta può contenere quantità eluite delle isoforme "non CDT" (triasiale e tetrasiale) (1) e di conseguenza si possono avere risultati falsamente positivi;
2. non distingue l'eventuale presenza di varianti genetiche le quali possono dare risultati falsamente positivi nel caso della variante genetica di tipo D, o falsamente negativi nel caso della variante genetica di tipo B (8, 9, 15, 24, 25, 27, 28, 31, 32).

- La tecnica in elettroforesi capillare (CE), permette una separazione delle varie isoforme, potendo così distinguere sia i picchi relativi ad ogni isoforma sia le varianti genetiche.

Con questa tecnica, però, potrebbero verificarsi delle interferenze alla lunghezza d'onda di lettura di 200 nm, da parte di altre biomolecole con punto isoelettrico simile (p.e. CRP, catene leggere, fattori complemento) (19).

- La tecnica in cromatografia liquida ad alta risoluzione (HPLC) è considerata il metodo di riferimento, come indicato già nel meeting internazionale per la standardizzazione dei metodi per la determinazione della CDT, tenutosi a Berlino nel 2000 e nei successivi gruppi di lavoro, perché permette la riproducibile separazione e identificazione delle differenti isoforme della transferrina nonché delle varianti genetiche e delle isoforme atipiche, causa di incorretta determinazione della CDT con metodi immunochimici.(8-10, 15, 24, 25, 27, 28, 31, 32) Inoltre la misurazione della CDT alla lunghezza d'onda di 460nm rende il metodo sensibile e specifico con basso rischio di interferenze (19).

ESPERIENZA IN ATTO

Seguendo le indicazioni delle Società Scientifiche, e per la valenza medico-legale delle richieste (p.e.idoneità patente di guida) il nostro Laboratorio ha operato la scelta di determinare la CDT in HPLC utilizzando il kit Clin Rep, CDT in siero (Recipe) completo di precolonna, colonna a scambio anionico e fase mobile. La preparazione del campione prevede una saturazione con soluzione ferrica e la precipitazione delle proteine. L'analisi viene effettuata con HPLC (Schimadzu) dotato di un detector UV/VIS e la lettura viene fatta a 460 nm.

La quantificazione delle isoforme della transferrina (%CDT) si basa sul calcolo del rapporto percentuale della somma dell'area dei picchi (asialo-Tf+ disialo-Tf), sul totale delle isoforme. La molecola target per la standardizzazione della CDT, secondo le ultime indicazioni delle Società Scientifiche

Tabella 3 - *Controllo di qualità interno*
Table 3 - Internal quality control

	Controllo basso	Controllo alto
Media	1,63%	3,54%
Ds	0,16	0,22
CV%	9,67%	6,3%

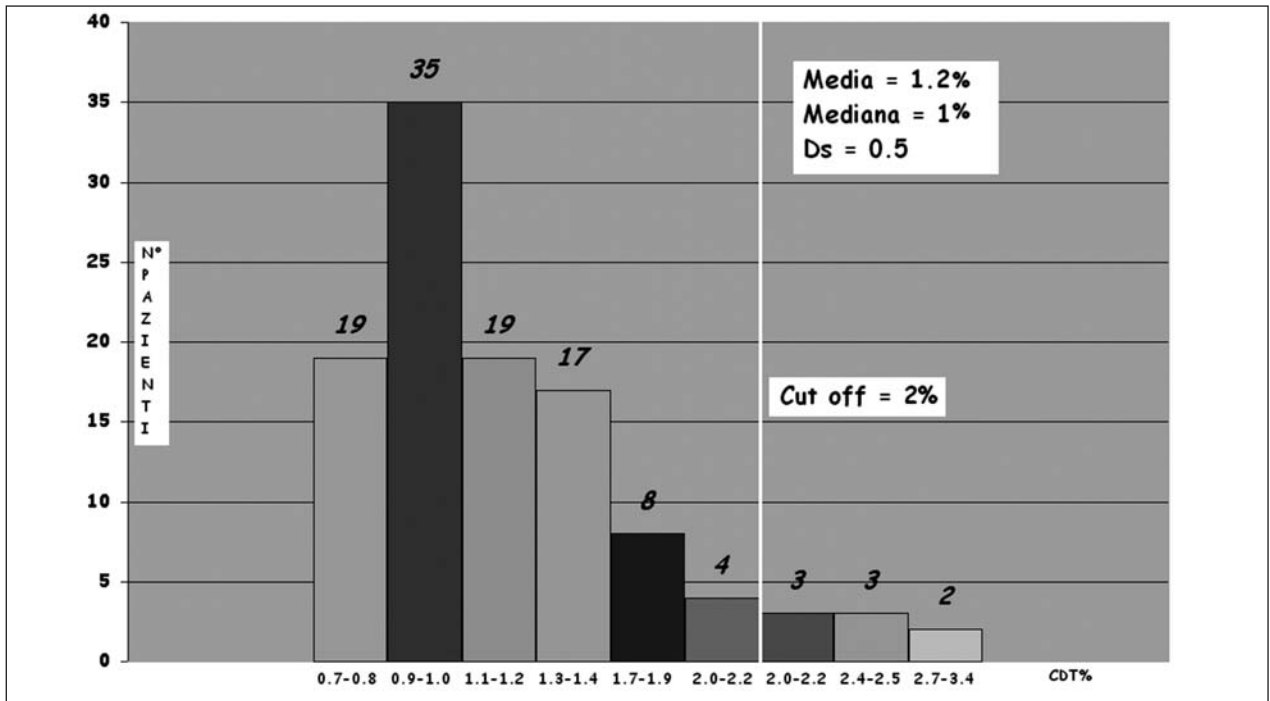


Figura 3 - Distribuzione dei valori di CDT di 110 soggetti con abuso di alcol

Figure 3 - Distribution of CDT values in 110 alcoholic subjects

che (19) è comunque la disialo transferrina, principale isoforma.

Il valore decisionale per discriminare gli abusatori dai non abusatori, è stato ricavato analizzando

20 campioni di non bevitori. Il valore di cutoff calcolato è risultato essere del 2%.

I centodieci pazienti analizzati, provenienti dalla Commissione Patenti di guida in seguito a so-

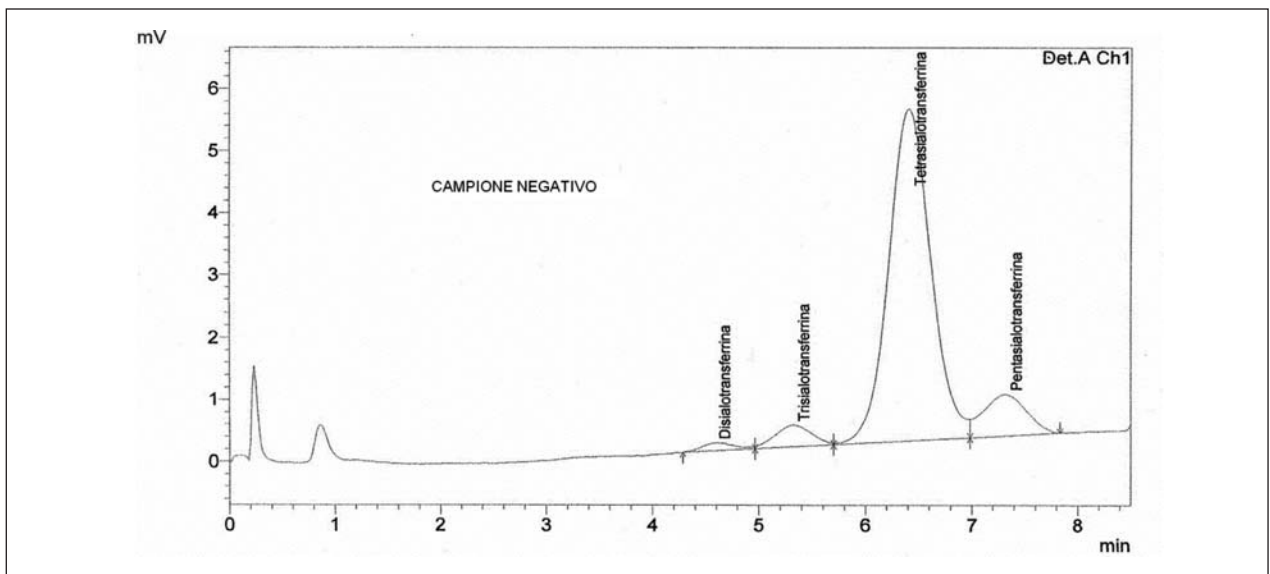


Figura 4 - Campione negativo

Figure 4 - Negative sample

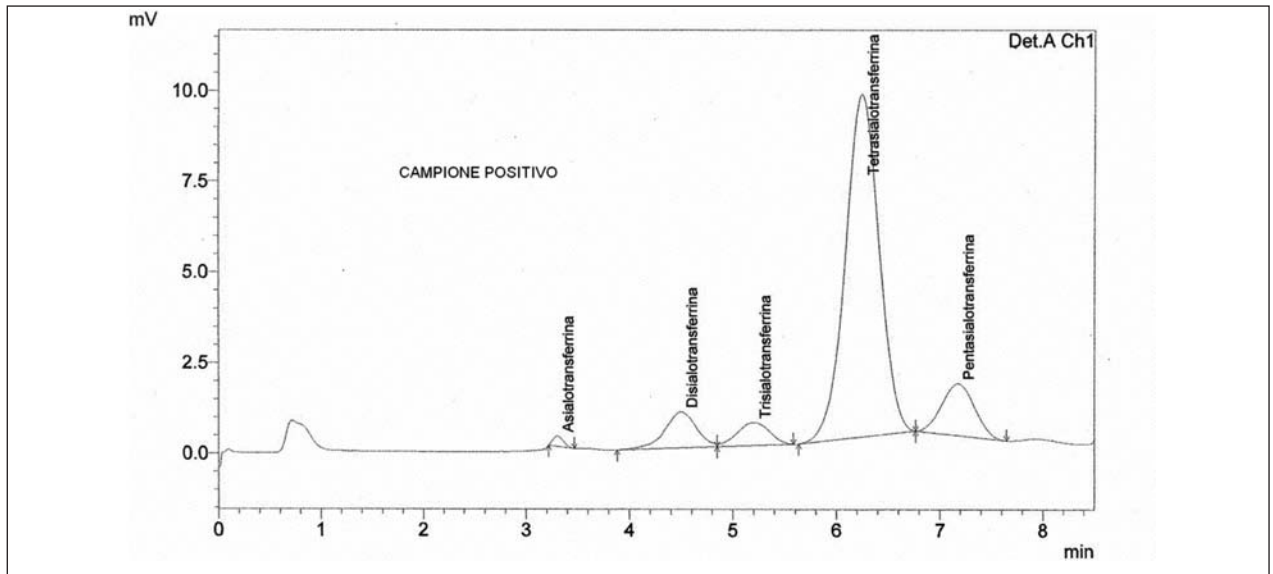


Figura 5 - Campione positivo

Figure 5 - Positive sample

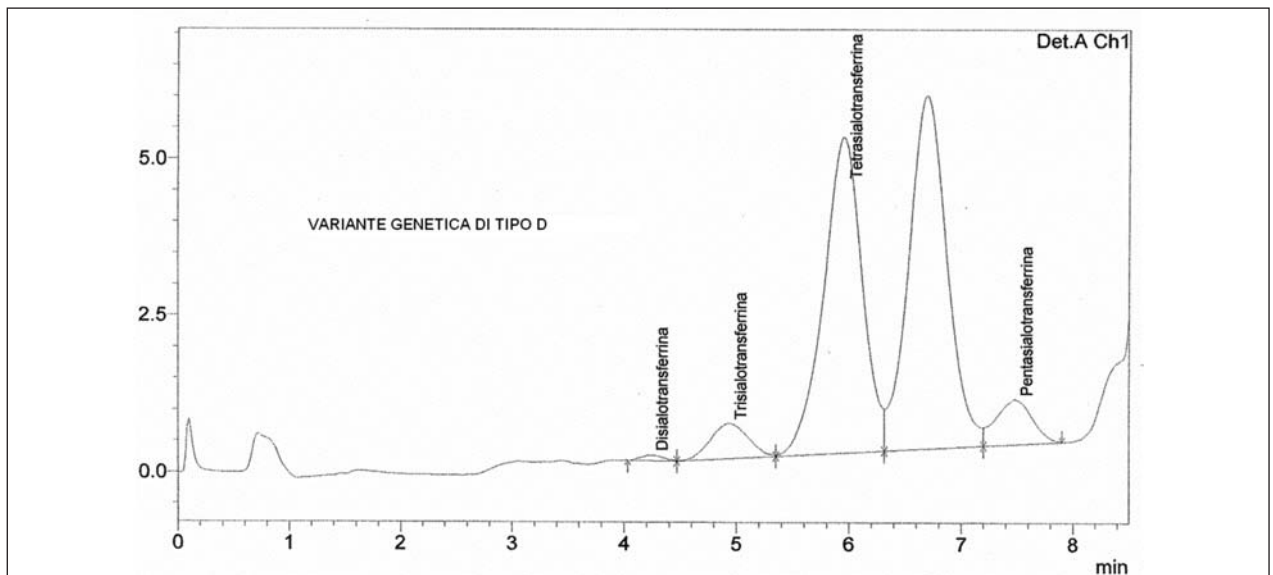


Figura 6 - Variante genetica di tipo D

Figure 6 - Genetic variation of D type

sensione per violazione dell'art.186 del Codice della Strada, presentano valori di CDT% che vanno da 0.7% a 3.4% con una media di 1.2%, una mediana dell'1.1%, una deviazione standard (Ds) di 0.5. La percentuale dei positivi è dell'8.2% (figura 3).

I controlli utilizzati nelle serie analitiche, conformi ai dettami del WG per la standardizzazione della CDT, hanno dimostrato di avere un CV% inter-assay in linea con le indicazioni delle Società Scientifiche (19) (tabella 3).

Esempi di cromatogrammi in HPLC figura 4-7.

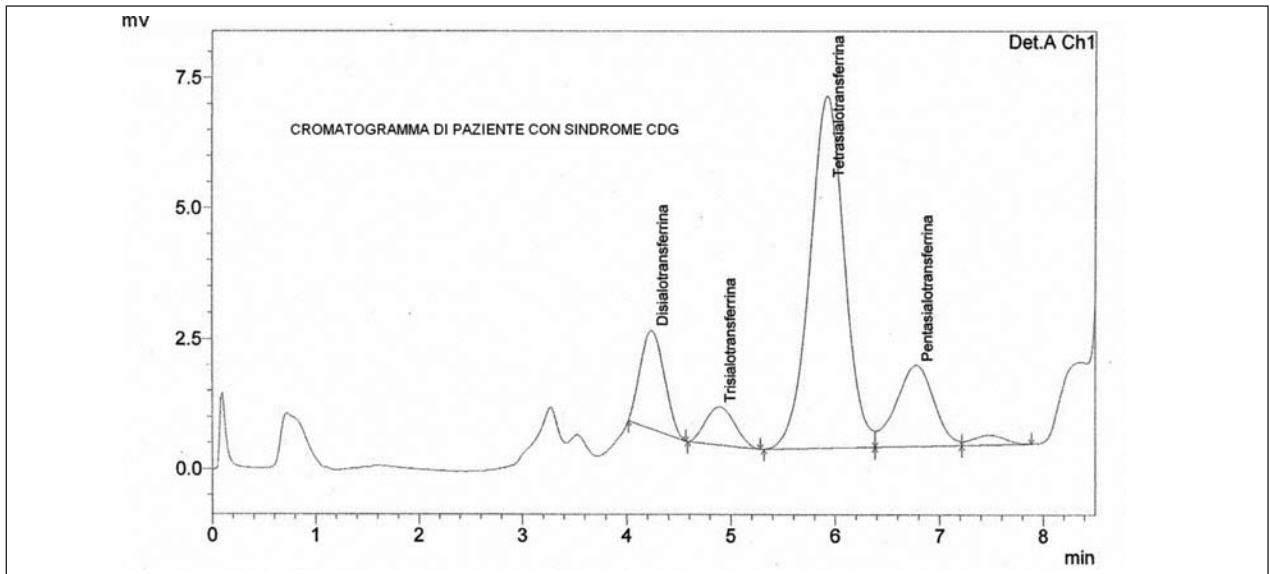


Figura 7 - Sindrome CDG

Figura 7 - CDG Syndrome

NO POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST RELEVANT TO THIS ARTICLE WAS REPORTED

BIBLIOGRAFIA

- ALDEN A, OHLSON S, PAHLSSON P, RYDEN I: HPLC analysis of carbohydrate deficient transferrin isoforms isolated by the Axis-Shield % CDT method. *Clin Chim Acta* 2005; *356*: 143-146
- ALLEN JP, LITTEN RZ, ANTON RF, CROSS GM: Carbohydrate-deficient transferrin as a measure of immoderate drinking: remaining issues. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; *18*: 799-812
- ARNDT T: Alcohol abuse and carbohydrate-deficient transferrin analysis: are screening and confirmatory analysis required? *Clin Chem* 2002; *48*: 2072-2074
- ARNDT T: Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem* 2001; *47*: s13-s27
- ARNDT T: Kohlenhydrat-defizientes Transferrin (CDT) – die derzeit spezifischste Kenngröße chronischen Alkoholmißbrauchs. *J Lab Med* 1999; *23*: s392-s406
- BADII M, COREZZI S, TAVANTI D: *Il laboratorio nell'intossicazione acuta e nell'abuso cronico di alcol*. Manuale di alcoologia – parte terza: trattamento.
- BARTLES U, GRUNERT C, DIRSCH N, et al: ClinRep complete Kit for the HPLC determination of transferrin isoforms as a marker of alcohol abuse. In: *Beiträge zum XI. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie*, S. 207-212, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim 1999
- BEAN P, PETER JB: Allelic D variants of transferrin in evaluation of alcohol abuse: differential diagnosis by isoelectric focusing-immunoblotting-laser densitometry. *Clin Chem* 1994; *40*: 2078-2083
- BEAN P, SUTPHIN MS, LIU Y, et al: Serum carbohydrate-deficient transferrin and false positive results for alcohol abuse in primary biliary cirrhosis: differential diagnosis by detection of mitochondrial autoantibodies. *Clin Chem* 1995; *41*: 858-861
- BELL H, TALLARSEN C, SJAHEIM T, et al: Serum carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol consumption in patients with chronic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res* 1993; *17*: 246-252
- DAYLOFF MO: *Atlas of protein sequence and structure transferrin*. Vol.5. Washington: National Biomedical Research Foundation, 1972, pp D310 and D317
- DE JONG G, VAN EIJK JP: The biology of transferrin. *Clin Chim Acta* 1990; *190*: 1-46
- GILG T: Kohlenhydrat-defizientes Transferrin (CDT) als hochspezifischer Marker für Alkoholmißbrauch/chronischen Alkoholkonsum in der Verkehrs- und Rechtsmedizin – Möglichkeiten und Grenzen. *Clin Lab* 1996; *42*: 193-194
- HALLBACH J, HOFENER-VAN AKEN I, GUDER WG: Stellenwert des kohlenhydrat-defizienten Transferrins im Vergleich zu anderen Alkoholismuskennern bei speziellen Patientengruppen im Krankenhaus. In: *Beiträge zum XI. Symposium der Gesellschaft für Toxikologische und*

- und Forensische Chemie, S. 207-212, Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim 1999
15. HELANDER A: Absolute or relative measurement of carbohydrate-deficient transferrin in serum? Experiences with three immunological assays. *Clin Chem* 1999; *45*: 131-135
 16. HELANDER A: *Alcohol biomarkers: CDT- analytical and clinical issues*. Salice Terme, Pavia 18 ottobre 2006
 17. HELANDER A, CARLSSON S: Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyl transferase levels during disulfiram therapy. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; *20*: 1202-1205
 18. HELANDER A, ERIKSSON G, STIBLER H, JEPSSON JO: Interference of Transferrin isoform Types with Carbohydrate-deficient Transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clinical Chemistry* 2001: 1225-1233
 19. IFCC Working Group on standardisation of carbohydrate-deficient transferrin-IFCC WG-CDT. Meeting held 24.03.2006 in Ingelheim, Germany
 20. JEPSSON JO, KRISTENSSON H, FIMIANI C: Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem* 1993; *39*: 2115-2120
 21. LIEBER CS: Carbohydrate deficient transferrin in alcoholic liver disease: mechanisms and clinical implications. *Alcohol* 1999; *19*: 249-254
 22. MANGILI A: *Alcol e lavoro*. Meeting Scuola Specializzazione in Medicina del Lavoro dell'Università degli Studi di Brescia del 16/04/03
 23. MARQUARDT T, DENEKE J: Congenital Disorders of Glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *Eur J Pediatr* 2003; *162*: 359-379
 24. MURAWAKI Y, SUGISAKI H, YUASA I, KAWASAKI H: Serum carbohydrate-deficient transferrin in patients with non-alcoholic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 1997; *259*: 97-108
 25. PERRET R, FROEHLICH F, LAVANCHY D, et al: Is carbohydrate-deficient transferrin a specific marker for alcohol abuse? A study in patients with chronic viral hepatitis. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; *21*: 1337-1342
 26. RENNER F, STRATMANN K, KANITZ R, DWETTERLING T: Determination of carbohydrate-deficient transferrin and total transferrin by HPLC: diagnostic evaluation. *Clin Lab* 1977; *43*: 955-964
 27. SORVAJÄRVI K, BLAKE JE, ISRAEL Y, NIEMELÄ O: Sensitivity and specificity of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of alcohol abuse are significantly influenced by alteration in serum transferrin: comparison of two methods. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; *20*: 449-454
 28. STAUBER RE, STEPAN V, TRAUNER M, et al: Evaluation of carbohydrate-deficient transferrin for detection of alcohol abuse in patients with liver dysfunction. *Alcohol* 1995; *30*: 171-176
 29. STIBLER H: Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991; *37*: 2029-2037
 30. STIBLER H, BORG S: Glycoprotein glycosyltransferase activities in serum in alcohol-abusing patients and healthy controls. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; *51*: 43-51
 31. STIBLER H, HOLZBACH U, KRISTIANSSON B, et al: Isoforms and levels of transferrin, antithrombin, $\alpha(1)$ -antitrypsin and thyroxine-binding globulin in 48 patients with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Scand J Clin Lab Invest* 1998; *58*: 55-61
 32. STIBLER H, BORG S, BECKMAN G, et al: Transferrin phenotype and level of carbohydrate-deficient transferrin in healthy individuals. *Alcohol Clin Exp Res* 1988; *12*: 450-453