

Gruppo Tossicologi Forensi Italiani-SIMLA

Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT). Linee guida analitiche ed interpretative

F. Tagliaro^a, M. Bernini^b, F. Bortolotti^a, M. Caligara^c, P. Cassandro^d,
N. De Giovanni^e, R. Snenghi^f

^aDip. Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Medicina legale e Medicina del lavoro, Università di Verona

^bDip. Specialità Chirurgiche, Radiologiche e Medico Forensi - U.O. Medicina Legale, Università degli Studi di Brescia

^cDip. Fisiologia Umana, Sez. di Tossicologia Forense, Università di Milano

^dDip. di Medicina Pubblica Clinica e Preventiva, seconda Università degli studi di Napoli

^eIstituto di Medicina Legale e delle Assicurazioni, Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma

^fDip. di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Padova

Linee Guida approvate dal Gruppo Tossicologi Forensi Italiani (GTFI) - SIMLA

Riassunto

La diagnosi di abuso alcolico basata su dati oggettivi rappresenta una necessità sia in ambito clinico che forense. Tra i differenti marcatori di abuso alcolico cronico, la Carbohydrate Deficient Transferrin (CDT) è riconosciuta in tutto il mondo come l'indicatore più affidabile. Tuttavia, ad oggi, molte problematiche relative al reale significato della CDT e all'affidabilità della stessa nella diagnosi di abuso alcolico non hanno trovato una soluzione definitiva, come riportato in numerosi lavori di ricerca e review. Il presente lavoro riporta le Linee Guida del Gruppo Tossicologi Forensi Italiani per l'analisi e l'interpretazione della CDT in ambito clinico e forense.

Summary

Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT). Guidelines for analysis and interpretation

The diagnosis of alcohol abuse based on objective data is a necessary requirement in both clinical and forensic environments. Among the different biomarkers of chronic alcohol abuse, Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) is world wide recognized as the most reliable indicator. However, several problems about the real meaning of CDT and the reliability of its use for the diagnosis of alcohol abuses are still open, as reported by numerous research articles and reviews. The present article reports the guidelines of the Italian Group of Forensic Toxicologists (GTFI) for analysis and interpretation of CDT in both clinical and forensic environments.

Key-words: Carbohydrate-Deficient Transferrin, CDT, analysis, guidelines, alcohol abuse.

Ricevuto: 25-02-2009

Accettato: 04-05-2009*

Publicato on-line: 23-12-2009

*SIMeL ha aderito alle Linee guida approvate da GTFI-SIMLA

Corrispondenza a: Prof. Franco Tagliaro, Università degli Studi di Verona, Unità operativa di Medicina Legale, Policlinico "G.B. Rossi", Piazzale Scuro n. 10, 37134 Verona

1. Introduzione

La diagnosi oggettiva di abuso alcolico assume un rilievo fondamentale in diverse aree della medicina clinica e legale, tra cui la gastroenterologia, la cardiologia, la neurologia e la psichiatria, la medicina del lavoro, la medicina del traffico, la patologia forense, etc.

Oltre all'approccio diagnostico tradizionale basato sulle informazioni anamnestiche, sull'esame clinico, sull'uso di questionari, nonché sull'impiego di alcuni marker biochimici non specifici (enzimi epatici, volume corpuscolare medio), negli anni più recenti l'attenzione a livello internazionale si è spostata su nuovi indicatori di abuso alcolico, come gli addotti proteici dell'acetaldeide, gli esteri etilici degli acidi grassi, l'etilglicuronide, nonché la *carbohydrate deficient transferrin* (CDT).

Quest'ultimo marker è attualmente impiegato in molte sedi nell'Europa Centrale e Settentrionale e si sta rapidamente affermando anche nella realtà italiana, come indicatore affidabile ed estremamente specifico di abuso alcolico cronico.

Il termine CDT è il nome collettivo di un gruppo di isoforme minori della transferrina che presentano un ridotto grado di glicosilazione, la cui concentrazione sierica risulta strettamente correlata all'abuso alcolico cronico o abituale quest'ultimo aggettivo da intendersi nell'accezione non clinica ma medico legale di rischio di ricaduta.

Dalla sua scoperta nel 1978¹, la CDT è presto divenuta oggetto di ricerca sia in area pre-clinica che clinica. Una recente ricerca su PubMed www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi relativa al periodo 1986-2007, usando come termine di ricerca "carbohydrate deficient transferrin" ha permesso di evidenziare 587 articoli. Tra questi sono state identificate numerose reviews relative ai differenti aspetti dell'analisi e dell'interpretazione della CDT. Si ritiene di dover citare in particolare la review pubblicata da Arndt T. nel 2001 relativa ai lavori sulla CDT pubblicati tra il 1976 e il 2000, che è divenuta una pietra miliare sull'argomento², nonché la review pubblicata da Bortolotti F. et al. nel 2006, che copre il periodo tra il 2001 e il 2005³.

Il presente contributo, sarà suddiviso in sezioni e sottosezioni con riferimento ai diversi aspetti pre-analitici, analitici, post-analitici e di interpretazione della CDT.

Nel 2007 una commissione afferente all'International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, IFCC, Working Group on Standardization of Carbohydrate-deficient Transferrin (IFCC-WG-CDT) ha pubblicato un documento contenente indicazioni relative alla standardizzazione metodologica⁴.

2. Definizione e struttura della CDT

La transferrina (Tf) umana è una proteina sierica di trasporto del ferro composta da 679 aminoacidi con due potenziali siti di glicosilazione, Asn-413 e Asn-611, che usualmente legano due catene carboidratiche bi o

triantennarie contenenti 4 differenti carboidrati (N-acetilglucosammina, mannosio, galattosio e acido sialico in sede terminale).

La glicofoma più rappresentata nel siero umano contiene due N-glicani biantennari per un totale di 4 residui di acido sialico (tetrasialo-Tf, pI 5.4); sono inoltre presenti isoforme minori con 2 (disialo-Tf, pI 5.7), 3 (trisialo-Tf, pI 5.6), 5 (pentasialo-Tf, pI 5.2) e 6 (esasialo-Tf, pI 5.0) residui di acido sialico. Infine, possono essere determinate, seppure in tracce nel siero normale, anche isoforme con un solo residuo di acido sialico (monosialo-Tf) o con nessun residuo (asialo-Tf).

Le glicoforme di transferrina CDT-correlate, sulla base di un ampio consenso scientifico, comprendono le isoforme con un punto isoelettrico > 5.7 e quindi asialo-Tf, monosialo-Tf e disialo-Tf, che rappresentano complessivamente, nei soggetti non abusatori di alcol, meno del 2% della transferrina totale.

Alcuni metodi immunometrici per la determinazione della CDT includono nell'analisi quote di trisialo-Tf; su questa base nel passato è stata proposta l'inclusione anche di questa isoforma nella definizione di CDT. Questo ha rappresentato l'oggetto di un dibattito che si è concluso con la decisione di escludere la trisialo-Tf dalla definizione della CDT, dimostrando una sua mancata correlazione con l'abuso alcolico^{2,5-8}.

E' noto che con le tecniche analitiche attualmente disponibili (isoelectrofocusing, elettroforesi capillare e HPLC), la disialo-Tf è determinabile anche in soggetti non abusatori, mentre le frazioni asialo e monosialo-Tf non sono usualmente identificabili. Tuttavia, in presenza di un netto incremento della disialo-Tf, si assiste di norma alla comparsa di concentrazioni determinabili di asialo-Tf. Invece, a dispetto della sua formale inclusione nella definizione teorica della CDT, la monosialo-Tf, non è mai stata chiaramente e sistematicamente associata all'abuso alcolico.

3. Meccanismi fisiopatologici dell'incremento alcol-indotto della CDT

Vi è attualmente un generale accordo sul fatto che la CDT aumenti sopra i livelli "normali" a seguito dell'assunzione di almeno 60-80 g/die di alcol etilico per 10-15 giorni. Tuttavia, ad oggi l'esatto meccanismo con cui l'alcol etilico determina l'aumento delle isoforme carboidrato-deficienti non è ancora completamente compreso. Secondo la letteratura più recente si tratta di un processo complesso che coinvolge sia il trasporto intracellulare di proteine che l'attività enzimatica⁹.

Vi sono inoltre evidenze secondo cui la concentrazione di CDT aumenta, pur rimanendo entro i comuni limiti di normalità, anche in caso di moderato consumo di bevande alcoliche¹⁰.

La concentrazione sierica di CDT si riduce a seguito dell'astinenza da alcol etilico con un'emivita media di circa 15 giorni.

Non è ancora chiarita la variabilità individuale dei meccanismi fisiopatologici che sottendono all'incremento in ragione del consumo alcolico.

Da studi recenti, non risultano significative differenze nelle concentrazioni basali di CDT in differenti aree geografiche, includendo anche quelle aree in cui è noto un deficit dei sistemi ossidativi dell'alcol¹¹.

4. Pre-analisi

Tra le diverse condizioni pre-analitiche potenzialmente idonee ad alterare la CDT, l'uso e il tipo di anticoagulanti, nonché la durata e la temperatura di conservazione del campione sono state oggetto di studi.

In particolare, risulta che la maggior parte degli utilizzatori utilizza quale campione di analisi il siero umano. Tuttavia, considerato il non trascurabile tempo necessario per il completamento dei processi di coagulazione (e la possibilità di contaminazione batterica), è stato proposto l'uso di plasma. A questo riguardo viene raccomandato di non utilizzare quali anticoagulanti EDTA o eparina, che interferiscono con la saturazione ferrica della transferrina². Risulta invece che i gel separatori ed il caolino non interferiscano con l'analisi. Mancano tuttavia studi sufficientemente estesi e pertanto, quando necessario, queste modifiche metodologiche dovranno essere preventivamente validate in sede.

Relativamente alla conservazione del campione, una sintesi della letteratura più recente, integrata dalla nostra esperienza, porta a formulare le seguenti conclusioni.

Il campione può essere conservato a temperatura ambiente fino a 30 ore (studi indicherebbero una stabilità fino a 3-5 giorni, ma tale possibilità sembra irrealistica nella normale pratica di laboratorio), a 4°C per non più di 1-2 settimane e a -20°C per parecchi mesi. Risulta infine che ripetuti cicli di congelamento e scongelamento del medesimo campione non inficiano la determinazione della CDT^{2,12-14}.

Si fa presente comunque che l'eventualità più comune di interferenza sulla determinazione della CDT è rappresentata dallo sviluppo di batteri produttori di neuroaminidasi che determinano una rimozione dei residui glicanici con produzione artificiale di forme a minore glicosilazione. Tale fenomeno è casuale e non sistematico e pertanto devono essere prese cautele per prevenire la contaminazione dei campioni e per ostacolare la crescita batterica.

A questo scopo si raccomanda l'uso di provette sterili per la raccolta del sangue e la refrigerazione del siero nel più breve tempo possibile.

Infine, pur non essendo presenti studi specifici in letteratura, sembra opportuno raccomandare la raccolta del sangue da soggetti a digiuno.

5. Analisi

Successivamente alla prima identificazione delle isoforme della CDT mediante isoelectrofocusing seguita

da immunofissazione e colorazione dei complessi CDT-anticorpo antitransferrina nel liquido cerebrospinale degli alcolisti nel 1978, numerosi altri metodi sono stati proposti per la determinazione di queste glicofor-me della transferrina, tra cui quelli basati sull'impiego dell'elettroforesi capillare, della cromatografia liquida e sulle determinazioni immunometriche² e, più recentemente, sulla spettrometria di massa³.

La separazione molecolare delle isoforme della transferrina è essenzialmente basata sulle differenze di carica dovute alla loro differente composizione. Tali differenze dipendono in primo luogo dal differente contenuto di residui di acido sialico, essendo usualmente determinabili sotto questo punto di vista fino a 6 glicofor-me (da asialo-Tf a pentasialo-Tf) delle nove descritte (da asialo-Tf a octasialo-Tf). Differenze di carica dipendono anche dal differente grado di saturazione ferrica della molecola (0, 1 o 2 atomi di ferro ferrico). Un'ultima fonte di variazione di carica consiste nelle differenze delle sequenze primarie di amminoacidi geneticamente determinate (varianti genetiche).

Al fine di eliminare la più rilevante sorgente di variabilità spuria di carica, vale a dire la differente saturazione ferrica delle molecole, si applica generalmente una preliminare fase di saturazione del campione con ione ferrico. In alternativa, si è anche proposta la completa desaturazione della transferrina mediante dialisi o applicazione di chelanti.

La quantificazione della CDT può essere espressa nei seguenti modi:

1. rapporto percentuale delle isoforme asialo e disialo-Tf sulla tetrasialo-Tf, isoforma più rappresentata della transferrina (CDT index);
2. rapporto percentuale delle isoforme asialo e disialo-Tf sulla transferrina totale (%CDT);
3. percentuale sulla Tf totale o sulla tetrasialo-Tf della sola disialo-Tf;
4. concentrazione assoluta della asialo+disialo-Tf.

Ad oggi, a causa di una migliore comparazione delle informazioni tra metodi immunochimici e metodi separativi strumentali il rapporto percentuale al punto 2 è il preferito. Sarà comunque necessario precisare nel referto il metodo di calcolo utilizzato.

5.1 Metodi Elettroforetici

Fin dalla scoperta della CDT, la tecnica analitica più utilizzata per la sua determinazione è stata l'isoelectric focusing (IEF), seguita da una fase di riconoscimento immunometrico (immunofissazione, immunoblotting etc.)².

Tale approccio analitico, tuttavia, presenta un ineliminabile limite rappresentato dall'inaccuratezza e dall'imprecisione della determinazione quantitativa, basata sulla colorazione off-line e sulla misurazione densitometrica. Per questo motivo tale tecnica è stata progressivamente sostituita da tecniche quantitativamente più accurate come l'elettroforesi capillare e la cromatografia.

tografia liquida. Tuttavia per la sua insuperata selettività, l'IEF è ancora considerata la tecnica di riferimento particolarmente nei casi dove sia necessario ottenere la risoluzione di isoforme della CDT strettamente correlate.

A differenza della separazione in isoelettrofocusing basata sui differenti punti isoelettrici delle glicoforme della transferrina, i metodi in elettroforesi zonale determinano la separazione fisica delle isoforme sulla base del rapporto carica/massa comunque legato al diverso contenuto di acido sialico della proteina.

L'elettroforesi capillare è stata proposta per la prima volta per l'analisi della CDT da Tagliaro et al. nel 1998¹⁵. Il metodo era basato sulla separazione delle isoforme della transferrina in elettroforesi capillare zonale (capillare: 20 µm diametro interno, 37 cm lunghezza) in tampone borato a pH 8.3 con rivelazione UV a 200 nm. Al fine di ridurre l'interazione delle proteine con la parete del capillare, e quindi di migliorare la sensibilità e la selettività analitiche, in una versione migliorata del metodo, pubblicata dallo stesso gruppo nel 2000¹⁶, era aggiunto diaminobutano (DAB) al tampone di separazione.

Più recentemente, Wuyts et al. pubblicavano un metodo che usava reattivi commerciali, tra cui un polianione ed un policatione (CEofix® CDT buffer system, Analis, Namur, Belgium), che forniva un doppio coating dinamico della parete del capillare. Il tampone di separazione conteneva anche ione ferrico che asseritamente permetteva di evitare la fase pre-analitica di saturazione ferrica¹⁷. Questa prima versione commercializzata del metodo non era tuttavia soddisfacente dal punto di vista della risoluzione delle isoforme, per cui è stata successivamente sostituita da versioni più raffinate che comunque prevedevano la saturazione ferrica preliminare e che consentivano una migliore separazione e quantificazione di asialo, disialo, trisialo, tetrasialo e pentasialo-Tf¹⁸.

Tuttavia, solo a seguito di ulteriori ottimizzazioni (2003), il metodo risultava fornire una completa separazione delle componenti della CDT, producendo risultati accurati^{19,20}. Il metodo è ora commercialmente disponibile e distribuito da Analis (Namur, Belgio).

L'elettroforesi capillare ha trovato una nuova applicazione basata sull'impiego di un sistema multicapillare (Capillarys, Sebia, Evry, France), dotato di sette canali paralleli e di un sistema automatizzato di pre-trattamento del campione (saturazione e diluizione) che consente l'analisi diretta di siero (con rivelazione UV a 200 nm). I reagenti (CAPILLARYS™ CDT) sono forniti dallo stesso produttore. Le separazioni, che hanno luogo in capillari di ridotta lunghezza (17 cm) sono particolarmente rapide assicurando, anche grazie al sistema di analisi in parallelo, una elevata produttività. Una valutazione comparativa con metodi in elettroforesi capillare analitica (monocapillare, lunghezza del capillare: 50 cm) ha dimostrato una ottima correlazione dei risultati ($y = 0.981x + 0.2858$ ($R^2 = 0.9523$)) (x: Sebia

data; y: reference CE data), pur con una risoluzione inferiore ed una generale sottostima delle concentrazioni di CDT da parte del sistema multicapillare²¹. Su casi specifici, tuttavia, si è rilevata la presenza di interferenze da matrice che hanno reso problematica la determinazione delle aree dei picchi.

5.2 Metodi Cromatografici

Il primo metodo di determinazione cromatografica della CDT è stato proposto da Jeppsson et al. nel 1993. Il metodo era basato su una separazione a scambio anionico su colonna Mono Q™ HR 5/5 con un gradiente di eluizione salina e rivelazione per assorbimento Uv-Visibile a 460 nm (selettivo per il complesso transferrina-ferro)²².

Questo metodo, inizialmente penalizzato da una incompleta risoluzione delle glicoforme CDT correlate, è stato successivamente adottato, modificato in alcuni dettagli, da vari autori, mostrando superiore selettività, accuratezza, precisione ed affidabilità degli immunoassay con anticorpi non specifici per la CDT²³. In particolare segnaliamo la modifica suggerita da Helander et al. basata sull'impiego di colonne più efficienti (Source® 15Q PE 4.6/100, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)²³.

Recentemente sono stati introdotti metodi commerciali basati su separazioni HPLC Recipe (Munich, Germany), Bio-Rad (Hercules, CA, USA), Chromsystem (Munich, Germany) che propongono separazioni relativamente rapide, al fine di incrementare la produttività, con qualche compromesso in termini di risoluzione delle glicoforme della Tf. La disponibilità di reagenti altamente standardizzati, peraltro, incrementa la trasferibilità dei metodi tra laboratori.

5.3 Metodi Immunometrici

Il primo metodo immunometrico per la determinazione della CDT fu descritto da Stibler et al. nel 1986²⁴. Tale schema analitico, con varianti rilevanti ma non sostanziali, è tuttora diffuso, distribuito sotto differenti nomi commerciali %CDT TIA Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), %CDT (Axis-Shield, Dundee, UK), Tina-quant® %CDT (Roche, Basel, Switzerland).

Non disponendo di anticorpi specifici per le glicoforme CDT correlate, questi metodi richiedono una preliminare estrazione su cartucce a scambio ionico. La fase estrattiva è seguita da una fase di determinazione immunometrica basata su un antisiero anti-Tf umana, realizzata inizialmente mediante radioimmunoassay e successivamente con tecniche non radiometriche (enzyme-immunoassay, immuno-turbidimetria ecc.) più facilmente automatizzabili. La completa automatizzazione della fase estrattiva, invece, non è mai stata realizzata.

Nel 2001 la Food and Drug Administration ha approvato uno di questi immunoassay (%CDT-TIA, Axis Shield Plc, Dundee, UK) per la diagnosi dell'abuso al-

colico²⁵. Anche a seguito di positivi risultati di test multicentrici²⁶⁻²⁸, il descritto schema analitico immunometrico è stato estesamente utilizzato specialmente in ambiente clinico, pur se notoriamente penalizzato dalla mancanza di specificità degli antisieri e dalla scarsa selettività della separazione su cartucce monouso.

L'inaccuratezza analitica degli immunoassay per la CDT è stata chiaramente dimostrata da Alden et al.²⁹ In questo studio, sono stati analizzati mediante un immunoassay (Axis Shield) 430 sieri, i cui eluati sono stati mescolati e quindi sottoposti ad analisi HPLC al fine di determinare la percentuale delle differenti isoforme, ottenendo i seguenti risultati: asialo-Tf 1.5%, disialo-Tf 70.7% and trisialo-Tf 27.8%. Sulla base di questi risultati, gli autori concludevano che la presenza di trisialo-Tf può generare risultati falsamente elevati. Da questo esperimento risulta spiegata l'osservazione empirica di frequenti risultati falsamente elevati della CDT³⁰ ottenuti con una versione commerciale dell'immunoassay, erroneamente attribuiti da questo autore ad incrementi della monosialo-Tf.

Una seconda fonte di inaccuratezza dell'immunoassay, ben segnalata in letteratura, è rappresentata dalla presenza di varianti genetiche della transferrina, caratterizzate da variazioni nella sequenza primaria, che causano una variazione della carica totale della proteina. Di queste si distinguono quelle di tipo B (anodiche) e quelle di tipo D (catodiche), essendo la transferrina comune di tipo C. In uno studio su oltre 1600 sieri, Helander et al.³⁰ ha dimostrato che i sottotipi della forma C non interferivano con l'immunoassay, mentre le eterozigosi BC e CD (circa l'1% del campione) erano associate, rispettivamente, con sottostime e sovrastime.

La scarsa affidabilità quantitativa dell'immunoassay, particolarmente per i campioni attorno al cut-off utilizzato per identificare l'abuso alcolico, è anche provata da studi comparativi tra metodi immunometrici e metodi separativi diretti quali l'elettroforesi capillare e l'HPLC³¹⁻³⁴. Su questa base gli autori suggeriscono, secondo un approccio tipico della tossicologia forense³⁵, una sistematica conferma con tecnica alternativa strumentale (HPLC o elettroforesi capillare) dei campioni risultati positivi all'immunoassay.

Più recentemente (Gennaio 2005) Dade Behring (Deerfield, IL, USA) ha introdotto un nuovo immunoassay per la CDT, presentato come il primo metodo immunometrico diretto (N Latex CDT assay). La base innovativa è rappresentata dall'impiego del primo antisiero specifico per epitopi della molecola della transferrina che sono accessibili solo nelle isoforme CDT correlate, mentre sono protetti da residui oligosaccaridici nelle forme a maggiore indice di glicosilazione. La rivelazione è su base nefelometrica. A causa della sua elevata specificità, il metodo non richiede alcuna fase di estrazione e può quindi essere completamente automatizzato. Inoltre, essendo la reazione Ag-Ab basata sullo stato di glicosilazione degli epitopi e non sulla

sequenza primaria o sulla carica della proteina, le varianti B o D della transferrina non dovrebbero determinare alcuna interferenza. Il metodo ad oggi è ancora in fase di validazione sul campo da parte degli utilizzatori, ma i primi lavori sembrano molto incoraggianti³⁶. Dovrà comunque essere ulteriormente studiata la correlazione tra i risultati di questo metodo e quelli dei classici metodi strumentali di conferma, che ad oggi non ha ancora una sufficiente base di letteratura.

5.4 Metodi in spettrometria di massa

L'impiego della tecnologia MALDI-TOF per lo studio della Tf umana è stato proposto per chiarire la struttura delle unità saccaridiche della glicoproteina⁸.

La spettrometria MALDI-TOF è stata anche utilizzata per caratterizzare le proteine eluite dalle cartucce di estrazione del kit immunometrico Axis Shield, portando ancora una volta alla conferma che tale procedura estrattiva della CDT era contaminata da una quota consistente di trisialo-Tf (isoforma non alcol correlata)²⁹.

La capacità identificativa della spettrometria di massa, in uno schema HPLC-ESI-MS, è stata utilizzata al fine di studiare le isotransferrine anomale di un gruppo di malattie note come Congenital Disorders of Glycosylation (CDGs)³⁷. Tuttavia, la tecnica non sembra ancora idonea a studi quantitativi e pertanto all'impiego nella determinazione della CDT quale marker di abuso alcolico.

Un approccio alternativo, basato sull'accoppiamento HPLC-ICPMS, consente la determinazione della CDT mediante misurazione selettiva del ferro contenuto nella transferrina³⁸. Tuttavia questo approccio ad oggi rimane meramente sperimentale.

6. Interpretazione dei dati

L'impiego dei risultati dei metodi di determinazione della CDT a fini diagnostici implica alcune approssimazioni la cui validità deve essere oggetto di adeguata valutazione.

Innanzitutto la classificazione dei soggetti sottoposti ad analisi in categorie (normali, abusatori, alcolisti, social drinkers ...) comporta la trasformazione di dati a distribuzione continua in dati a distribuzione discontinua. Tale processo viene eseguito utilizzando griglie interpretative (cut-off, livelli decisionali, ...) la cui scelta si basa su criteri "politici" che non dipendono dalle performances analitiche, ma piuttosto dalle esigenze diagnostiche.

In secondo luogo, l'affidabilità diagnostica di un indicatore non può non essere legata alla affidabilità analitica, nel senso che un metodo inaccurato non potrà mai fornire risultati affidabili dal punto di vista diagnostico, per quanto il marker in questione possa essere di per sé sensibile e specifico.

Queste considerazioni di rilievo generale si applicano in maniera particolarmente pregnante all'analisi del-

la CDT quale indicatore di eccessivo consumo alcolico.

Preliminarmente alla valutazione diagnostica di questo indicatore, infatti, si dovrebbe stabilire quale sia da considerare nei diversi ambiti il consumo "eccessivo" di alcol sia dal punto di vista quantitativo che modale. Questo, in realtà, è stato definito con un accettabile grado di confidenza solo in ambito medico/psichiatrico dove il limite stabilito è quello al di sopra del quale, in presenza di consumo cronico, è possibile prevedere lo sviluppo di complicanze fisiche, psichiche o sociali. Tale limite corrisponde a circa 80 g di alcol al giorno per i maschi e a circa 60 g per le femmine.

Ovviamente le considerazioni che sono state alla base dell'identificazione di questi limiti, non si possono adottare acriticamente in altri ambiti, in cui l'abuso alcolico deve essere escluso quali l'idoneità alla guida, al lavoro, al porto d'armi, all'affidamento dei figli, etc.

Per queste ragioni la scelta dei criteri decisionali è particolarmente delicata e richiede una accurata scelta delle procedure statistiche alla base degli stessi.

6.1 Specificità e Sensibilità diagnostiche della CDT

La grande maggioranza degli studi applicativi pubblicati recentemente sulla CDT riguarda la valutazione della sensibilità e specificità diagnostiche di questo marker spesso a confronto con marker più tradizionali di abuso alcolico quali la GGT e il volume corpuscolare medio (MCV).

Al fine di riassumere in modo comparativo la vasta letteratura sull'argomento, questa è stata condensata in Tabelle allegate.

La Tabella I raccoglie i lavori dedicati ai principali parametri (sensibilità, specificità, valore predittivo e area sotto la curva ROC) che esprimono l'affidabilità diagnostica della CDT ai fini dell'identificazione dell'abuso alcolico.

La Tabella II riassume le condizioni patologiche o fisiologiche nelle quali sono stati segnalati "falsi positivi" per CDT. Nel passato, incrementi di CDT sono stati segnalati in condizioni varie e generalmente non correlate con difetti della glicosilazione proteica quali gravidanza, uso di estroprogestinici, cirrosi biliare, epatite cronica, galattosemia, etc.². Tuttavia, tali osservazioni non hanno mai avuto una conferma adeguata nella letteratura e possono ragionevolmente essere attribuite ad insufficienze della tecnologia analitica legata all'impiego di immunoassay a scarsa specificità.

Si sottolinea in particolare come la patologia epatica non interferisca nella determinazione della CDT a meno che non sia associata ad un grave deficit della sintesi di transferrina che comunque comporta la produzione di traccianti con distribuzione non interpretabile delle glicoforme.

La Tabella III riassume le condizioni potenzialmente causa di "falsi negativi".

Relativamente ai dati riportati nelle Tabelle di cui sopra, al fine di una migliore comprensione delle discor-

danze risultanti, si devono sottolineare alcuni punti.

1. Spesso l'entità del consumo individuale di alcol, la cui conoscenza è un necessario pre-requisito per calcolare la sensibilità e specificità diagnostiche del test, è ricavata dalle dichiarazioni personali dei soggetti o da questionari la cui affidabilità, fuori dall'ambito clinico, è discutibile. Tale approccio può portare ad un bias nella stima del consumo alcolico.
2. Il limite tra assunzione quotidiana di alcol "normale" e "anormale" può variare in maniera importante da una regione all'altra e tra le diverse culture.
3. In alcuni studi le performance diagnostiche della CDT sono valutate nei confronti degli "heavy drinkers", mentre in altri nei confronti dei "light", "moderate" or "hazardous drinkers". Tali differenze ostacolano la valutazione complessiva dei risultati dei differenti studi.
4. Nella maggior parte degli studi la CDT è determinata mediante metodi immunometrici, la cui complessità, scarsa standardizzazione, bassa selettività analitica e scarsa precisione, come sopra discusso, possono spiegare le discrepanze tra i differenti studi.

6.2 Differenze sessuali e razziali nella concentrazione di CDT

Nel passato, molti studi riportavano differenze sessuali nella concentrazione di CDT nella popolazione normale con medie solitamente superiori nelle femmine rispetto ai maschi, spesso senza raggiungere una significatività statistica e senza fornire spiegazioni soddisfacenti di questo fenomeno vedi citazione n. 2.

In alcuni lavori, queste differenze fra generi sono state attribuite ad incrementi isolati della monosialo-Tf. Altri lavori segnalerebbero una più bassa prevalenza di valori elevati di CDT nelle donne alcoliste rispetto ai maschi, ipotizzando una minore sensibilità diagnostica del test nel sesso femminile³⁹⁻⁴³. D'altro canto, altri autori hanno riportato valori di CDT più alti nelle donne alcoliste che nei maschi⁴⁴. Queste osservazioni, sostanzialmente discrepanti, possono essere giustificate sia con la debolezza dei criteri di classificazione adottati nella formazione dei gruppi studiati, sia con l'impiego di metodi poco accurati dal punto di vista analitico.

Ad oggi, dunque, non esistono motivi scientifici solidi per ritenere che esista una significativa differenza nei livelli medi di CDT nella popolazione sana.

Relativamente alle differenze razziali, studi recenti porterebbero ad escludere l'esistenza di un bias interrazziale significativo nei livelli normali di CDT¹¹.

6.3 CDT e γ -glutamilttransferase

La GGT è uno tra i più classici parametri chimico-clinici utilizzati nella diagnostica delle patologie epatiche associate all'abuso alcolico e la sua affidabilità in questo ambito è assicurata da decenni di impiego clinico. Su questa base numerosi studi hanno valutato il confronto o l'uso integrato di CDT e GGT.

A questo proposito Sillanauke and Olsson⁴⁵ sulla base

di una meta-analisi di studi clinici che comprendeva 1412 casi concludevano che nella discriminazione tra abusatori di alcol e social drinkers l'uso combinato di CDT e GGT era migliore che l'uso singolo di ciascun marker (CDT, GGT, AST, ALT and MCV) e degli altri marker in combinazione.

Considerata la fisiopatologia dell'incremento della GGT conseguente ad una alterazione anatomico-biochimica epatica, sembrano assai ragionevoli le conclusioni di Schwan et al.⁴⁶, che, sulla base di uno studio longitudinale multicentrico, raccomanda l'uso della CDT come marker biologico di screening dell'abuso alcolico e la GGT come indicatore di dipendenza nei soggetti con elevata CDT.

7. Uso clinico della CDT

L'uso clinico della CDT è stato provato nei trattamenti di disintossicazione da abuso alcolico dove questo marker, determinato longitudinalmente, si è dimostrato superiore alla GGT e all'MCV nell'identificazione delle ricadute^{47,48}, nella identificazione della pancreatite alcol-correlata⁴⁹⁻⁵¹ e dell'epilessia alcol correlata^{52,53}, nonché nella diagnosi di emorragia intracranica alcol correlata⁵⁴.

E' inoltre ben noto come la CDT sia il più tipico indicatore della Carbohydrate Deficient Glycoprotein Sindrome (CDGS), un gruppo di gravi patologie neurologiche caratterizzate da difetti genetici della glicosilazione proteica².

Recenti studi indicherebbero alterazioni della CDT in altre patologie della glicosilazione come la malattia ostruttiva polmonare cronica (COPD)⁵⁵ o in patologie in cui l'attività dell'enzima neuroaminidasi è aumentata come nelle malattie settiche⁵⁶.

Un aumento della CDT è stato ipotizzato nella anoressia nervosa⁵⁷. In realtà, successivamente, mediante l'impiego di tecniche analitiche separative, è stato dimostrato che nei soggetti affetti da anoressia nervosa la concentrazione delle isoforme CDT correlate rimaneva normale, mentre si assisteva ad un aumento della trisialo-Tf⁵⁸.

8. Uso forense della CDT

In ambito patologico forense, particolare interesse si è dimostrato alla determinazione della CDT sui fluidi cadaverici per dimostrare una pregressa storia di abuso alcolico. Gli studi disponibili in letteratura indicherebbero che il liquido cadaverico è idoneo, qualora le interferenze dell'emolisi siano eliminate, alla determinazione della CDT^{59,60}.

Al medesimo scopo è stato anche riportato l'impiego dell'umor vitreo, anche se le concentrazioni molto inferiori rispetto al siero impongono l'uso di tecniche ad elevatissima sensibilità^{61,62}.

In realtà, l'applicazione di gran lunga più diffusa in ambito forense riguarda l'impiego della CDT quale indicatore di abuso alcolico nelle procedure di accertamento dell'idoneità al lavoro e al conseguimento/rinnovo della patente di guida.

mento dell'idoneità al lavoro e al conseguimento/rinnovo della patente di guida.

A questo riguardo Seidl ha dimostrato una elevata specificità del test pur in presenza di un basso valore predittivo negativo⁶³. Inoltre studi più recenti hanno dimostrato come una elevata percentuale dei soggetti incorsi in infrazioni stradali o incidenti sotto l'effetto di alcol presentino elevati valori di CDT, corroborando dunque l'ipotesi che la CDT sia un valido indicatore del rischio di guida in stato di ebbrezza alcolica⁶⁴⁻⁶⁶.

Nell'ambito dell'uso forense preme ribadire come l'accertamento debba essere eseguito in Centri che possano garantire un'adeguata catena di custodia (inclusa la necessità di conservare il campione per eventuali nuove analisi di revisione), nonché uno schema analitico che preveda accertamento di screening e determinazione di conferma eseguiti con tecniche basate su principi chimico-fisici sostanzialmente diversi.

Appare infine necessario sottolineare come, per una corretta diagnosi di abuso alcolico cronico nell'ambito degli accertamenti di idoneità alla patente di guida, l'utilizzo della CDT debba comunque essere inserito in un più ampio protocollo clinico-laboratoristico, come indicato dalle linee guida approvate dalla SIMLA e dal GTFI e recentemente pubblicate⁶⁷.

9. Quantificazione e valori di cut-off per la CDT

La quantificazione della CDT, mancando uno standard internazionale, non può essere eseguita in modo confrontabile in termini assoluti. L'unica espressione trasferibile tra laboratori, che ovvia inoltre alla variabilità della transferrina totale, è quella percentuale.

In ragione di difficoltà analitiche, ora in gran parte superate, la CDT è generalmente espressa come percentuale delle isoforme della transferrina CDT correlate sulla transferrina totale (%CDT). Un modo alternativo, ma storicamente accettato è quello di rapportare la CDT alla isoforma della transferrina più rappresentata, vale a dire la tetrasialo-Tf (CDT index). Se questa modalità di espressione fornisce, per la minore complessità di formazione del denominatore (una sola isoforma in confronto a tutte le isoforme della transferrina), valori meno soggetti a variabilità, si deve ammettere che la modalità %CDT è più largamente utilizzata e pertanto consente una maggiore trasferibilità dei risultati.

Come anticipato nella parte introduttiva di questa sezione, l'adozione di cut-off pone problemi sia di natura analitica che interpretativa.

Dal punto di vista analitico si deve ricordare come preliminarmente alla definizione dei valori di cut-off, soprattutto in fase di esami di conferma, sia la dimostrazione della accuratezza dell'analisi. E' quindi essenziale, ai fini di un uso dei risultati anche in sedi diverse da dove sono stati prodotti, che le determinazioni siano eseguite con metodi altamente accurati, che quindi riflettono il valore "vero" dell'analita.

Dal punto di vista interpretativo, dobbiamo ricordare ancora una volta che qualsiasi metodo per il calcolo del cut-off (identificazione di gruppi di soggetti "normali", curve ROC, etc.) non può prescindere dalla preliminare definizione dello scopo per il quale detto cut-off si deve applicare.

Inoltre, date le notevoli differenze culturali e geografiche del consumo delle bevande alcoliche, i cut-off debbono essere definiti o quanto meno riverificati lo-

calmente.

Pur non esistendo una consolidata letteratura a proposito, si ammette che i cut-off più accettati sono nell'intorno di 1,8-2,0% nei metodi separativi a intorno a 2,5% nei metodi immunometrici. Le ragioni di questa differenza stanno probabilmente in interferenze ineliminabili determinate dalle isoforme principali (che rappresentano oltre il 90% della transferrina) sulla determinazione immunologica.

Tabella I. Accuratezza diagnostica della CDT nella diagnosi di abuso alcolico (AUROC: area sotto la curva ROC; PPV: valore predittivo positivo; PPN: valore predittivo negativo).

Bibliografia	Soggetti studiati	Metodo analitico	AUROC	PPV	PPN	Specificità	Sensibilità
68	183 maschi che bevevano una media di 20 drink al giorno	CDT-RIA				96%	58%
69	47 alcolisti che bevevano più di 100 g/giorno e 34 soggetti astinenti					91%	
40	Pazienti ospedalizzati con problemi alcol correlati.		0.76			75%	71% (maschi) 65% (femmine)
70	53 soggetti di controllo (assunzione quotidiana di alcol < 20 g), 29 alcolisti cronici (assunzione quotidiana di alcol > 40 g), 24 pazienti non alcolisti con epatite cronica C, 22 pazienti con epatite C e abusatori di alcol.	%CDT-TIA (Axis Shield)				87.8%	72%
71	188 alcolisti e 132 pazienti di controllo	%CDT-TIA (Axis Shield)				98%	48%
72	Bevitori a rischio (25 maschi and 25 femmine) che bevevano 350 g (maschi) and 225 g (femmine) di alcol alla settimana o che bevevano in maniera esagerata 1-2 giorni al mese nei passati 12 mesi.	CDTect (Pharmacia)		14%		100% (maschi) 71% (femmine)	
73	57 non bevitori, 77 bevitori moderati (consume di alcol < 210 g/settimana), 139 forti bevitori (consume di alcol > 210 g/settimana) classificati sulla base di interviste validate strutturate e diari quotidiani anonimi.	HPLC		0.87		90%	63%
		CDTect (Biorad)		0.72		90%	33%
74	29 maschi ricoverati classificati come abusatori di alcol (19) e alcol dipendenti (10) sulla base del DSM-III-R						10%
75	Maschi valutati per intervento chirurgico del tratto digestivo superiore. Diagnosi di abuso alcolico sulla base del DSM-III-R						CAGE question-naire + CDT 85%
41	33 alcolisti con malattia epatica, che avevano una storia di continuo uso di alcol > 80 g/giorno and 29 alcolisti senza malattia epatica che consumavano una media di 131 g/giorno; 45 social drinkers sani e astinenti	%CDT-TIA (Axis Shield) CDTect-RIA (Pharmacia)				100% per gli uomini; 91% per le donne 63% per gli uomini; 46% per le donne	96% for gli uomini; 87% per le donne 65% per gli uomini; 36% per le donne

<i>Bibliografia</i>	<i>Soggetti studiati</i>	<i>Metodo analitico</i>	<i>AUROC PPV</i>	<i>PPN</i>	<i>Specificità</i>	<i>Sensibilità</i>
76	80 soggetti di controllo e 33 alcolisti con un consumo alcolico giornaliero > 60 g nelle ultime 4 settimane.	ChronAlcol. D (Sangui Biotech Inc.)			Maschi: 96.7 Femmine: 88	Maschi: 88.2 Femmine: 60
77	47 pazienti con malattia epatica alcolica (classificati sulla base di analisi biochimiche e istologiche e sulla base di una storia di consumo alcolico maggiore di 60 g/day per almeno 5 anni); 26 pazienti con epatite steatosica non alcolica, 22 con altre malattie epatiche e 21 soggetti sani.	Affinity purification and ISF with densitometry of Coomassie stained transferrins	0.92			
78	614 volontari classificati sulla base di interviste e abitudini alcoliche autoriferite e punteggi AUDIT come abusatori di alcol (che consumavano più di 50 g/giorno di etanolo da almeno 3 mesi, n= 413) o come bevitori moderati (<30 g/giorno di etanolo; n= 201)	CZE (Ceofix Analis) Cut-offs: 1.2% 2.6% 2.8% 3.0%			92% 74% 83% 90%	73% 77% 67% 63%
79	36 forti abusatori ricoverati per trattamento di detossificazione e 30 soggetti di controllo.	%CDT-TIA (Axis Shield) CDTect (Pharmacia)				69% 61%
80	Studio multicentrico comprendente gruppi di pazienti "abusatori", "dipendenti" e "controlli" sulla base dei criteri del DSM IV	%CDT-TIA (Biorad)			83%	Abuso alcolico: 80% Dipendenza alcolica: 91%
81	396 donne e 403 uomini di età compresa tra 30 e 60 anni. 45 incontravano i criteri del DSM-IV per abuso alcolico (più di 14 drink alla settimana) and 17 incontravano i criteri del DSM-IV per dipendenza alcolica.	%CDT-TIA (Biorad) Cut-off: 2.6%	0.83		85%	61%
82	Studio trasversale nella Germania nord-orientale con raccolta dei dati dal 1997 al 2001 of 4310 uomini e donne intervistati circa il loro recente consumo alcolico.			Per consumo alcolico ad alto rischio < 50%		
83	581 giovani uomini di 19 anni sottoposti a visita di leva. Sulla base dell'auto-riferito consumo alcolico indagato mediante un questionario, il 20.8% dei soggetti era classificato come forte abusatore (>21 drinks/settimana negli ultimi 12 mesi o ubriachi per almeno tre volte al mese); 74.9% come bevitore moderato (6 drinks/settimana) and 4.3% come astinente.	%CDT-TIA (Biorad) Cut-off: 2.2% CZE (Ceofix, Analis) Cut-off: 0.62	0.66		63.2%	58.7%
84	50 pazienti alcol dipendenti ricoverati presso il centro di detossificazione e 85 astinenti	%CDT-TIA Cut-off 2.2% per i maschi and 2.5% per le femmine	0.94			

<i>Bibliografia</i>	<i>Soggetti studiati</i>	<i>Metodo analitico</i>	<i>AUROC PPV</i>	<i>PPN</i>	<i>Specificità</i>	<i>Sensibilità</i>
85	75 pazienti trattati per dipendenza alcolica	%CDT-TIA (Biorad)	0.98			
86	Campione random di 130 pazienti indagati mediante intervista diagnostica.			80%	85%	96%
87	101 pazienti alcol dipendenti, 115 social drinkers, 46 pazienti con incremento aspecifico di GGT, 51 pazienti con l'epatite and 20/31 pazienti con cirrosi non alcolica/alcolica	Tina-quant %CDT-2 nd generation (Roche) Cut-off: 3%			93.5% in pazienti con aspecifico incremento delle GGT, 88.2% in pazienti con l'epatite e 70% in pazienti con cirrosi non alcolica	73.3% per i pazienti alcol dipendenti
88	47 pazienti non alcolisti (<280 g/alcol/ settimana e senza disordini alcol correlati); D 67 alcolisti con uso rischioso (>560 g/alcol/ settimana e disordini alcol correlati)	ChronAlcol. (Sangui Biotech) Cut-off: 3 U/L	0.91			63%
89	102 alcolisti, 34 volontari sani sia social drinkers che astinenti	%CDT e CD'Tect	0.86			
90	76 pazienti con malattia alcolica epatica (criteri dell'associazione cinese medica), 55 pazienti alcolisti, 32 pazienti con malattia epatica non alcol correlata	IEF con immunofissazione e colorazione Blue Comassie			71.9% in pazienti con malattia epatica alcolica	93.4% in pazienti con malattia epatica alcolica
91	29 pazienti alcol dipendenti, 28 abusatori di alcol and 28 social drinkers identificati sulla base di MAST, CAGE e AUDIT tests				93% per dipendenza alcolica e abuso di alcol	41% per dipendenza alcolica 32% per abuso di alcol
92	633 pazienti seguiti da un centro di salute divisi in 5 categorie: 1, pazienti che bevevano più di 30 g al giorno per le donne e più di 50 g/giorno per gli uomini; 2, pazienti ricaduti; 3, bevitori moderati; 4, pazienti svezati da meno di un mese; 5, pazienti svezati da più di un mese.				71-96%	32-92%

Tabella II. Condizioni cliniche che portano a diagnosi falsamente positive di abuso alcolico.

<i>Bibliografia</i>	<i>Condizioni cliniche</i>	<i>Soggetti studiati</i>	<i>Metodo analitico</i>	<i>Risultati</i>
93	Malattia epatica in fase terminale	79 pazienti astinenti malattia epatica negli stadi terminali (astinenza investigate mediante interviste e determinazioni random dell'alcolemia)	%CDT-TIA	50% dei pazienti mostravano risultati falsamente positivi
94	Malattia catabolica conseguente a disordini psichiatrici	11 pazienti femmine che riferiscono perdita di peso nelle ultime settimane o che mostrano chiari segni clinici di malattia	%CDT-TIA Cut-off: 6%	6/11 pazienti mostravano elevati livelli di CDT
95	Uso di farmaci anti-epilettici	Pazienti neurologici sottoposti a intervista clinica semistrutturata comprensiva del consumo alcolico negli ultimi 8 giorni.	%CDT-TIA and CD'Tect	falsi positivi con < %CDT-TIA che con CD'Tect

Bibliografia	Condizioni cliniche	Soggetti studiati	Metodo analitico	Risultati
96	Epatite autoimmune Tipo 1	Ragazzo di 15 anni con un'epatite autoimmune di tipo 1, il cui diniego di consume alcolico era confermato da sua madre e da AUDIT e MALT-F punteggi	ChronAlcol.D. %CDT-TIA isoelectric focusing immunofixati on - silver staining	CDT 3.2% CDT 3.2% Aumento di disialo-TF, no asialo-Tf, no varianti genetiche della transferrina
97	Malattia epatica avanzata	44 pazienti sottoposti a trapianto epatico ortotipico per cirrosi. La valutazione pre-trapianto per problemi alcol correlati eseguita da uno specialista psicologo era negativa. Era eseguito monitoraggio pre e post-trapianto.	CDT-RIA	80% dei pazienti mostravano significativi incrementi della CDT.

Tabella III. Condizioni in grado di ridurre la concentrazione sierica di CDT.

Bibliografia	Condizioni cliniche	Soggetti studiati	Metodo analitico	Risultati
42	Terapia con angiotensin II receptor blockers	799 pazienti a cui era stata prescritta terapia farmacologica per l'ipertensione, il diabete e disordini dislipidemici. Per ciascun paziente erano determinati i livelli di %CDT, nonché registrati la storia di consumo alcolico degli ultimi 30 giorni, i sintomi di alcol abuso e alcol dipendenza, lo stato di salute e farmaci prescritti	%CDT-TIA (Axis Shield)	Abbassamento dei livelli di CDT
98	Contenuto totale di acqua	730 uomini e 613 donne partecipanti allo studio WHO/ISBRA sui state e trait markers di alcolismo.	%CDT-TIA (Axis Shield)	Aggiustamenti del contenuto totale di acqua aumentano significativamente le performance diagnostiche della CDT

Bibliografia

- H. Stibler, C. Allgulander, S. Borg, K.G. Kjellin, *Acta Med. Scand.* 204 (1978) 49-56.
- T. Arndt, *Clin. Chem.* 47 (2001) 13-27.
- F. Bortolotti, G. De Paoli, F. Tagliaro, *J Chromatogr B* 841 (2006) 96-109.
- J.O. Jeppsson, T. Arndt, F. Schellenberg, J.P. Wielders, R.F. Anton, J.B. Whitfield, A. Helander, *Clin. Chem. Lab. Med.* 45 (2007) 558-62.
- T. Arndt, A. Korzec, M. Bar, J. Kropf, *Med. Sci. Monit.* 8 (2002) 411-418.
- A. Korzec, T. Arndt, M. Bar, M.W.J. Koeter, *Laboratoriu-smedizin* 25 (2001) 407-410.
- H.R. Bergen, J.M. Lacey, J.F. O'Brien, S. Naylor, *Anal. Biochem.* 296 (2001) 122-129.
- C. Flahaut, J.C. Michalski, T. Danel, M.H. Humbert, A. Klein, *Glycobiology* 13 (2003) 191-198.
- P. Sillanaukee, N. Strid, J.P. Allen, R.Z. Litten, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25 (2001) 34-40. Review.
- E. Randell, E.P. Diamandis, D.M. Goldberg, *J. Clin. Lab. Anal.* 12 (1998) 92-97.
- J.P. Bergström, A. Helander, *Clin. Chim. Acta.* 388 (2008) 59-67.
- O. Martensson, E. Schink, R. Brandt, *Clin. Chem.* 44 (1998) 2226-2227.
- H. Kohler, A. West, B. Brinkmann, *Int. J. Legal Med.* 113 (2000) 121-122.
- B.M.R. Appenzeller and R. Wennig, *Clin. Chem.* 51 (2005) 2159-2162.
- F. Tagliaro, F. Crivellente, G. Manetto, I. Puppi, Z. Deyl, M. Marigo, *Electrophoresis.* 19 (1998) 3033-3039.
- F. Crivellente, G. Fracasso, R. Valentini, G. Manetto, A.P. Riviera, F. Tagliaro, *J. Chromatogr. B* 739 (2000) 81-93.
- B. Wuyts, J.R. Delanghe, I. Kasvosve, A. Wauters, H. Neels, J. Janssens, *Clin. Chem.* 47 (2001) 247-255.
- F.J. Legros, V. Nuyens, E. Minet, P. Emonts, K.Z. Bou-djeltia, A. Courbe, J.L. Ruelle, J. Colicis, F. de L'Escaille, J.P. Henry, *Clin. Chem.* 48 (2002) 2177-2186.
- C. Lanz, W. Thormann, *Electrophoresis* 24 (2003) 4272-4281.

20. C. Lanz, M. Kuhn, V. Deiss, W. Thormann, *Electrophoresis* 25 (2004) 2309-2318.
21. F. Bortolotti, G. De Paoli, J.P. Pascali, F. Tagliaro. *Clin. Chim. Acta* 380 (2007) 4-7.
22. J.O. Jeppsson, H. Kristensson, C. Fimiani, *Clin. Chem.* 39 (1993) 2115-2120.
23. A. Helander, A. Husa, J.O. Jeppsson, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1881-1890.
24. H. Stibler, S. Borg, M. Joustra *Alcohol Clin. Exp. Res.* 10 (1986) 535-544.
25. R.F. Anton, C. Dominick, M. Bigelow, C. Westby, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1769-1775.
26. A. Helander, *Alcohol Alcohol.* 37 (2002) 209-212.
27. M.J. Schwarz, I. Domke, A. Helander, P.M. Janssens, J. Van Pelt, B. Springer, M. Ackenheil, K. Bernhardt, G. Weigl, M. Soyka, *Alcohol Alcohol.* 38 (2003) 270-275.
28. F. Schellenberg, R. Schwan, L. Mennetrey, M.N. Loiseaux, J.C. Pages, M. Reynaud, *Alcohol Alcohol.* 40 (2005) 531-534.
29. A. Alden, S. Ohlson, P. Pahlsson, I. Ryden, *Clin. Chim. Acta* 356 (2005) 143-146.
30. A. Helander, G. Eriksson, H. Stibler, J.O. Jeppsson, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1225-1233.
31. F. Bortolotti, F. Tagliaro, F. Cittadini, R. Gottardo, M. Trettene, M. Marigo, *Forensic Sci. Int.* 128 (2002) 53-58.
32. A. Helander, M. Fors, B. Zakrisson, *Alcohol Alcohol.* 36 (2001) 406-412.
33. F. Bortolotti, G. De Paoli, J.P. Pascali, M.T. Trevisan, M. Floreani, F. Tagliaro, *Clin. Chem.* 51 (2005) 2368-2371.
34. A. Helander, J.P. Wielders, R. Te Stroet, J.P. Bergstrom, *Clin. Chem.* 51 (2005) 1528-1531.
35. T. Arndt, J. Kropf, *Clin. Chem.* 48 (2002) 2072-2074. Review.
36. J.R. Delanghe, A. Helander, J.P. Wielders, J.M. Pekelharig, H.J. Roth, F. Schellenberg, C. Born, E. Yagmur, W. Gentzer, H. Althaus, *Clin. Chem.* 53 (2007) 1115-21.
37. P. Kleinert, T. Kuster, S. Durka, D. Ballhausen, N.U. Bosshard, B. Steinmann, E. Hanseler, J. Jaeken, C.W. Heizmann, H. Troxler, *Clin. Chem. Lab. Med.* 41 (2003) 1580-1588.
38. M.E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, J. Meija, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5615-5621.
39. N.B. Figlie, A.A. Benedito-Silva, M.G. Monteiro, M.L. Souza-Formigoni, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26 (2002) 1062-1069.
40. A. Gomez, A. Conde, J.A. Aguiar, J.M. Santana, A. Jorin, P. Betancor, *Alcohol Alcohol.* 36 (2001) 266-270.
41. P. Anttila, K. Jarvi, J. Latvala, J.E. Blake, O. Niemela, *Alcohol Alcohol.* 38 (2003) 415-420.
42. M.P. Mundt, C.K. Kraus, M.F. Fleming, *Pharmacotherapy* 24 (2004) 831-837.
43. T. Laatikainen, H. Alho, E. Vartiainen, P. Jousilahti, P. Sillanaukee, P. Puska, *Alcohol Alcohol.* 37 (2002) 282-288.
44. M.R. Rukstalis, K.G. Lynch, D.W. Oslin, H.M. Pettinati, S.M. Anderson, J.R. Volpicelli, R.F. nton, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26 (2002) 1539-1544.
45. P. Sillanaukee, U. Olsson, *Clin. Chem.* 47 (2001) 681-685.
46. R. Schwan, E. Albuissou, L. Malet, M.N. Loiseaux, M. Reynaud, F. Schellenberg, G. Brousse, P.M. Llorca, *Drug Alcohol Depend.* 74 (2004) 273-279.
47. H. Myrick, S. Henderson, R.F. Anton, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25 (2001) 1330-1334.
48. H. Walter, I. Hertling, N. Benda, B. Konig, K. Ramskogler, A. Riegler, B. Semler, A. Zoghalmi, O.M. Lesch, *Alcohol* 25 (2001) 189-194. Review.
49. G. Basterra, M.A. Casi, P. Alcorta, R. Diaz de Otazu, M. Alvarez, F. Garcia Campos, *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 93 (2001) 529-534.
50. J.R. Aparicio, J.A. Viedma, L. Aparisi, S. Navarro, J. Martinez, M. Perez-Mateo, *Am. J. Gastroenterol.* 96 (2001) 1777-1781.
51. A.Z. Al-Bahrani, B.J. Ammori, *Clin. Chim. Acta* 362 (2005) 26-48.
52. G. Brathen, *Tidsskr Nor. Laegeforen.* 123 (2003) 1536-1538.
53. G. Brathen, E. Ben-Menachem, E. Brodtkorb, R. Galvin, J.C. Garcia-Monco, P. Halasz, M. Hillbom, M.A. Leone, A.B. Young, *Eur. J. Neurol.* 12 (2005) 575-581.
54. R. Herzig, K. Urbanek, I. Vlachova, B. Krupka, M. Gabrys, J. Mares, P. Schneiderka, *Cerebrovasc. Dis.* 15 (2003) 22-28.
55. U. Nihlen, P. Montnemery, L.H. Lindholm, C.G. Lofdahl, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 61 (2001) 341-347.
56. M. Piagnerelli, K.Z. Boudjeltia, V. Nuyens, D. De Backer, F. Su, Z. Wang, J.L. Vincent, M. Vanhaeverbeek, *Shock* 24 (2005) 48-52.
57. A. Reif, A.J. Fallgatter, A. Schmidtke, *Psychiatry Res.* 137 (2005) 143-146.
58. T. Arndt T, M. Erkens, K. Holtkamp, T. Keller, A.M. Gressner, *Clin Chim Acta.* 379 (2007) 150-3.
59. C. Simonnet, V. Dumestre-Toulet, P. Kintz, S. Gromb, *Forensic Sci. Int.* 106 (1999) 7-17.
60. J. Rainio, G. De Paoli, H. Druid, R. Kauppila, F. De Giorgio, F. Bortolotti, F. Tagliaro, *Forensic Sci Int.* 174 (2008) 161-165.
61. A. Berkowicz, S. Wallerstedt, K. Wall, H. Denison, *Alcohol Alcohol.* 36 (2001) 231-234.
62. A. Berkowicz, S. Wallerstedt, K. Wall, H. Denison, *Forensic Sci. Int.* 137 (2003) 119-124.
63. S. Seidl, *Blutalkohol* 41 (2004) 12-21.
64. B.M. Appenzeller, S. Schneider, M. Yegles, A. Maul, R. Wennig, *Forensic Sci. Int.* 155 (2005) 83-90.
65. B.M. Appenzeller, S. Schneider, A. Maul, R. Wennig, *Drug Alcohol Depend.* 79 (2005) 261-265.
66. F. Bortolotti, M. Trettene, R. Gottardo, M. Bernini, M.C. Ricossa, F. Tagliaro, *Forensic Sci Int.* 170 (2007) 175-178.
67. SIMLA, Ferrara S.D., Snenghi R., Boscolo M., Linee guida metodologico-accertative e criteriologico-valutative, Idoneità alla Guida e sostanze psicoattive, Edizioni Piccin, 2006, Padova.
68. J. Harasymiw, P. Bean, *Alcohol Alcohol.* 36 (2001) 349-353.
69. J.C. Glasinovic, X. Lobos, M. Scrivanti, M.C. Severin, T. Quiroga, C. Moncada, *Rev. Med. Chil.* 129 (2001) 375-381.
70. C. Bon, A. Zahir, A. Mailliavin, M. Roubille, B. Biguet-Vernier, J. Pichot, *Immuno-Analyse et Biologie Specialisee* 16 (2001) 271-280.
71. F. Schellenberg, L. Mennetrey, Y. Bacq, J.C. Pages, *Clin. Chem. Lab. Med.* 39 (2001) 866-871.
72. N. Siegfried, C.D. Parry, N.K. Morojele, D. Wason, *Alcohol Alcohol.* 36 (2001) 243-248.
73. U. Turpeinen, T. Methuen, H. Alfthan, K. Laitinen, M.

- Salaspuro, U.H. Stenman, *Clin. Chem.* 47 (2001) 1782-1787.
74. B. Aertgeerts, F. Buntinx, S. Ansoms, J. Fevery, *Acta Clin. Belg.* 57 (2002) 241-249.
75. M.J. Martin, C. Heymann, T. Neumann, L. Schmidt, F. Soost, B. Mazurek, B. C. Bohm, Marks, K. Helling, E. Lenzenhuber, C. Muller, W.J. Kox, C.D. Spies, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26 (2002) 836-840.
76. M. Dastyh, J. Bednarik, J. Pokora, B. Friedecky, H. Novotna, E. Moravcova, J. Vavrova, *Vnitr. Lek.* 49 (2003) 115-120.
77. L.M. Stadheim, J.F. O'Brien, K.D. Lindor, G.J. Gores, D.B. McGill, *Mayo Clin Proc.* 78 (2003) 703-707.
78. F.J. Legros, V. Nuyens, M. Baudoux, K. Zouaoui Boudjeltia, J.L. Ruelle, J. Colicis, F. Cantraine, J.P. Henry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 440-449.
79. P. Anttila, K. Jarvi, J. Latvala, O. Niemela, *Alcohol Alcohol.* Jan- 39 (2004) 59-63.
80. R. Schwan, M.N. Loiseaux, F. Schellenberg, E. Albuisson, J.D. Favre, A. Rigaud, P.M. Llorca, C. Gillet, M. Reynaud, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28 (2004) 1331-1337.
81. M. Fleming, M. Mundt, *J. Am. Board. Fam. Pract.* 17 (2004) 247-255.
82. D. Alte, J. Luedemann, H.J. Rose, U. John, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28 (2004) 931-40.
83. J.B. Daepfen, F. Anex, B. Favrat, A. Bissery, J. Leutwyler, R. Gammeter, P. Mangin, M. Augsburg, *Clin. Chem.* 51 (2005) 1046-1048.
84. E. Moravcova, J. Bednarik, M. Dastyh, H. Novotna, J. Pokora, *Cas. Lek. Cesk.* 143 (2004) 39-43.
85. L. Chrostek, B. Cylwik, M. Szmitkowski, W. Korcz, *Clin. Chim. Acta* 364 (2006) 167-171.
86. F. Zierau, F. Hardt, J.H. Henriksen, S.S. Holm, S. Jorring, T. Melsen, U. Becker, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 65 (2005) 615-622.
87. A. Hock, M. Schwarz, I. Domke, V.P. Grunert, M. Wueremberger, U. Schiemann, S. Horster, C. Limmer, G. Stecker, M. Soyka, *Addiction* 100 (2005) 1477-1486.
88. A. Korzec, C. de Bruijn, M. van Lambalgen, *J. Clin. Epidemiol.* 58 (2005) 1024-1032.
89. P. Anttila, K. Jarvi, J. Latvala, J. Romppanen, K. Punnonen, O. Niemela, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 65 (2005) 141-151.
90. Y.S. Liu, G.Y. Xu, D.Q. Cheng, Y.M. Li, *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* 4 (2005) 265-268.
91. S. Gul, Y. Akvardar, G. Tas, P. Tuncel, *Turk. Psikiyatri. Derg.* 16 (2005) 3-12.
92. B. Godart, L. Mennetrey, F. Schellenberg, J.C. Pages, Y. Bacq, *Gastroenterol. Clin. Biol.* 29 (2005) 113-116.
93. A. DiMartini, N. Day, T. Lane, A.T. Beisler, M.A. Dew, R. Anton, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25 (2001) 1729-1733.
94. A. Reif, H. Keller, M. Schneider, S. Kamolz, A. Schmidtke, A.J. Fallgatter, *Alcohol Alcohol.* 36 (2001) 603-607.
95. G. Brathen, K.S. Bjerve, E. Brodtkorb, G. Helde, G. Bovim, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 25 (2001) 46-53.
96. T. Arndt, D. Kuhn, H. Herbst, M. Linnemann, N. Nikolaidis, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1022-1023.
97. G.A. Berlakovich, T. Soliman, E. Freundorfer, T. Windhager, M. Bodingbauer, P. Wamser, H. Hetz, M. Peck-Radosavljevic, F. Muehlbacher, *Transpl. Int.* 17 (2004) 617-621.
98. L.D. Martinez, A.E. Baron, A. Helander, K.M. Conigrave, B. Tabakoff, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26 (2002) 1097-104.