

Vincenza Bianchi,

Alessia Raspagni

Carlo Arfini

VECCHI E NUOVI MARCATORI DI ABUSO

ALCOLICO

NELLE MATRICI BIOLOGICHE CONVENZIONALI

INTRODUZIONE

Nel mondo occidentale si sta osservando un forte aumento delle problematiche sanitarie legate all'eccessivo consumo di alcol (1), le statistiche correnti indicano che il 20-30% dei costi relativi alla cure sanitarie e alla ospedalizzazione sono da attribuire all'abuso alcolico, anche il consumo pro capite è aumentato tanto che potrebbe ipotizzarsi una diminuzione dell'aspettativa di vita nei paesi con più elevato consumo di alcol (2,3). Occorre sviluppare politiche più efficaci che possano portare ad una riduzione del consumo alcolico individuale e della popolazione, è necessario trovare modalità diagnostiche in grado di evidenziare precocemente il danno legato al consumo di alcol. Anche se nei fatti sono disponibili una varietà di questionari e test di laboratorio specifici (4-6) spesso i clinici non sono in grado di individuare correttamente i disordini legati all'eccessivo uso. Poiché i questionari (CAGE, MAST o AUDIT) sono autocompilati, sono stati spesso evitati nella pratica in quanto non sempre rispondenti alla reale situazione del paziente. Per poter aiutare i clinici ad evidenziare il problema dell'uso di alcol così come la causa reale dei sintomi, bisogna avere a disposizione esami di laboratorio che costituiscano un'evidenza oggettiva di consumo di alcol, per questo tali biomarcatori sono importanti nella pratica medica e nel follow up per migliorare la compliance del paziente e l'esito del trattamento stesso (5,7,8). Purtroppo la validità diagnostica dei biomarcatori di abuso di alcol fino ad oggi è stata incompleta e l'informazione sulla loro sensibilità e specificità, anche dei più comuni, rimane ancora controversa.

E' pertanto necessario focalizzare i più recenti progressi nell'uso clinico e nell'interpretazione dei biomarcatori di abuso alcolico correnti, migliorando con studi che tengano conto della loro variazione biologica in funzione di fattori quali tipologia di assunzione, obesità, età, genere e patologie epatiche, solo in questo modo i biomarcatori di abuso alcolico potranno avere validità diagnostica.

CONSUMO DI ALCOL E PROBLEMI SANITARI

L'ultimo report della Commissione Europea (giugno 2006) "Alcohol in Europe: a public health perspective" (9) riporta che l'Europa è la regione del mondo con più alto consumo di alcol : se si pensa a tutti i cittadini europei la media di consumo annuale di ciascuno di essi è 11 litri, contro i 7 litri delle Americhe. Poiché in Europa ci sono 55 milioni di persone che non bevono, allora la media reale sale a 15 litri di alcol puro pro capite. Inaspettatamente i Paesi in cui si beve meno sono Belgio, Grecia, Italia, Olanda, Lussemburgo, Norvegia Svezia, Finlandia e Islanda (< 14.5 L/anno), quelli in cui si beve di più Portogallo, Irlanda, Paesi Baltici, Romania, Bulgaria, Ungheria e Repubblica Ceca (> 17 L/anno).

Pur con diverse peculiarità tipiche di ogni singolo Paese, molte abitudini, come frequenza e modalità, oggi si stanno uniformando; inoltre il numero di adolescenti che bevono è aumentato e contemporaneamente è diminuita l'età in cui si inizia ad usare alcol (circa 12,5 anni e 14 anni per la prima intossicazione da alcol).

Le informazioni sulla quantità di etanolo assunta dai pazienti è importante per determinare il rischio di sviluppo di problematiche sanitarie (10). A livello della popolazione il consumo di alcol è determinato come media di consumo pro capite, mentre a livello individuale ci si basa su reports autocompilati che, se fossero veritieri, conteggerebbero solo la metà dell'alcol venduto. Sebbene molti individui che assumono abitualmente alcol sono capaci di limitare la quantità delle loro assunzioni per non manifestare apparentemente problemi di salute, è degno di nota il fatto che nella maggior parte dei paesi occidentali la percentuale di individui che non bevono o che possono essere classificati astemi è in continua diminuzione.

Gli individui che sono capaci di controllare le loro assunzioni e l'ammontare del loro consumo in modo tale da non avere conseguenze avverse possono essere classificati come bevitori moderati (11,12). Studi di popolazione suggeriscono che la mortalità in questi individui con consumo da una a tre bevande al giorno pari a 10-30 g etanolo/die, è più bassa che negli astemi (13-15). D'altra parte quando i livelli aumentano anche il rischio di effetti avversi sulla salute aumenta rapidamente (1,7,10,13-15).

I forti bevitori fanno uso o di grandi quantità per singola assunzione o di moderate quantità con assunzioni molto frequenti. Sebbene non ci sia una chiara soglia per definire il consumo forte di alcol, dati epidemiologici indicano che quando si eccede il livello di circa 300 g/settimana nell'uomo o di 200 g/settimana nella donna può venirsi a creare un significativo rischio per la salute. Questo tipo di consumo è detto "a rischio" o "assunzione pericolosa" o "consumo dannoso di etanolo".

E' da considerarsi "dannosa" la quantità che eccede 5-6 assunzioni nell'uomo o 3-5 assunzioni nella donna per ogni singola occasione. Clinicamente, l'assunzione "pericolosa" o a "rischio" dovrebbe essere differenziata dall'abuso alcolico. Quest'ultimo si riferisce a problemi di alcol che danno conseguenze avverse alla salute e/o problemi sociali. In tali individui ci sono complicazioni sia mentali che fisiche sebbene i criteri per la dipendenza da alcol - alcolismo - possono non essere soddisfatti. L'alcolismo è un insieme di problemi molto severi che coinvolgono la dipendenza, l'aumento della tolleranza e la comparsa dei sintomi dell'astinenza quando non si beve.

I problemi sulla salute alcol indotti si manifestano in una grande varietà di tessuti, in alcuni le conseguenze possono essere principalmente legate ad occasionali assunzioni forti di alcol mentre in altri possono manifestarsi quando l'individuo beve continuamente. E' pertanto sempre importante raccogliere sistematicamente le informazioni sia sulla quantità che sullo schema di assunzione di alcol da parte di tutti i pazienti (16).

Le ragioni che giustificano le attività messe in atto per identificare precocemente gli individui con elevato consumo di alcol ed a intervenire su di essi sono molte

I problemi alcol correlati sono tipicamente associati a conseguenze negative mediche, economiche e sociali sia per gli individui che per la società. Il consumo eccessivo è un fattore di rischio per malattie, incidenti, traumi e danni ed è causa di morte prematura (17). L'alcol è chiamato in causa nell'attività criminale, nella violenza personale, e del danno verso la proprietà (18). Ancora, numerosi studi hanno raccomandato l'uso di tests di screening, anche solo in caso di sospetto, nella medicina di base, in ospedale e, sul posto di lavoro in modo da evidenziare precocemente il problema prima ancora che compaiano i sintomi (19-21).

BIOMARCATORI

Esistono due tipologie di marcatori biochimici legati al consumo di alcol: quelli di stato che evidenziano il consumo acuto o cronico di alcol o il danno di un organo alcol-indotto e quelli di trait che individuano la predisposizione genetica a sviluppare dipendenza da alcol dopo esposizione cronica, è noto infatti che i disordini legati all'abuso di sostanze tendono a svilupparsi tra familiari. Studi su gemelli e su adozioni, così come quelli di genetica molecolare, danno ragione del fatto che il rischio di dipendenza da alcol è geneticamente determinato e ne rappresenta circa la metà.

Marcatori genetici

Grazie ad un'intensa attività di ricerca sono stati identificati un numero cospicuo di molecole candidate ad essere marcatori di trait neurochimici, elettrofisiologici, genetici o legati alla personalità, tutti associati con la dipendenza da alcol.

Risultati promettenti vengono dallo studio della serotonina nelle piastrine, dall'attività della monoaminoossidasi B (MAO-B) e dall'adenilil ciclasi, dal polimorfismo dei recettori dopaminergici (DRD2) e dell'attività dell'onda alfa nell'elettroencefalogramma (22,24). Purtroppo qualche volta i dati pubblicati sono in contraddizione (25) e per alcune molecole è stato in seguito dimostrato che la loro variazione può dipendere da consumo recente di alcol (adenililciclasi) (26)) o da fumo (MAO B) (27).

Un altro problema è rappresentato dal fatto che, come in altre malattie complesse, la dipendenza da alcol è legata a molti fattori dove genetica ed ambiente si combinano tra loro. Tempo fa la sola associazione genetica tra rischio di uso/abuso di alcol era rappresentata dal polimorfismo degli enzimi alcoldeidrogenasi (ADH) e aldeide deidrogenasi (ALDH). Individui con una forma inattiva dell'ALDH mitocondriale (ALDH2*2), tipica delle popolazioni orientali, evidenziano un effetto congenito anti-alcol tipo-disulfiram, pertanto tali individui risultano avere una sorta di protezione dallo sviluppare un'alcoldipendenza (28).

Al contrario individui con genotipo eterozigote per ALDH2*1/2*2 presentano un rischio maggiore di sviluppare danni epatici alcol-correlati e cancro rispetto ai quelli con genotipo omozigote attivo ALDH2*1/2*1 (29,30).

Non è stato ancora sviluppato un marcatore di trait capace di valutare la predisposizione genetica familiare a sviluppare dipendenza da alcol, mentre diversi marcatori di stato sono stati utilizzati con successo in ambito clinico per individuare e monitorare l'uso di alcol (Figura 1).

Perché i clinici possano oggettivamente valutare assunzioni a rischio o bere smodato, sono stati proposti un largo numero di marcatori biologici di stato basati sulla misura diretta o indiretta degli effetti derivanti dal consumo di alcol nel sangue e o nelle urine; inoltre c'è una continua ricerca di nuove molecole candidate per la valutazione clinica. Questi biomarcatori rappresentano un modo obiettivo per stimare approssimativamente la quantità consumata e da quanto dura l'abitudine al bere (p.es. assunzioni pesanti acute o croniche) e per valutare l'effetto dannoso sull'organismo dovuto ad un prolungato abuso (es. danno epatico alcol indotto).





MARCATORI DI STATO			MARCATORI DI TRAIT
Assunzione acuta 	Assunzione elevata e rischiosa 	Danno epatico cronico 	
5HTOL, EtG	CDT	GGT,AST, ALT MCV	MAO, DRD2, ADH, ALDH

Figura 1 I biomarcatori includono marcatori per valutare sia il consumo acuto e cronico di alcol o lo stato di danno acuto (marcatori di stato) sia marcatori candidati per valutare la predisposizione alla dipendenza alcolica dopo esposizione cronica (marcatori di trait) (modificato da Helander)

DEFINIZIONE DI BIOMARCATORE

Un marcatore biochimico è una sostanza presente nei fluidi biologici (sangue , urina etc) in grado di dare evidenza della presenza o del progredire di una condizione patologica oppure indicarne la predisposizione genetica (31). I marcatori biochimici di abuso alcolico sono o sono stati usati negli screening per fare diagnosi, specialmente nelle prime fasi della malattia, per monitorarne l'uso o per scopi di ricerca al fine di quantificare i risultati

Un biomarcatore ideale possiede alcune caratteristiche che lo rendano affidabile, infatti deve:

- dare risultati attendibili e riproducibili
- essere capace di distinguere assunzione di piccole o moderate quantità di alcol rispetto a quelle più pesanti
- essere capace di rappresentare accuratamente la quantità di alcol che è stata consumata durante un periodo di tempo
- avere un facile modo di misura
- essere possibile misurarlo diverse volte
- essere economico
- i risultati devono essere velocemente disponibili

Ancora, quando si sceglie un biomarcatore occorre considerare

- la sua sensibilità (la capacità del test di identificare accuratamente le persone che hanno consumato alcol)
- la sua specificità (la capacità del test di identificare accuratamente le persone che non hanno consumato alcol) e
- per quanto tempo il biomarcatore rimane positivo dopo assunzione di alcol

Ad oggi non esiste un biomarcatore ideale che possieda tutte le caratteristiche elencate o abbia sensibilità e specificità al 100%, è per questo che per aumentare l'accuratezza di una diagnosi accurata vengono utilizzati pannelli comprendenti più biomarcatori.

SENSIBILITA', SPECIFICITA' E VALORI PREDITTIVI DEI MARCATORI BIOLOGICI

I marcatori biologici sono valutati in termini di sensibilità e specificità diagnostiche. In questo contesto la sensibilità si riferisce alla capacità del test di identificare quegli individui con un particolare livello e/o durata di consumo alcolico, mentre la specificità si riferisce alla capacità del test di escludere quelli che bevono meno. Di conseguenza un marcatore altamente sensibile individua pochi falsi negativi ed uno con alta specificità pochi falsi positivi. Un marcatore ideale dovrebbe avere 100% di specificità e di sensibilità ma questa situazione è solo teorica. Infatti, a causa della variabilità biologica intra- ed inter- individuale del livello basale e di quello dopo assunzione di una quantità nota di alcol, quando si determinano gli intervalli di riferimento della popolazione "normale" e dedita all'alcol i valori di solito si sovrappongono parzialmente, così che si ha una zona diagnostica grigia. Alcune persone sono capaci di bere eccessivamente senza avere risultati anormali, questo significa che quel marcatore, in quei soggetti, ha bassa sensibilità. D'altra parte alcuni marcatori dell'alcol possono essere alti anche in persone che non sono affette da problemi alcol correlati, questo significa che esso è affetto da bassa specificità.

Gli intervalli di riferimento per i parametri di laboratorio sono normalmente calcolati come la media \pm 2 deviazioni standard (DS) dei valori di una ben definita popolazione di controllo sana. Assumendo che i valori si distribuiscano secondo una curva gaussiana normale, questo ha come risultato una specificità minore del 100% poiché il 5% dei valori di controllo si posizionano fuori del più alto e del più basso limite di riferimento.

Quando si definiscono i valori di riferimento per i marcatori dell'alcol ci sono diversi fattori che si devono considerare. Primo, una limitazione di questi studi è che essi valutano la sensibilità e la specificità dei marcatori biologici in relazione a dati autocompilati come se questo fosse il gold standard per il consumo di alcol. Considerando che molti pazienti non riferiscono la storia accurata della loro vera assunzione, questo crea non pochi problemi di validità.

Secondo, il modello di consumo alcolico e le consuetudini del bere sociale variano tra culture e società e questo fa variare le modalità con cui viene reclutata la popolazione

normale di controllo. L'uso di curve Receiver-Operating Characteristic (ROC), dove è valutata la relazione tra sensibilità e specificità a differenti cut off nei normali e nei bevitori, è diventato uno strumento utilizzato per paragonare le performance dei marcatori alcolici e selezionare le soglie limite (32). D'altra parte alcuni studi si focalizzerebbero sulla sensibilità all'intervallo più alto di specificità e non sull'area totale sotto-la-curva-ROC poiché questa copre l'intera specificità da 0% a 100% la maggior parte della quale è di uso molto limitato nella pratica clinica.

Nella routine, la possibilità di ottenere una corretta classificazione ("valori predittivi") con un marcatore biologico per l'alcol è fortemente legato alla prevalenza dell'uso/abuso di alcol nella popolazione da studiare. Il valore predittivo positivo (PPV) fornisce la proporzione di risultati dei test veramente positivi tra tutti i risultati positivi (somma di veri e falsi positivi) e il valore predittivo negativo (NPV) la proporzione di risultati dei test veramente negativi tra tutti i risultati negativi (somma dei veri e falsi negativi). Ancora quando si usa un marcatore con sensibilità e specificità abbastanza alti, il rischio per una errata classificazione può essere piuttosto alta se la patologia che si studia è poco frequente nella popolazione studiata. Di conseguenza, marcatori usati per individuare l'eccessivo consumo di alcol funzioneranno meglio (PPV più alto) negli studi su popolazioni selezionate ad alto rischio (per esempio guidatori ubriachi) che nella popolazione in generale.

La sensibilità, specificità e valori predittivi dei marcatori biologici sono fortemente influenzati dal cut off -valore decisionale- che è il limite scelto per distinguere tra un valore normale e uno patologico. Per esempio l'intervallo di riferimento può essere aggiustato per ottenere una più alta specificità del test, ma allo stesso tempo la sensibilità si riduce e viceversa. Se un marcatore dell'alcol deve essere usato per uno screening generale del livello potenzialmente pericoloso o per la individuazione precoce di una ricaduta in relazione alla riabilitazione del paziente, allora questo deve essere molto sensibile. Molti test di screening usati nelle cure primarie hanno un basso PPV. I marcatori tumorali, per esempio rilevano un elevato numero di falsi positivi, poiché lo screening deve essere molto sensibile per includere il più possibile i soggetti malati che

andranno poi valutati con tecniche di conferma più specifiche quale ad esempio la biopsia. In contrasto se un risultato positivo può portare a sanzioni legali per l'individuo, come la perdita del lavoro o la revoca della patente di guida, il marcatore deve essere altamente specifico così da avere un basso rischio di ottenere falsi positivi.

BIOMARCATORI DI ABUSO ALCOLICO

Sono numerosi i tests di laboratorio proposti per il riconoscimento dell'abuso alcolico sia acuto che cronico, alcuni di questi sono in uso da tempo da essere ormai considerati tradizionali (γ GT, AST, ALT ed MCV), mentre alcuni sono stati introdotti più recentemente. Poiché la positività a questi test è legata al tempo intercorso tra assunzione e prelievo, si possono distinguere in marcatori di consumo acuto e di consumo cronico di alcol.

BIOMARCATORI DI CONSUMO ACUTO

ETANOLO

Il più tradizionale ed oggettivo modo di valutare ("gold standard") l'assunzione di alcol è determinare la presenza di etanolo nei fluidi corporei o nell'espilato (33).

Questo metodo è limitato dal fatto che si riesce ad identificare solo un uso molto recente poiché l'etanolo è rapidamente eliminato e pertanto rappresenta un marcatore poco sensibile. E' abbastanza intuitivo che una persona potrebbe consumare considerevoli quantità di alcol durante la sera precedente e presentare un dosaggio dell'alcol negativo il mattino successivo (34). Trovare poi un singolo campione positivo per etanolo non è indicativo né delle abitudini al bere né la presenza di problematiche della persona.

Per ottenere dati sul consumo di alcol da parte del singolo sono spesso utilizzati interviste e questionari tipo AUDIT, CAGE e MUST (21). Questi hanno un importante inconveniente: molto frequentemente l'individuo sottostima la quantità di alcol assunto pertanto tali strumenti perdono di sensibilità, anche in casi di interviste molto dettagliate (35-37). Di conseguenza quando si utilizzano solo i questionari, al pari dei segni clinici dei forti

bevitori che sono piuttosto incerti almeno nei primi stati, la possibilità di sottostimare abuso alcolico e dipendenza sono abbastanza comuni.

La determinazione dell'etanolo non è un problema analitico e sono ottenibili ottimi risultati sia in gascromatografia che con metodi enzimatici (38). Per particolari ambiti come guida, pronto soccorso e posto di lavoro ci sono metodi di campionamento non invasivi che permettono di valutare l'esposizione all'alcol nell'aria espirata o nella saliva (39,40). In confronto al sangue e all'aria espirata, l'etanolo nelle urine può essere ritrovato anche alcune ore più tardi dovuto alla raccolta delle urine nella vescica (41), L'etanolo ingerito viene rapidamente assorbito a livello dello stomaco e del piccolo intestino, passa nel torrente circolatorio e da qui a tutti i fluidi biologici e ai tessuti in proporzione al contenuto di acqua.

L'etanolo va incontro ad un metabolismo principale ossidativo che porta ad acetaldeide e quindi ad acido acetico e un metabolismo secondario non ossidativo che dà esteri etilici degli acidi grassi (FAEE), fosfatidiletanolo (PEth), etilglucuronato (EtG) ed etilsolfato (EtS) a seconda degli enzimi coinvolti (figura 2)

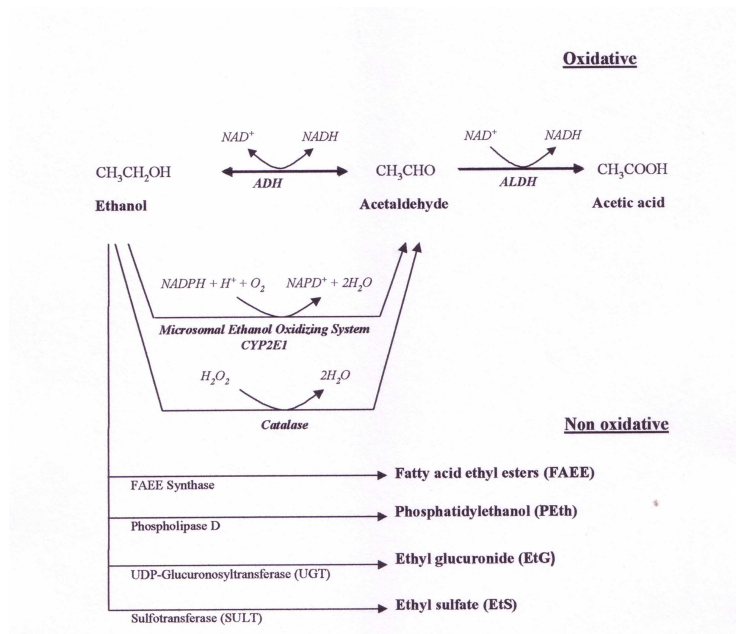


Figura 2: Percorso principale ossidativo e secondario non ossidativo per la degradazione dell'etanolo nell'organismo

L'etanolo è eliminato rapidamente ad una velocità di circa 0,1 g/kg per ora, corrispondente a 0,15-0,20 g/l per ora nel sangue ad opera del fegato. Tale metabolismo è accelerato anche di una volta e mezza nei forti bevitori, come conseguenza una persona può consumare un notevole quantitativo di alcol alla sera es. 1 bottiglia di vino, 4-5 boccali di birra, per un totale di 60-80 g di etanolo, e presentare un test negativo all'etanolo la mattina successiva (34). Ci sono infatti indicazioni che gli individui in cura per problemi collegati alla droga spesso bevono, e non lo ammettono, addirittura può capitare che regolino la quantità assunta e valutino il momento in modo da risultare negativi quando avviene la verifica (37).

Un test positivo all'etanolo può avere o non avere relazioni con l'abuso cronico, poiché una bassa concentrazione di etanolo riscontrata potrebbe derivare sia da una recentissima assunzione di una piccola dose di alcool sia da una più lunga eliminazione di una dose tossica molto elevata.

D'altra parte in presenza di alte concentrazioni di etanolo (>1,5g/l) durante la giornata è indicativa di un'abitudine di abuso in stato avanzato, e se non sono presenti, o sono poco evidenti, segni di intossicazione si potrebbe pensare che la persona osservata abbia sviluppato una tolleranza all'etanolo come risultato di una lunga e prolungata esposizione eccessiva, criteri utilizzati per distinguere l'intossicazione acuta dal consumo cronico di etanolo.

E' quindi sempre consigliabile ricontrollare nel tempo una concentrazione positiva di etanolo

ETILGLUCURONATO (ETG)

L'etanolo viene ossidato attraverso due vie epatiche, una catalizzata dall'alcoldeidrogenasi (ADH) e l'altra dall'aldeideidrogenasi (ALDH) che metabolizzano circa il 95% dell'etanolo totale, inoltre una piccola frazione (< 0,1%) (42) della dose ingerita viene coniugata con UDP-acido glucuronico (figura 2) per produrre etilglucuronato (EtG) un metabolita solubile in acqua e quindi escreto nelle urine (43,44).

In Italia, è invalso l'uso di indicare questo analita etilglucuronide dall'inglese ethylglucuronide. Durante gli ultimi anni, lo sviluppo di metodi analitici migliori basati sulla spettrometria di massa (GC-MS e LC-MS) ha rinnovato l'interesse nei riguardi dei metabolici dell'etanolo come marcatori biologici di alcolismo (45-47). L'etilglucuronato è un interessante marcatore di consumo alcolico acuto poiché l'eliminazione costante è molto più lunga di quella dell'etanolo con il risultato di avere una sensibilità più elevata (42,44), inoltre poiché è un diretto metabolita dell'alcol etilico, l'EtG risulta anche molto specifico per l'assunzione di alcol (48). La determinazione dell'EtG nel sangue e nelle urine fornisce un mezzo per determinare se una persona ha consumato di recente alcol, anche molte ore dopo dall'eliminazione dell'alcol. Recenti studi hanno dimostrato che le concentrazioni di EtG nelle urine possono essere adulterate dall'ingestione di grandi quantità di acqua prima della minzione, mentre questa diluizione non influenza il rapporto EtG/creatinina, né la concentrazione di etanolo (42). Di conseguenza, così come con gli esami di routine delle droghe d'abuso (49), è raccomandata l'espressione dell'EtG urinario come rapporto con la creatinina per compensare la diluizione dell'urina. La diluizione intenzionale è il solo modo per abbreviare il tempo di rilevabilità di questo nuovo marcatore.

L'EtG è presente anche nei capelli ed in altri tessuti e questo potrebbe allargare ulteriormente il suo valore diagnostico.

Occorre ricordare che l'EtG potrebbe risultare positivo anche in caso di assunzioni di medicinali e uso di colluttori contenenti alcol.

Recentemente è stato proposto un kit immunoenzimatico (50), ciò potrà permettere il dosaggio dell'EtG più facilmente e quindi più disponibile, tuttavia è ancora necessaria una consolidata validazione del metodo specialmente per quel che riguarda la scelta del cut off.

RAPPORTO 5-IDROSSITRIPTOFOL/ACIDO 5-IDROSSINDOLO-3-ACETICO (5HTOL/5HIAA)

E' noto che l'etanolo interferisce con il metabolismo della serotonina (5-idrossitriptamina) e questa interazione può fornire utili informazioni indirette sul recente consumo di alcol.

Il 5-idrossitriptofolo (5HTOL) è normalmente un metabolita urinario minore della serotonina (<1%), ma in presenza di etanolo la formazione di 5HTOL aumenta drammaticamente in maniera dose dipendente, mentre l'acido 5-idrossindolo-3-acetico (5HIAA) il maggior metabolita in condizioni normali (>99%) diminuisce corrispondentemente (51-52) (figura 3).

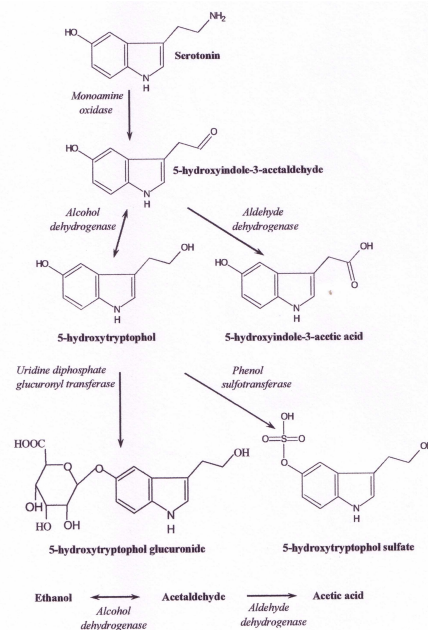


Figura 3 Interazioni metaboliche tra alcol e serotonina

Questa variazione nel metabolismo della serotonina avviene per inibizione competitiva sull'ALDH da parte dell'acetaldeide, metabolita intermedio dell'ossidazione dell'etanolo via ADH, e per la riduzione del potenziale redox durante il metabolismo dell'etanolo (53). La quantità urinaria di 5HTOL ritorna a livelli basali alcune ore dopo (6-24 h) che l'etanolo non è più misurabile (52). Conseguentemente, così come osservato per l'EtG, la misura dell'5HTOL nelle urine risulta essere un metodo più sensibile per rivelare una recente assunzione di alcol rispetto alla ricerca dell'etanolo, e può individuare l'apporto regolare di alcol anche moderato delle ultime 24 ore (37,41).

Per migliorare l'accuratezza di questo marcatore dell'abuso acuto di alcol nella pratica clinica, il 5HTOL dovrebbe essere espresso come rapporto rispetto al 5 HIAA urinario al posto della creatinina.

Questa pratica permette di compensare le variazioni nella concentrazione di 5HTOL dovuta alla diluizione delle urine, all'apporto dietetico di serotonina (elevate quantità nelle banane) (52) e al trattamento con farmaci antidepressivi (SSRI e MAOI) (54). A parte il consumo di alcol, la terapia con disulfiram (Antabuse), potente inibitore della ALDH, rappresenta la sola causa conosciuta dell'aumento del rapporto 5HTOL/5HIAA (55). Il valore basale del rapporto urinario 5HTOL/5HIAA non è influenzato da una esposizione eccessiva e prolungata di alcol e questo marcatore può inoltre essere usato per identificare il recente apporto di alcol sia nei consumatori occasionali che cronici.

Il 5HTOL è escreto nelle urine principalmente nella forma coniugata con l'acido glucuronico (56). La determinazione dell'5HTOL libero può essere effettuata con GC-MS dopo idrolisi enzimatica (57) ma il 5HTOL può essere anche determinato nella forma coniugata (GTOL) con LC-MS. In passato è stato disponibile un metodo immunochimico per il dosaggio del GTOL che avrebbe potuto migliorarne l'utilizzo nell'uso routinario. L'5HIAA può essere determinato in HPLC con rivelatore elettrochimico (58).

ADDOTTI DELL'ACETALDEIDE

Da oltre vent'anni vengono studiate le modificazioni proteiche derivanti dalla presenza di acetaldeide, primo metabolita dell'etanolo. Infatti i prodotti aldeideici finali della perossidazione lipidica alcol indotta giocano un ruolo importante nella patogenesi del danno tissutale negli alcolisti (59-61). Sono state trovate modificazioni chimiche della proteina nativa derivate da alcune aldeidi nel fegato di pazienti alcolisti sebbene potrebbero essere presenti anche nel cervello, muscolo, cuore ed intestino (61). In determinate condizioni che coinvolgono l'aumento dello stress ossidativo (eccesso di ferro nell'organismo o dieta ricca di grassi) l'abuso alcolico aumenta la quantità di tali addotti. Gli addotti derivati dall'acetaldeide sono stati misurati negli eritrociti e nel plasma utilizzando tecniche immunologiche e HPLC ma tali test non sono ancora entrati nella

routine del laboratorio (62,63-65). Le evidenze accumulate indicano che la formazione di addotti diminuisce la tolleranza immunologica in vivo e porta all'induzione di autoanticorpi contro i neoantigeni prodotti (61,66). Gli autoanticorpi sono stati trovati negli alcolisti e questo potrebbe essere utilizzato nella diagnosi differenziale delle patologie epatiche alcol o non alcol dipendenti (66). Il titolo degli anti-addotti IGA può fornire un sensibile e specifico marcatore di consumo alcolico (67,68).

FOSFATIDILETANOLO

Il fosfatidiletanolo (PEth) è un fosfolipide sintetizzato solo in presenza di etanolo attraverso l'azione della fosfolipasi D sulla fosfatidilcolina (69,70) (figura 2), recenti studi hanno dimostrato possedere un'eccellente sensibilità e specificità in differenti bevitori (71,72).

L'etanolo ed altri alcoli primari a catena corta possono agire nell'idrolisi come substrato alternativo all'acqua ed anziché l'acido fosfatidico, formare fosfatidiletanolo. Poiché i due gruppi carbossilici alifatici possono variare, il fosfatidilglicerolo è un gruppo di composti piuttosto che una singola sostanza.

E' stato dimostrato che in vari tessuti quali sangue, cervello e fegato la velocità di degradazione del fosfatidiletanolo è bassa se comparata a quella della sua formazione. Per la sua elevata specificità e sensibilità è stato proposto come marcatore dell'abuso alcolico. Una singola assunzione di alcol non è sufficiente alla formazione di fosfatidiletanolo, quindi rispetto ad altri marcatori può essere individuabile nei campioni biologici soltanto dopo diverse assunzioni, ma rimane identificabile per più di 2 settimane (73). Per evitare la neoformazione in vitro il sangue deve essere congelato a -20°C (74) ed il dosaggio avviene con tecnica HPLC dopo estrazione con 2-propanolo. Le basse concentrazioni necessitano di rilevatori molto sensibili come l'evaporative light scattering detector (ESLD)

ESTERI ETILICI DEGLI ACIDI GRASSI (FAEE FATTY ACID ETHYL ESTERS)

Sono metaboliti minori dell'etanolo, costituiscono un gruppo di composti non polari che si idrolizzano facilmente in ambiente alcalino e che si formano in vivo in presenza di etanolo per reazione con acidi grassi liberi, trigliceridi, lipoproteine o fosfolipidi sotto l'azione dell'enzima specifico FAEE sintetasi citosolico e microsomiale, allo stesso modo possono agire anche enzimi aspecifici quali carbossilesterasi, lipoproteina lipasi, carbossilestere lipasi ecc (75)

Nel corso degli anni molti autori hanno suggerito che il danno organico negli alcolisti fosse causato dall'acetaldeide, ma è anche stato dimostrato che la sua produzione nel pancreas, che risulta invece organicamente danneggiato dall'abuso alcolico, è scarsa se non addirittura nulla (76). E' anche stato dimostrato, dallo studio di alcuni casi autoptici, che i FAEE e l'enzima responsabile della loro sintesi sono presenti soprattutto negli organi più frequentemente danneggiati dall'abuso di etanolo, cioè pancreas e fegato (77). Ciò permette di affermare che siano i FAEE, lipidi più idrofobici dei trigliceridi, mediatori del danno organico conseguente ad assunzione di alcol etilico. La presenza di etil stearato, palmitato, oleato, linoleato e arachidonato come prodotti del metabolismo non ossidativi dell'etanolo è stata descritta da Lange (78) e successivamente approfondita da Riposata (75,79,80). Nel corso degli anni numerosi autori si sono occupati della determinazione di tali metaboliti in vari liquidi biologici quali sangue siero (56-60) ed è stato dimostrato che la composizione dei FAEE è soprattutto dovuta a palmitato e oleato di etile. Nonostante la loro estrema utilità negli usuali campioni biologici gli esteri etilici degli acidi grassi nel sangue possono soltanto servire da conferma per assunzione di alcol a breve termine (81) in quanto la finestra temporale è estremamente ridotta (fino a 24 h dopo l'assunzione di etanolo).

BIOMARCATORI DI CONSUMO CRONICO

Marcatori tradizionali

I marcatori biochimici tradizionali usati per identificare l'esposizione cronica all'alcol sono gamma-glutamilttransferasi (γ GT), aspartato e alanino aminottransferasi (AST e ALT) nel

siero e volume corpuscolare medio degli eritrociti (MCV) (82). γ GT, AST e ALT sono esami diagnostici standard compresi nel comune pannello di biochimica clinica e vengono effettuati per valutare le disfunzioni epatiche non specifiche mentre l'MCV è misurato nell'ambito dell'esame emocromocitometrico.

Una limitazione di questi dosaggi è che essi identificano principalmente quelle persone che hanno già bevuto eccessivamente per un considerevole periodo di tempo (mesi-anni) pertanto hanno una bassa sensibilità per il consumo recente di alcol. Un altro svantaggio è che essi mostrano bassa specificità, poiché possono aumentare anche in altre circostanze quali assunzioni di farmaci comuni come barbiturici e antiepilettici, fumo, obesità e gravidanza oltre che per la maggior parte delle patologie epatiche anche di origini non alcoliche (83-85). E' stato riportato (86) che l'assunzione di caffè inibisce l'induzione degli enzimi epatici causata dall'ingestione di alcol e forse può proteggere il danno epatico derivante da un apporto eccessivo di alcol.

Per la loro bassa specificità e sensibilità, l'utilizzo di questi marcatori convenzionali dell'alcol pone dei limiti nello screening nella popolazioni generale per il di consumo elevato di alcol, mentre sono utili nel follow-up del paziente con patologia epatica alcol dipendente già diagnosticata. D'altra parte la causa della maggior parte dei tests risultati falsi positivi è ben conosciuta e in questi casi è di assoluta importanza la valutazione clinica.

AMINOTRANSFERASI (AST, ALT)

La concentrazione nel siero degli enzimi che derivano dal fegato, aspartato aminotransferasi (AST) e alanino aminotransferasi (ALT) sono entrambi frequentemente elevate nei pazienti alcolisti (7,8). I tessuti epatici contengono abbondanti quantità di questi enzimi e si può assumere che essi funzionino da marcatori del danno dell'epatocita piuttosto che come marcatori di consumo alcolico. Elevati livelli di AST sono stati riportati nel 39-47% degli individui alcol dipendenti (87,88) (figura 3). Questi enzimi sono alti anche nell'astinenza alcolica con danno epatico cronico. L'AST può dare informazioni sull'eziologia della patologia epatica quando interpretata insieme all'ALT, infatti un

rapporto AST/ASL superiore a 2 suggerisce un'etiologia alcolica nei pazienti con epatopatia (7,8,89).

La maggior parte dei pazienti con patologie epatiche non alcoliche hanno questo rapporto inferiore ad uno. L'ALT è un marcatore relativamente specifico per il fegato, mentre negli alcolisti cronici il selettivo aumento nel siero dell'AST può essere attribuito al danno mitocondriale del tessuto epatico, del muscolo scheletrico (miopatia alcolica) o alla cardiomiopatia alcolica.

GAMMA GLUTAMIL TRASFERASI (GGT)

È un enzima glicoproteico che catalizza il trasferimento di un residuo γ -glutamilico del glutatione a diversi peptidi accettori. Il consumo cronico di etanolo fa aumentare repentinamente l'attività della GGT nel siero, è perciò l'enzima più largamente utilizzato come indice di assunzione eccessiva di alcol (7,90-92). Sebbene molti studi hanno riportato una correlazione positiva tra l'assunzione di alcol e l'attività nel siero della GGT, le sensibilità e le specificità nei materiali di riferimento hanno mostrato una notevole variazione. Nella maggior parte degli studi, la sensibilità della GGT è di gran lunga maggiore rispetto agli altri marcatori usati comunemente. Il progetto WHO/ISBRA sui marcatori dell'alcolismo indica concentrazioni elevate di GGT nel siero in 52% nei soggetti alcol dipendenti mentre per la CDT e l'AST questa percentuale scende al 39% (87). Si dovrebbe poi notare che la sensibilità della GGT come marcatore alcolico si è dimostrata essere più alta negli uomini che nelle donne (93-95).

Recenti indagini su una grande popolazione di individui hanno evidenziato che i bevitori moderati mostrano livelli significativamente più alti di GGT rispetto agli astemi, specialmente nell'uomo (92). Anche l'obesità è un fattore importante perché può aumentare il livello di GGT nel siero (96-99). Gli effetti dell'obesità associato ad assunzioni di alcol moderato hanno un effetto additivo sulla GGT e ciò indica che può esserci un effetto sinergico tra la massa corporea (BMI) e il rischio danno epatico (99). L'induzione dell'enzima GGT è stata recentemente associata con la formazione di ossigeno reattivo ed è anche per questo che essa può essere considerato un marker

dello stress ossidativo (100,101). Dato interessante è quello in cui si dimostra che il consumo di caffè è inversamente proporzionale alla GGT nel siero (102). I consumatori di caffè hanno un'attività degli enzimi epatici minore, ciò è stato associato con una forma di protezione nei confronti della cirrosi (103,104). D'altra parte si può assumere che l'induzione enzimatica della GGT potrebbe avere un ruolo epatoprotettivo nella fase precoce dell'induzione epatica alcol indotta dovuta al fatto che l'enzima possa trasformare il glutathione, regolatore chiave dello stato redox della cellula, in cisteina (105,106). Anche l'età sembra influenzare l'attività della GGT, nel senso che questo enzima aumenta in funzione dell'età (96,107-110). Recenti studi su un grande popolazione danno evidenza che, mentre nei consumatori di alcol, sia forti che moderati, c'è un continuo incremento della GGT con il crescere dell'età, negli astemi si ha un decremento dell'attività enzimatica dopo i 70 anni (108). Negli studi su popolazioni per categorie di età, la sensibilità della GGT, come marcatore alcolico, è abbastanza bassa per i giovani (>30 anni) (107,109,111). Paragonando popolazioni di alcolisti e non alcolisti, con e senza la variante età, si vede che la GGT ha una sensibilità abbastanza alta nei giovani quando si tiene conto dell'età (108). Appare allora evidente che i valori clinici della GGT nella verifica dell'eccessiva assunzione di alcol potrebbero essere alquanto migliorati se si controllassero in funzione della quantità dell'assunzione (92), del BMI (99), e dell'età (108) rispetto a range di normalità definiti.

Possono anche esserci variazioni nella sensibilità verso l'alcol legate alla razza, così come è stato osservato per le popolazioni giapponesi, dovute ad una aldeide deidrogenasi a più bassa attività (112). Nei paesi con continuo incremento del consumo medio di alcol e con aumento della prevalenza di sovrappeso, ci può essere nella popolazione in generale la tendenza verso valori medi dell'attività della GGT aumentati. Il programma di sorveglianza Nordic Reference Interval Project (NRIP) sui valori di riferimento degli enzimi nei paesi nordici conclude che per l'uomo di età media (>40 anni) l'attività della GGT può arrivare fino a 110 U/l (110). Al contrario se si escludono i consumatori di alcol con sovrappeso, un possibile range di riferimento normale potrebbe essere fino a 60 U/l

(99). Pertanto la definizione degli intervalli riferimento non può prescindere dalla scelta di una popolazione che non beve alcol né è significativamente sovrappeso.

La GGT aumenta in tutte le forme di patologia epatica, particolarmente nei casi di ostruzione biliare intra e postepatica. Piccoli incrementi (2-5 volte il valore normale) sono osservati nei casi di steatosi. Per differenziare tra steatosi alcolica e non alcolica, comunemente indotta dall'obesità e dal diabete, la GGT dovrebbe essere interpretata rispetto a valori di riferimento che tengano conto del BMI (99).

Aumenti transitori possono anche essere presenti in pazienti con intossicazione da farmaci. Negli alcolisti la GGT sierica aiuta a distinguere quelli che hanno sviluppato patologie epatiche da quelli che ne sono ancora privi (8,113). Se il paziente non beve alcol l'attività aumentata ritorna nella normalità entro 2-3 settimane (88).

Valori anormali persistenti, in assenza di assunzione continua all'alcol, suggeriscono patologie epatiche, tipicamente quando la GGT è inizialmente 8-10 volte rispetto al normale e se l'aumento persiste per 6-8 settimane dall'assenza di assunzione alcolica. D'altra parte se l'iniziale livelli di GGT è solo 2-3 volte più grande dei valori normali e tali valori ritornano al normale dopo astinenza il paziente non ha patologie epatiche.

VOLUME CORPUSCOLARE MEDIO (MCV)

Nelle procedure di screening la dimensione del globulo rosso volume corpuscolare medio (MCV) è usata spesso per evidenziare l'abuso alcolico. Studi sulla popolazione hanno riportato valori elevati di MCV nel 4% degli adulti, 65% dei quali probabilmente in relazione all'alcol (114,115). Studi su bevitori pesanti hanno indicato che la sensibilità di questo marker è oltre il 40%, la sensibilità è alquanto più alta nelle donne (116). Nel confronto tra marcatori, la GGT raggiunge una più alta sensibilità rispetto all'MCV, almeno nell'uomo. L'MCV mostra una correlazione piuttosto forte con la quantità di alcol riportata nel senso che sembra esserci una relazione dose dipendente tra volume della cellula eritrocitaria e intensità dell'assunzione alcolica (117,118). Individui che dicono di fare uso moderato di alcol (>40 mg/die) mostrano valori che, a livello di popolazione, possono incrementare l'MCV fino a 1-2 fl se paragonati ad astemi (117,118). L'MCV per

la sua natura relativamente stabile potrebbe essere usato per indicare variazioni nelle modalità di assunzione a lungo termine in soggetti senza segni evidenti di dipendenza da alcol. L'MCV risponde lentamente all'astinenza e si normalizza dopo 2-4 mesi. Utilizzare il monitoraggio dell'MCV può essere importante in certe condizioni cliniche selezionate come nello screening del rischio dovuto all'effetto dell'alcol nel feto (119). Dovrebbe essere notato che l'MCV ha limitata specificità nei pazienti con carenza di vitamina B₁₂ o acido folico, patologie epatiche, malattie ematologiche, ipotiroidismo o reticolocitosi. In un tipico bevitore pesante senza danno epatico si hanno alti valori di MCV senza anemia, mentre in pazienti con danno epatico da alcol con concomitante carenza di folati, alterazioni megaloblastiche del midollo osseo, o anemia emolitica, si trovano alti MCV insieme all'anemia (120,121).

Sebbene il meccanismo che sottintende all'aumento di MCV alcol indotto rimane ancora sconosciuto, recenti studi evidenziano che l'etanolo e i prodotti del suo metabolismo hanno un ruolo ematotossico diretto (122-125). L'etanolo infatti può permeare le membrane cellulari, alterare la struttura dei lipidi ed interferire con la struttura della cellula e del suo metabolismo, questo interessa la stabilità dell'eritrocita. Alte concentrazioni di acetaldeide, primo metabolita dell'etanolo, sono state riscontrate negli eritrociti degli alcolisti (126,127). L'acetaldeide è molto reattiva e capace di formare addotti stabili con proteine e costituenti delle membrane delle cellule (123,127-129). Come conseguenza, gli eritrociti possono diventare vulnerabili all'emolisi e avere una emivita biologica più corta. Pazienti alcolisti con macrocitosi mostrano anche anticorpi circolanti che riconoscono gli epitomi delle proteine modificati dall'acetaldeide, ciò suggerisce che possono essere coinvolti anche meccanismi immunologici nel generare globuli rossi con anomalie etanolo indotte (117). Recenti studi su pesanti bevitori giapponesi con genotipo 2 dell'aldeide deidrogenasi hanno provato il ruolo patogeno dell'acetaldeide nell'aumentare il volume corpuscolare medio degli eritrociti (130). Alti valori di MCV in alcuni individui ne hanno inoltre suggerito l'uso come predittore della carcinogenesi del tratto G1 (carcinoma delle cellule squamose dell'esofago) (130).

ALTRE ANORMALITÀ ALCOL INDOTTE DELLE CELLULE EMATICHE

Oltre ad aumentare l'MCV l'eccessivo consumo di alcol può riflettersi anche su altri parametri nel conteggio delle cellule del sangue (117,120,131). La concentrazione emoglobinica media (MCH) è un altro parametro sensibile perché aumenta con l'abuso alcolico (118). Tra le anomalie legate all'alcolismo, tra i più comuni parametri di laboratorio, c'è anche la presenza di trombocitopenia, cioè basso numero di piastrine (table 2). Infatti oltre il 30% dei pazienti ricoverati con una storia di recente uso pesante di alcol evidenziano una diminuzione delle piastrine. Quando l'etanolo viene sospeso il conteggio delle piastrine ritorna alla normalità, anzi si può verificare il caso che esse aumentino oltre i range di normalità (trombocitosi di rimbalzo), in 1-3 settimane.

L'esame morfologico dello striscio di sangue periferico di pazienti alcolisti evidenzia numerose anomalie caratteristiche (120). Si trovano infatti tipicamente macrociti rotondi, stomatociti e knizociti (131).

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT)

La Transferrina carboidrato carente (CDT) è un marcatore di abuso alcolico cronico caratterizzato da una alta specificità (7,132-135). Stibler (135) negli anni 70 trovò che la quantità di glicoforiche desialate della transferrina nei fluidi biologici aumentava come risultato di una pesante assunzione di alcol. Ad oggi rimane ancora non chiarito del tutto il meccanismo attraverso il quale l'alcol altera la sializzazione (7,135-137). La transferrina, principale proteina che veicola il ferro, è sintetizzata e secreta dal fegato con una emivita di 7-10 gg, ha una struttura a singola catena e presenta una microeterogeneità complessa. Ciò è dovuto alla possibilità di un differente carico dei siti che legano il metallo, alla complessità della catena glucidica, al numero di residui terminali di acido sialico legati alla catena dei glicani e all'esistenza di varianti genetiche della catena polipeptidica. L'eccessivo consumo di alcol può danneggiare la sintesi (incorporazione di residui di acido sialico), la secrezione e l'assemblaggio delle glicoproteine. La desialazione della transferrina richiede quantità abbastanza alte di etanolo in vivo (138). Individui che hanno bevuto almeno 50-80 g di etanolo al giorno

come media nelle 2 o più settimane trascorse spesso mostrano un aumento delle molecole di transferrina che hanno perso una (disialotransferrina) o entrambi (asialotransferrina) le catene oligosaccaridiche (56,57) (figura 4).

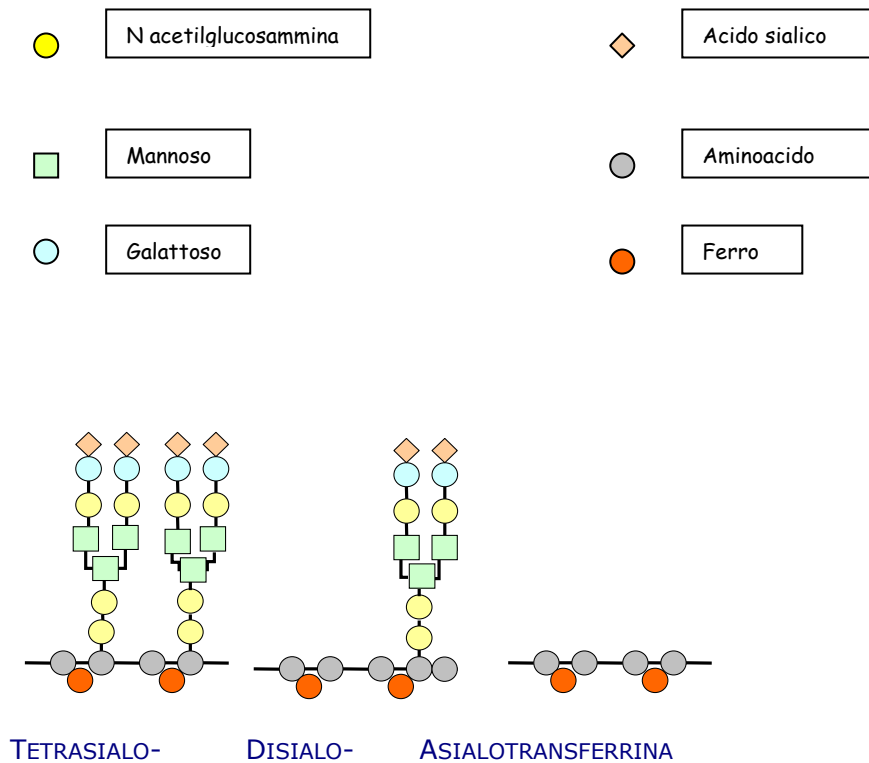


Figura 4 La transferrina carboidrato carente (CDT) è uno specifico marcatore biochimico per il consumo eccessivo recente. La glicofirma più abbonante della transferrina nel siero contiene due catene oligosaccaridiche biantennate con un totale di 4 residui terminali, caricati negativamente, di acido sialico ((tetrisialotransferrina). Individui che hanno bevuto eccessivamente durante le 2 o più settimane trascorse spesso mostrano un incremento della CDT, corrispondente a molecole di transferrina che hanno perso una (disialotransferrina) o entrambi (asialotransferrina) le catene oligosaccaridiche

E' stato postulato che la sintesi della catena glucidica della transferrina può essere alterata dai metaboliti dell'etanolo che interferiscono nel processo degli enzimi trasferasici (137). L'etanolo o l'acetaldeide possono anche aumentare l'attività degli enzimi sialidasici che rimuovono i gruppi carboidrati dalla transferrina. Funzioni alterate dei recettori di diverse cellule epatiche potrebbero influenzare la concentrazione delle frazioni desializzate.

La glicofoma della transferrina predominante, con oltre l'80% sia nella popolazione sana che negli alcolisti, è la tetrasialotransferrina (139). Le glicofome diagnosticamente più interessanti sono senza dubbio la asialotransferrina e la disialotransferrina, entrambe aumentano negli alcolisti, mentre la asialotransferrina non è rilevabile negli astemi e nei bevitori moderati (139,140). Pertanto il marcatore più sensibile resterebbe la disialotransferrina, anche se il più specifico è senz'altro l'asialotransferrina.

Molti studi dimostrano che la CDT, ancora prima rispetto ai test convenzionali usati in routine nella medicina di laboratorio, è in grado di evidenziare assunzioni di alcol prolungato ed eccessivo e danno epatico. D'altra parte sembra che quantità elevate della CDT non sono dovute ad una sua maggiore sensibilità (6) ma piuttosto che è possibile con maggior precisione differenziare le patologie epatiche alcol dipendenti (141). Casi di CDT di falsi positivi o falsi negativi nell'identificazione di abuso alcolico sono abbastanza rari e comunque derivate dalla presenza di varianti genetica B e D della transferrina (142,143). Si osservano poi incrementi della CDT nel siero in malattie congenite della glicosazione (CDG) (133,143), un disordine neurologico ereditario, estremamente raro con ritardo mentale variabile (144). E' ormai riconosciuto che il rischio di una non corretta determinazione della CDT dipende in parte dalla scelta del metodo analitico (143), infatti oggi grazie all'utilizzo di tecniche separative ad alta prestazione la presenza di interferenze viene facilmente individuata.

Nei dosaggi di routine della CDT nel siero vengono utilizzate molte procedure differenti che evidenziano glicofome della transferrina diverse e quindi la definizione di CDT risulta diversa (135,143) e metodo dipendente. Oggi il solo dosaggio immunologico in uso è un metodo diretto in cui l'anticorpo riconosce almeno in teoria la mancanza di uno di entrambi le catene glucidiche nel loro punto di attacco sulla catena proteica, pertanto sembrano reagire con la glicofoma asialo, monosialo e disialotransferrina. Sono di utilità per i laboratori con alta produttività, in ogni modo la letteratura più recente (145) ha evidenziato attraverso un controllo di qualità effettuato in Svezia come i diversi lotti di reagente abbiano nel tempo diminuito le loro performance, tanto da indurre il produttore a consigliare, attraverso una nota tecnica (146), i Laboratori a richiamare i pazienti che

avevano avuto CDT tra 2 e 2.5%. I metodi separativi oggi in uso -HPLC ed elettroforesi capillare- richiedono la saturazione del campione con ferro prima della separazione delle diverse glicoforme e delle diverse varianti. La delicatezza del risultato rende necessaria la standardizzazione della misura ed ad oggi è in commercio uno standard validato per l'HPLC.

Il gruppo di lavoro IFCC "Standardization of CDTmeasurements" ha definito (147)

- la disialotransferrina la molecola target per la CDT,
- l'espressione % CDT come il rapporto tra la somma della asialotransferrina e disialotransferrina rispetto alla transferrina totale per eliminare tutte le cause di aumento e diminuzione della transferrina che potrebbero falsamente influenzare il risultato
- HPLC metodo candidato ad essere metodo di riferimento in attesa che vengano sviluppati metodi in spettrometria di massa.

METODI PER IL DOSAGGIO DELLA CDT

Per la determinazione della CDT sono disponibili metodi immunometrici e metodi separativi, quale CZE e HPLC. Il risultato viene espresso come %CDT per tenere conto della naturale variabilità della transferrina sierica (148-150). Questo è particolarmente importante nelle dosaggi sulle donne che hanno un'alta prevalenza di ferro deficienza e nei pazienti con patologie epatiche (151). La più comune tecnica per misurare la CDT è stata la cromatografia su microcolonna scambio anionica che si basa sulla differente carica delle isoforme della transferrina, seguita da un immunosaggio per quantificare la transferrina. Questo metodo viene qui citato perché si tratta del metodo storico, oggi non più in commercio. In seguito allo sviluppo di anticorpi monoclonali verso la CDT umana e il miglioramento dell'automazione, la CDT può ora essere analizzata più rapidamente con procedure a singolo passaggio, tuttavia in un recentissimo articolo Helander e Nordin (145) dimostrano la perdita delle performance di questo anticorpo nelle produzioni successive rispetto alle prime. Oggi l'elettroforesi capillare zonale (CZE), ma soprattutto la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), danno informazioni

aggiuntive sulla distribuzione delle glicoforme e possono essere usate specialmente nei casi di sospetto di varianti genetiche della transferrina. Questi metodi hanno anche il vantaggio di visualizzare il quadro delle glicoforme della transferrina e potrebbero essere utilizzati con scopi di conferma specialmente quando la CDT è positiva e può avere conseguenze sociali significative o per campioni che sono stati conservati per lunghi periodi a temperatura ambiente quando il risultato della CDT non è congruente con le informazioni cliniche (152-155).

Ci sono stati molti dibattiti in passato se la frazione trisialotransferrina debba essere inclusa nella CDT, ora c'è un unanime consenso a non includerla (156). Questo punto di vista è supportato dall'evidenze che la concentrazione media della trisialotransferrina non è influenzata dall'abuso alcolico e che l'inserimento di questa frazione può ridurre la accuratezza diagnostica della CDT come biomarcatore nell'alcolismo (139, 143, 157-158).

L'alto numero di metodi e le applicazioni, ciascuno con le sue caratteristiche e i suoi intervalli di riferimento, ha evidenziato la necessità di una standardizzazione metodologica (147).

L'HPLC è correntemente considerato come il candidato idoneo ad essere considerato di riferimento (147). E' da supporre che lo sviluppo di programmi di valutazione esterno di qualità migliori la situazione e porti ad un più diffuso uso clinico della CDT nel prossimo futuro.

CDT come marcatore clinico

Per la mancanza di una standardizzazione metodologica la sensibilità e la specificità della CDT nelle sperimentazioni cliniche non selezionate sono rimaste piuttosto controverse e ciò ha impedito ed impedisce il confronto con altri marcatori. Si è osservata una mancanza di uniformità nel valutare la popolazione con riferimento a genere, età, consumo di alcol, durata dell'astinenza prima del campionamento e alla presenza di patologie epatiche.

Non c'è una comune opinione di quanto sia l'ammontare e lo schema di assunzione che è necessario per fare aumentare la CDT. Si crede che i livelli aumentino una volta che

l'assunzione di alcol supera 50-80 g al giorno per 2 o 3 settimane, almeno in pazienti che sono alcol dipendenti, sebbene altrove sia stato suggerito che un ammontare di 60 g o perfino 80g di alcol al giorno non sono sufficienti a far aumentare i valori di CDT oltre ai limiti di riferimento nella popolazione in generale. Studi su alcolisti recidivi indicano che la CDT può essere un indicatore sensibile di ricaduta infatti in questi casi esprime valori aumentati a fronte di più bassi livelli di consumo in pazienti con una storia precedente di abuso alcolico, e che la CDT potrebbe attualmente essere il migliore marcatore della dipendenza alcolica e del consumo di alcol. Gli studi condotti da Anton e collaboratori (90) in pazienti alcolisti hanno indicato che nel 30% dei casi si hanno incremento o decremento della %CDT si hanno anche significative variazioni cliniche nel consumo.

Uno dei vantaggi postulati della CDT rispetto ad gli altri marcatori è che non è influenzato dalla presenza di malattie epatiche (98) nè dall'assunzione di farmaci (159). Può anche essere usata per studiare pazienti con patologie epatiche non alcoliche sebbene le caratteristiche sembrano essere metodo dipendente (151,160-161).

Variazioni fisiologiche

Un recente lavoro (162) effettuato su oltre un migliaio di campioni provenienti da diverse parti del mondo in cui è stato misurato il pattern delle glicofornie con metodo HPLC (163), ha evidenziato che la media della %trisialotransferrina rispetto alla transferrina totale nella popolazione finlandese e giapponese di non bevitori è significativamente più alta se paragonata a quella di australiani, brasiliani e canadesi con le stesse abitudini alcoliche. Inoltre il livello di trisialotransferrina è più basso nella popolazione di origine asiatica-indiano rispetto a quella dei bianchi.

Se la popolazione viene divisa, secondo precisi criteri in tre gruppi : non-bevitori, bevitori moderati e pesanti bevitori (tabella 1) si può osservare che l'asialotransferrina è presente nei bevitori moderati e pesanti e assente nei non-bevitori, che la disialotransferrina e la trisialotransferrina sono più alte nei bevitori moderati e pesanti che nei non-bevitori, che la media della disialotransferrina aumenta passando dai non bevitori (1.14%) ai bevitori moderati (1.34%) ai forti bevitori (2.25%). Nei bianchi la disialotransferrina aumenta dal non-bevitore al bevitore pesante, mentre nella

popolazione asiatico-indiana e negra non c'è differenza tra non-bevitori e bevitori moderati. La differenza è significativa tra moderati e pesanti bevitori.

CLASSIFICAZIONE	CRITERI
NON BEVITORE	persona astemia o che beve alcol in non più di 6 speciali occasioni all'anno (es compleanno) e non più di 15 g di alcol per ciascuna occasione
BEVITORE MODERATO	persona che beve almeno una volta al mese ma in quantità inferiore a 210 g per settimana di alcol, se uomo, o inferiore a 140 g per settimana, se donna, e senza alcun problema passato alcol correlato
BEVITORE PESANTE	persona che beve più di 210 g per settimana di alcol, se uomo, e più di 140 g per settimana, se donna, e senza alcun problema passato alcol correlato

Tabella 1 Classificazione e criteri di classificazione dei bevitori

Per quel che riguarda la correlazione tra le diverse glicoforne, lo studio ha evidenziato che c'è una forte correlazione tra asialo e disialotransferrina, mentre disialo e asialo correlano negativamente con la tetrasialotransferrina.

Queste associazioni dipendono dal livello di consumo dell'alcol, infatti la più forte correlazione si è osservata per il sottogruppo dei forti bevitori. Inoltre la trisialotransferrina si è dimostrata correlare positivamente con la monosialo. Questo non è legato al consumo di alcol poiché si è osservato per tutte le categorie.

In riferimento al genere si è osservato una piccola differenza significativa tra le glicoforne nell'uomo e nella donna. Infatti l'uomo presenta una tetrasialotransferrina più elevata che nella donna, ma un livello più basso di pentasialotransferrina. Invece il rapporto %disialotransferrina/transferrina totale è simile nel maschio e nella femmina (uomo: media \pm DS , 1.13% \pm 0.20%, donna: media \pm DS, 1.16% \pm 0.18%).

Quando la popolazione veniva divisa per fasce di età (<31, 31-40, 41-50 e 50 anni) non si osservavano differenze.

Quando tutti i soggetti sono divisi in base al BMI (<20,20-24.9,25-30, 0 >30) quelli con BMI>30 (obesi) presentano una media significativamente più alta della disialotransferrina rispetto agli altri gruppi, mentre nei non bevitori con BMI<20 si ha un livello

significativamente più alto della monosialo, trisialo e più bassa di esialotransferrina rispetto agli altri sottogruppi di BMI. Circa poi l'influenza del fumo lo studio ha evidenziato che in questo caso i livelli di disialotransferrina sono più alti nei fumatori rispetto ai non fumatori in tutte le categorie di bevitori, (media non fumatori e non bevitori 1.13%, media fumatori e non bevitori 1,20%).

Un comportamento simile si osserva per l'asialotransferrina nei moderati e nei forti bevitori. Questo probabilmente è associato al fatto che nella casistica considerata, sulla base delle schede di autovalutazione, i bevitori erano anche fumatori.

E' interessante notare che in questo articolo gli autori riportano che in alcuni campioni, , era presente un picco di transferrina "sconosciuto" evidenziato già in un altro studio (164) su pazienti con CDG. Poiché questo picco è presente dopo trattamento con neuroamidasi è verosimilmente probabile che sia dovuto ad una glicoforma troncata. Questo potrebbe succedere occasionalmente come risultato di una contaminazione di campioni da parte di batteri e virus che producono neuroamidasi (165) durante la conservazione del campione.

Efficienza diagnostica

Sono stati pubblicati numerosi studi clinici riguardanti la specificità e sensibilità del CDT come marcatore di abuso alcolico. Per calcolare i parametri dell'efficienza diagnostica, il prerequisito richiesto è che si conosca con chiarezza ed attendibilità il consumo di alcol al fine di poter classificare i falsi positivi e i falsi negativi, infatti è condizione abbastanza comune sottostimare il consumo di alcol quando si considerano i test di autovalutazione, anche i metodi utilizzati sono importanti. Se si utilizzano metodi immunometrici si potrebbe incorrere in falsi errori dovuti o alle transferrine varianti, peraltro rare nella forma monozigote ma frequenti nella forma etrozigote, o ad elevata concentrazione di trisialotransferrina

Nell'interpretare i parametri di efficienza diagnostica è dimostrato (166) che sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e negativo hanno variazioni anche del 12% quando si utilizzano diversi metodi per il dosaggio della CDT.

Sensibilità diagnostica

La sensibilità diagnostica della %CDT, come indicatore di consumo cronico di alcol, è legata ad alcuni fattori come l'età, la massa corporea, l'ipertensione e il tabagismo, il sesso e le abitudini verso l'alcol (162).

In generale quando si confrontano popolazioni costituite una da alcolisti all'inizio del trattamento e l'altra da bevitori occasionali, i cosiddetti bevitori sociali, la sensibilità varia dal 70 al 90%. Quando invece si paragonano bevitori occasionali con pazienti che si rivolgono al medico di medicina generale o a specialisti la sensibilità varia da 40 al 60% (167).

I protocolli sperimentali dovrebbero tenere conto dell'emivita della CDT (circa due settimane) della quantità di alcol assunto e dell'arco temporale poiché è dimostrato che se l'assunzione è quantitativamente modesta ma protratta nel tempo (almeno 3 settimane) la CDT aumenta, mentre per forti ma limitate nel tempo, la CDT potrebbe non variare significativamente.

Specificità diagnostica

Un tempo, quando i metodi erano solo immunometrici la letteratura riportava alcune cause di falsi positivi come sindrome CDG, varianti genetiche, cirrosi, carcinoma, epatiti, carenza marziale, anemia, trapianti. Oggi l'utilizzo di analisi separative, quali quelle cromatografiche, che permettono di identificare le singole glicoforme ha dimostrato che nella CDG e nelle varianti genetiche si potrebbero avere quadri cromatografici che interferiscono nella separazione della disialotransferrina ma comunque di aspetto differente riconoscibile rispetto ad un abusatore alcolico.

La CDT non viene influenzata dall'utilizzo di farmaci (168), a differenza della GGT, anche perché sono diverse i meccanismi biochimici che li influenzano.

Numerosi studi pubblicati hanno studiato la specificità diagnostica, da questi appare che è 83.6 e 94.2% nell'uomo e 96.9 e 91.9% nella donna rispettivamente con e senza danno epatico. Di contro si osserva che per la GGT le specificità diagnostiche sono

nell'uomo 36.1% e 24%, nella donna 36.6% e 50% rispettivamente con e senza danno epatico (169-170).

Da qui è chiaro che la CDT è un marcatore più specifico dell'abuso alcolico, anche se confrontata con la GGT.

Valori decisionali

Le specifiche dei diversi metodi e kit e quindi i valori decisionali sono metodo-dipendente. Ogni laboratorio dovrebbe definire i suoi valori decisionali su una popolazione con normali abitudini all'alcol, non astemia.

Nel definire tali valori bisogna tenere conto anche dell'imprecisione del laboratorio.

I valori della CDT nel siero di popolazioni sane è pressoché costante,

Sono comunemente accettati cut off di 1.8-2.0% per i metodi separativi, di 2.5% per metodi immunometrici. L'esperienza su pazienti ricoverati con diagnosi istologica di cirrosi alcolica, cirrosi biliare primaria, epatiti croniche, carcinoma epatico non ha evidenziato significativi aumenti della CDT se l'individuo non assumeva alcol (dati non mostrati).

GGT E CDT IN COMBINAZIONE

Poiché non esiste un marcatore che da solo sia ideale a comprovare il consumo alcolico, negli anni in cui i soli metodi per la misura della CDT erano immunometrici per migliorare la situazione fu proposto di utilizzare diversi marcatori ad esempio GGT, MCV, AST e CDT (171). Gli Autori suggeriscono che questo aumenta la sensibilità, ma contemporaneamente si perde in specificità e i costi delle analisi aumentano.

Uno studio finlandese ha suggerito una combinazione matematica tra GGT e CDT: $[0.8 \times \ln(\text{GGT}) + 1.3 \times \ln(\text{CDT})]$. Gli autori hanno osservato che il risultato di tale algoritmo è elevato in una più alta percentuale di abusatori rispetto alla CDT e alla GGT da sole (88,172-173). Con questo approccio, quando la CDT viene espressa come %CDT, i risultati migliorano (88,172-173).

I valori della combinazione GGT-CDT, abbreviata anche come γ -CDT, sono più alti se il consumo di etanolo eccede una soglia di 40 g/die. Gli Autori riportano che la sensibilità diagnostica della combinazione è più alta di quella dei suoi componenti (99% contro 58% della GGT e 63% della CDT). I valori della combinazione tra GGT e CDT mostrano anche una forte correlazione con l'attuale quantità di alcol consumata ($r = 0.76$, mentre per la sola GGT $r = 0.71$, per la sola CDT $r = 0,59$) (88). A differenza della GGT, l'algoritmo sembra riconoscere l'abuso di alcol nella stessa maniera sia quando i forti bevitori sono paragonati agli astemi sia quando sono paragonati ai moderati consumatori (88). Secondo gli autori questo calcolo può essere usato anche nel follow up dell'astinenza, il suo valore diminuisce durante l'astinenza e torna a valori medi normali dopo 2-3 settimane. Essi sostengono che questo approccio è poco costoso ed è facile da applicare nei laboratori ospedalieri, pertanto potrebbe essere facilmente effettuato nel lavoro clinico di routine. Probabilmente oggi l'utilizzo nei laboratori clinici di metodi separativi molto avanzati, ha fatto perdere di significato la combinazione tra GGT e CDT.

ALTRI PARAMETRI DI LABORATORIO ALCOL-SENSIBILI

Il colesterolo legato alle lipoproteina ad alta densità (HDL) aumenta come conseguenza del consumo prolungato di alcol. Alcuni studi hanno suggerito che questo fenomeno può essere dovuto alla cardioprotezione che si osserva negli individui che consumano moderate quantità di alcol (15). Poiché si può trovare l'HDL aumentato in conseguenza del consumo di quantità di alcol piuttosto bassa (≤ 5 bevande al giorno) tale parametro è stato usato per valutare problemi legati al consumo di alcol nella fase precoce e nel follow up di pazienti senza danno epatico. Per quel che riguarda il profilo lipidico gli abusatori di alcol frequentemente mostrano aumento dei trigliceridi sierici, e degli esteri etilici degli acidi grassi (174). Precedenti studi hanno indicato che il consumo di alcol anche a basso livello, incrementa la ferritina nel siero (175). Esso ha anche una significativa associazione con i livelli di urato (176) che non possono essere messi in relazione al consumo di etanolo ma allo schema di assunzione e al tipo di bevanda alcolica consumata (176-177). L'iperuricemia può anche essere dovuta ad una aumentata

produzione di acido urico e ad una diminuzione dell'escrezione renale come conseguenza dei lattati e dei chetoni circolanti che diminuiscono la secrezione tubulare del rene. E' abbastanza interessante il fatto che, tra i consumatori pesanti che sono privi di disfunzioni epatiche, ci può essere un incremento dei livelli di albumina, ciò indicherebbe che in alcuni individui si ha l'aumento della velocità della sintesi della albumina (62), mentre negli alcolisti i livelli di albumina diminuiscono. Elevati livelli di peptidi collagene derivati nel siero degli alcolisti potrebbe indicare che è in atto una fibrinogenesi e il rischio di una cirrosi epatica (7).

Nei pazienti con aumentata osmolalità e anion gap, ipoglicemia, acidosi lattica, ketoacidosi, ipofosfatemia o ipomagnesemia l'alcol potrebbe essere considerato un possibile fattore causale.

APPLICAZIONI DEI MARCATORI BIOLOGICI NON TRADIZIONALI DELL'ABUSO ALCOLICO

Nella medicina di base .

Nella medicina di base c'è bisogno di metodi semplici ed affidabili per identificare molto precocemente i pazienti con problemi alcol correlati (178). Finora, per valutare un consumo bere pesante o dannoso sono stati impiegati principalmente i parametri tradizionali di laboratorio per le patologie epatiche che comprendono il pannello biochimico di routine. Poiché questi test non sono molto specifici per l'alcol e possono risultare falsamente positivi il loro uso negli screening di persone o popolazioni in generale è limitato. Un altro svantaggio è che essi potrebbero identificare principalmente i bevitori cronici poiché la sofferenza epatica alcol correlata è il risultato finale di tale situazione. E' stato inoltre valutato il dosaggio della CDT con questo scopo ma, nonostante sia più specifico per l'alcol, la sua accuratezza nell'identificazione precoce di abuso di alcol nella pratica generale è in dubbio (179,180). E' da credere che la standardizzazione ed armonizzazione in corso delle procedure riguardanti il dosaggio della CDT, incluso lo sviluppo di un metodo di riferimento sensibile, e l'uso di più

affidabili, aggiornati metodi per il dosaggio della CDT migliorerà l'utilizzo di questo marcatore negli studi su popolazioni non selezionate (143).

In ospedale

Molte persone ricoverate negli ospedali hanno problemi con l'alcol non diagnosticati e quindi possono solo parzialmente essere trattate per abuso alcolico (182,183). La prevalenza della presenza di alcol, sulla base dell'alcolemia positiva al momento del ricovero nei pazienti coinvolti nei traumi, è tra 15-25% (184) e anche di più (>30%) nelle ore serali e in tarda notte (185). I bevitori eccessivi spesso sviluppano una sindrome da astinenza e sono perciò a rischio elevato nella morbilità post operatoria (es. sepsi, polmoniti e emorragia) e mortalità (186,187). L'identificazione e la disintossicazione dei pazienti con problemi alcol correlati significativi prima dell'intervento chirurgico può ridurre le complicazioni postoperatorie e di conseguenza i costi di ospedalizzazione (188,189). Studi recenti hanno trovato che il dosaggio della CDT può essere utilizzato con questo scopo (189,190). In aggiunta, i pazienti alcol dipendenti spesso continuano a consumare alcol fino a poco prima dell'intervento: combinando la CDT con un marcatore a breve termine sensibile, ad esempio l'EtG nelle urine, si potrebbe ulteriormente migliorare la possibilità di identificare precocemente questi pazienti ad alto rischio (191).

Nei soggetti alcol dipendenti in riabilitazione

I marcatori biochimici dell'alcol sono usati per monitorare l'aderenza al trattamento e l'individuazione in fase precoce di una recidiva durante il trattamento di pazienti ambulatoriali soggetti a dipendenza da alcol (191-193).

La risposta di differenti marcatori nei confronti di un'eccessiva assunzione di alcol può divergere considerevolmente tra individui. Nell'ambito di un insieme di marcatori quello più sensibile può essere identificato in seguito alle sue variazioni durante il periodo di astinenza da alcol (es ospedalizzazione o trattamento con disulfiram) (194). In certi pazienti, in caso di recente assunzione eccessiva di alcol, la GGT mostra una sensibilità più alta della CDT e perciò è stato raccomandato l'uso combinato di questi due marker (191). Dopo le dimissioni dal trattamento, si potrebbe continuare ad effettuare le analisi

o random o di routine in concomitanza della visita in clinica. Per monitorare il consumo acuto di alcol potrebbe essere utilizzato in parallelo un altro test. L'EtG urinario, molto più sensibile del test tradizionale dell'etanolo nell'aria espirata o nel sangue, per questo scopo si è dimostrato affidabile durante il trattamento ambulatoriale e può misurare i livelli, anche occasionali, che tipicamente precedono una ricaduta (37) (figura 5)

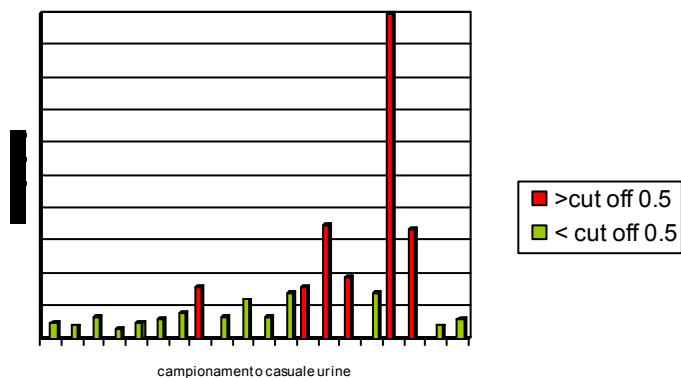


Figura 5 La misura nelle urine dell'etilglucuronide (EtG) fornisce un mezzo più sensibile per evidenziare una recente assunzione di alcol, ancora dopo parecchie ore che l'etanolo non è più misurabile. Durante il trattamento del paziente valutare il consumo acuto di alcol può essere utile per individuare l'assunzione occasionale che tipicamente precede la ricaduta (il cut-off dell'EtG che indica una recente assunzione di alcol è 0.5 mg/L).

Durante il campionamento in serie, un aumento del valore del test indica una ricaduta nell'assunzione di alcol ancora prima che la ricaduta sia individuata dal medico o ammessa dal paziente (195,196). Questa modalità può migliorare ulteriormente con la definizione di limiti di riferimento normale – patologici personalizzati al posto di quelli di popolazione (197,198). Questa strategia aumenterà anche la affidabilità dei risultati delle analisi (una più elevata specificità), poiché alcuni individui hanno valori basali fuori l'intervallo di riferimento, anche senza aver in precedenza bevuto. Fornendo ai pazienti una documentazione sui risultati dei test, ad esempio attraverso un grafico, essi possono migliorare il loro resoconto personale sull'apporto di alcol e quindi migliorare a lungo termine l'esito del trattamento (191,199).

In ambito legale

Per i marker di uso ed abuso alcolico ci sono molte applicazioni legali. Nella medicina del traffico, essi possono aiutare nell'identificazione dei soggetti alcol dipendenti tra quelli colpevoli di aver guidato in stato di ebbrezza (200,201). La CDT in combinazione con la GGT si è mostrata efficace nella conferma dell'astinenza, nell'individuazione delle ricadute dei guidatori in riabilitazione, nel rilascio delle patenti di guida e può ridurre le recidive dopo la riconcessione della patente (202).

In tossicologia forense misurare il rapporto 5HTOL/5HIAA e l'EtG può stabilire se l'etanolo ritrovato nel sangue e nelle urine del campione deriva da ingestione di alcol prima della morte o è un artefatto post mortem (56). E' ben noto che l'etanolo può formarsi nel corso durante il periodo che intercorre tra morte e autopsia dovuto a contaminazione microbica e scorretta conservazione del campione biologico (93). Di conseguenza, questi marcatori di abuso cronico acuto sono utili nei provvedimenti per guida in stato di ebbrezza poiché è comune prassi contestare i risultati relativi al dosaggio dell'etanolo chiamando in causa la contaminazione o la formazione di artefatti (203,206).

In ambito lavorativo

Le continue assenze dal lavoro così come gli infortuni sono spesso causati dall'uso e dall'abuso di alcol. L'utilizzo di questionari AUDIT, CDT e EtG ripetuto nel tempo possono dare indicazioni utili al Medico competente per eventuale inidoneità alla mansione e l'invio del lavoratore al SerT per la riabilitazione.

Un numero di studi effettuati nei posti di lavoro ha evidenziato che lo screening per il consumo pesante e a rischio di alcol, può ridurre il consumo di alcol (20,21). Per essere ben accettato dai dipendenti lo screening per uso di alcol può essere inserito in un contesto di programmi di medicina del lavoro longitudinali, uniti ad altri come l'ipercolesterolemia e l'ipertensione insieme ai check-up di routine (183). Di conseguenza lo screening potrà focalizzarsi principalmente sulla riduzione del rischio (es. la salute della persona) invece che sulla dipendenza da alcol.

CONCLUSIONI

I marcatori di stato dell'uso e dell'abuso alcolico sono un modo diretto e indiretto per stimare approssimativamente la quantità di alcol consumato e la durata dell'ingestione, evidenziano inoltre come l'abuso prolungato possa portare ad un effetto pericoloso sull'organismo. Il numero di marcatori biochimici dell'alcol sta aumentando e le applicazioni sia in ambito clinico che forense sono ora ben documentate. Quando usati in modo appropriato essi migliorano le conoscenze sulle abitudini sia individuali che nella popolazione in generale e rappresentano una metodologia di valutazione oggettiva del trattamento di cura. Per avere risposte corrette ed accurate al quesito diagnostico relativo all'assunzione di alcol occorre scegliere il o i marcatori idonei e quindi porsi domande appropriate e scelte corrette in relazione al problema clinico presente (tabella 2).

PER RISPONDERE AL PROBLEMA.....	LE DOMANDE DA PORSI SONO
.....assunzione acuta o cronica	<ol style="list-style-type: none"> 1. Il marcatore scelto rivela assunzioni croniche o acute recenti e/o gli effetti dannosi a lungo termine dell'abuso? 2. Utilizzare un solo marcatore o una combinazione di tests complementari?
.....tempo intercorso tra assunzione e campionamento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Qual è l'emivita biologica del marcatore? 2. Quanti dosaggi durante il follow up?
.....sensibilità ,specificità, valori predittivi	<ol style="list-style-type: none"> 1. Qual è la probabilità di ottenere una identificazione corretta della popolazione da studiare? 2. Quale è il cut off da utilizzare? E' meglio privilegiare la sensibilità o lo specificità? 3. Se il risultato fosse "positivo" è necessaria la conferma con un metodo specifico?
.....facilità di utilizzo e disponibilità	<ol style="list-style-type: none"> 1. E' accessibile il campione biologico? 2. Il test viene effettuato dal Laboratorio centrale o da un Laboratorio specializzato? 3. Quale è il tempo di attesa per il risultato? 4. Quanto costa il test?

Tabella 2 Problemi clinici ed analitici che devono essere considerati nello scegliere, per diverse finalità, l'appropriato marcatore di alcol

BIBLIOGRAFIA

1. Room R, Babor T, Rehm J. Alcohol and public health. *Lancet* 2005;365:519-530
2. Leon DA, Mc Cambridge J. Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2002: an analysis of routine data. *Lancet* 2006;367:52-6
3. Shkolikov V, Mc KKe M, Leon DA. Changes in life expectancy in Russia in the mid-1990s. *Lancet* 2001;357:917-21
4. Allen JP, Litten RZ. Recommendations on use of biomarkers in alcoholism treatment trials. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:1667-70
5. Alling C, Chick JD, Anton R. Revealing alcohol abuse: to ask or to test?" *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1257-63
6. Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, Saunders JB, Helander A, Tabakoff B. CDT,GGT and AST as markers of alcohol abuse: the WHO/ISBRA collaborative project. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:332-9
7. Niemelä O. Serum diagnosis of alcoholic liver disease and markers of ethanol intake, in : Sherman DIN, Preedy V, Watson RR. Editors. *Ethanol and the liver*. I. ed New York and London : Taylor and Francis;2002.p.441-449
8. Rosman AS, Lieber SC. Diagnostic utility of laboratory tests in alcoholic liver disease. *Clin Chem* 1994;40:1641-51
9. Anderson P, Baumberg B "Alcohol in Europe, a public health perspective . A report for the European Commission" June 2006
http://ec.europa.eu/health-eu/news_alcoholineurope_en.htm
10. Lieber CS. Medical disorders of alcoholism. *N Eng J Med* 1995;333:1058-65
11. Gunzerath L, Faden V, Zachari S, Warren K,. National institute on Alcohol abuse and Alcoholism report on moderate drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:829-47
12. Sillinauke P. Laboratory markers of alcohol abuse. *Alcohol Alcohol* 1996;31:613-6

13. Corrao G, Baganrdi V, Zambon A, La Vecchia C. A meta-analysis of alcohol consumption and the risk of 15 disease. *Prev Med* 2004;38:613-9
14. Goldberg DM, Hahn SE, Parker JG. Beyond alcohol: beverage consumption and cardiovascular mortality. *Clin Chim Acta* 1995;237:155-87
15. Lucas DL, Brown RA, Wassef M, Giles TD. Alcohol and the cardiovascular system research challenges and opportunities. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1916-24
16. Fleming MF, Mundt MP, French MT, Manwell LB, Stauffacher FA, Barry KL. Brief physician advice for problem drinkers: long term efficacy and benefit-cost analysis. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:36-43
17. Cherpitel CJ Alcohol and violence-related injuries in the emergency room. *Rec Dev Alcohol* 1997; 13:105-118
18. Shepherd J. Violent crime: the role of alcohol and new approaches to the prevention of injury. *Alcohol Alcohol* 1994; 29:5-10
19. D'Onofrio G, Degutis LC. Preventive care in the emergency department: screening and brief intervention for alcohol problems in the emergency department: a systematic review. *Acad Emerg Med* 2002;9:627-638
20. Hermansson U, Helander A, Huss A, Brand L, Ronnberg A. The Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) and carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in a routine workplace health examination. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 4:180-187
21. Reid MC, Fiellin DA, O'Connor PG. Hazardous and harmful alcohol consumption in primary care. *Arch Intern Med* 1999;159:1681-1689
22. Enoch MA, Goldman D. The genetics of alcoholism and alcohol abuse. *Curr Psychiatry Rep* 2001;3:144-151
23. Ratsma JE, Van der Stelt O, Gunning WB. Neurochemical markers of alcoholism vulnerability in humans. *Alcohol Alcohol* 2002;37:522-533
24. Schuckit MA. Genetics of the risk for alcoholism. *Am J Addict* 2000; 9:103-112

25. Gelernter J, Goldman D, Risch N. The A1 allele of the D2 dopamine receptor gene and Alcoholism. A reappraisal JAMA 1993; 269:1673-1677
26. Hoffman PL, Glanz Jj, Tabakoff B. Platelet adenyl cyclase activity as a state or trait marker in alcohol dependence: results of the WHO/ISBRA Study on State and Trait Markers in Alcohol Use and Dependence. Alcohol Clin Exp Res 2002; 26:1078-1087
27. Coccini T, Castoldi AF, Gandini C, Randine G, Vittadini G, Baiardi P, Manzo L. Platelet monoamine oxidase activity as a state marker for alcoholism: trend over time during withdrawal and influence of smoking and gender. Alcohol Alcohol 2002;37:566-572
28. Agarwal DP. Molecular genetic aspects of alcohol metabolism and alcoholism. Pharmacopsychiatry 1997;30:79-84
29. Higuchi S, Matsushida S, Murayama M, Takagi S, Hayashida M. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms and the risk for alcoholism. Am J Psychiatry 1995; 152:1219-1221
30. Yokoyama A, Muramatsu T, Omori T, Yokoyama T, Matsushida S, Higuchi S, Murayama K, Ishii H. Alcohol and aldehyde dehydrogenase gene polymorphisms and oropharyngolaryngeal, esophageal and stomach cancers in Japanese alcoholics. Carcinogenesis 2001; 22: 433-439
31. Peterson K. Biomarkers for alcohol Use and Abuse Alcohol Reserch and Health 2004;28:30-37
32. Zweig MH, Campell G receiver-operating characteristic (ROC) plots:a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem 1993;39:561-577
33. Jones AW. Measuring ethanol in saliva with the QED enzymatic test device:comparison of results with blood-alcohol concentration. J.An Toxicol 1995;19:169-173
34. Bendtsen P, Jones AW, Helander A. Urinary excretion of methanol and 5-hydroxytryptophol as biochemical markers of recent drinking in the hangover state. Alcohol Alcohol 1998; 33: 431-438
35. Midanik LT. Validity of the self reported alcohol use: a literature review and assessment. Br J Addict 1988;83:1019-30
36. Fuller RK, Lee KK, Gordis E. Validity of the self report in alcoholism reaserchs: results of a Veterans Administration cooperative study. Alcohol Clin Exp Res 1998;12:201-205
37. Helander A, von Wachenfeldt J, Hitunen A, Beck O, Liljeberg P, Borg S. Comparison of urinary 5 hydroxytryptophol, breath ethanol and self report for detection of recent alcohol use during outpatient treatment: a study on methadone patients. Drug Alcohol Depend 1999;56:33-38
38. Jones W, Schuberth J. Computer-aided headspace gas chromatography applied to blood-alcohol analysis: importance of on-line process control. J Forens Sci 1996;34:1116-27
39. Bendtsen S, Hultberg J, Carlsson M, Jones AW. Monitoring ethanol exposure in a clinical setting by analysis of blood, breath, saliva and urine. Alcohol Clin Exp Res 1999;23:1446-1451
40. Smolle KH, Hoffman G, Kaufmann P, Lueger A, Brunner G. QED Alcohol test: a simple and quick method to detect ethanol in saliva of patients in emergency departments. Comparison with the conventional determination in blood. Intensive Care Med 1999;25:492-495
41. Helander A, Beck O, Jones AW. Laboratory testing for recent alcohol consumption: comparison of ethanol, methanol and 5-hydroxytryptophol. Clin Chem 1996;42:618-24
42. Dahl H, Stephanson N, Beck O, Helander A. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethylglucuronide. J Anal Toxicol 2002;26:201-204
43. Jaakonmaki PI, Knox KL, Horning EG, Horning MG. The characterization by gas-liquid chromatography of ethyl- β -D-glucuronic acid as a metabolite of ethanol in rat and man. Eur J Pharmacol 1967;1:63-70

44. Schmitt G, Droenner P, Skopp G, Aderjan R. Ethyl glucuronide concentration in serum of volunteers, teetotallers and suspected drinking drivers. *J Forensic Sci* 1997;42:1099-1102
45. Nishiwaka M, Tsuchihashi H, Miki A, Katagi M, Schmitt G, Zimmer H, Keller T, Aderjan R. Determination of ethyl glucuronide, a minor metabolite of ethanol, in human serum by liquid chromatography-electron spray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;726:105-110
46. Schmitt G, Aderjan R, Keller T, Wu M. Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data and determination in serum and urine. *J Anal Toxicol* 1995;19:91-94
47. Stephanson N, Dahl H, Helander A, Beck O. Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2002;24:645-651
48. Seidl S, Wurst FM, Alt A. Ethyl glucuronide – a biological marker for recent alcohol consumption. *Addict Biol* 2001;6:205-212
49. George S, Braithwaite RA. An investigation into the extent of possible dilution of specimens received for urinary drugs of abuse screening. *Addiction* 1995;90:967-970
50. Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol* 2008;43:46-48
51. Davis VE, Brown H, Huff JA, Cashaw JL. The alteration of serotonin metabolism to 5-hydroxytryptophol by ethanol ingestion in man *J Lab Clin Med* 1967;69:132-140
52. Helander A, Beck O, Jacobsson G, Löwenmo C, Wilkeström T. Time course of ethanol-induced changes in serotonin metabolism. *Life Sci* 1993;53:847-855
53. Svensson S, Some M, Lundsjö A, Helander A, Conholm T, Höög J-O. Activities of human alcohol dehydrogenases in metabolic pathways of ethanol and serotonin. *Eur J Biochem* 1999;262:324-329
54. Helander A, Eriksson CJ. Laboratory tests for acute alcohol consumption: results of the WHO/ISBRA Study on State and Trait Markers of Alcohol Use and Dependence. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1070-1077
55. Beck O, Helander A, Carlsson M, Borg S. Changes in serotonin metabolism during treatment with the aldehyde dehydrogenase inhibitors disulfiram and cyanamide. *Pharmacol Toxicol* 1995;77: 323-326
56. Helander A, Beck O, Boysen L. 5-hydroxytryptophol conjugation in man: influence of alcohol consumption and altered serotonin turnover. *Life Sci* 1995; 56: 1529-1534
57. Voltaire A, Beck O, Borg S "Urinary 5-hydroxytryptophol: a possible marker of recent alcohol consumption" *Alcohol Clin Exp Res* 1992; 16: 281-285
58. Helander A, Beck O, Wennberg M, Wilkeström T, Jacobson G. Determination of 5-hydroxyindol-3-acetic acid by high performance liquid chromatography with electrochemical detection and direct sample injection. *Anal Biochem* 1991;196: 170-173
59. Niemelä O. Serum diagnosis of alcoholic liver disease and markers of ethanol intake. In : Sherman DIN, Preedy V, Watson RR, editors. *Ethanol and the liver*. 1 ed. New York and London: Taylor and Francis; 2002.p411-49
60. Freeman TL, Tuma DJ, Thiele GM, et al. Recent advances in alcohol-induced adduct formation. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1310-6
61. Niemelä O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1533-8
62. Tyulina OV, Prokopieva VD, Boldyrev AA, Johnson P. Erythrocyte and plasma protein modification in alcoholism: a possible role of acetaldehyde. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762:558-63
63. Peterson CM, Jovnovic-Peterson L, Schmid-Formby F. Rapid association of acetaldehyde with haemoglobin in human volunteers after low dose ethanol. *Alcohol* 1988;5:371-4
64. Niemelä O, Israel Y. Hemoglobin-acetaldehyde adducts in human alcohol abusers. *Lab Invest* 1992;67:246-52

65. Stevens VJ, Fantl WJ, Newnan CB, Sims RV, Cerami A, Peterson CM. Acetaldehyde adducts with haemoglobin. *J Clin Invest* 1981;67:361-9
66. Latvala J, Hietala J, Koivisto H, Järvi K, Anttila P, Niemelä O. Immune responses to ethanol metabolites and cytokine profiles differentiate alcoholics with and without liver disease. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1303-10
67. Hietala J, Koivisto H, Latvala J, Anttila P, Niemelä O. IgAs against acetaldehyde modified red cell protein as a marker of ethanol consumption in male alcoholics, moderate drinkers and abstainers. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30:1693-8
68. Worrall S, de Jersey J, Wilce PA, Seppä K, Hurme L, Sillanaukee P. Relationship between alcohol intake and immunoglobulin A immunoreactivity with acetaldehyde-modified bovine serum albumin. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20:836-40
69. Gustavsson L, C. Blood phosphatidylethanol in rat brain by phospholipase D. *Bioch Biophys Res Comm* 1987;142:958-63
70. Kobayashi M, Kanfer JN. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylolation by rat brain synaptosomal phospholipase D. *J Neurochem* 1987;48:157-603
71. Alling C, Chick JD, Anton R et al. Revealing alcohol abuse: to ask or to test? *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:1257-63
72. Wurst FM, Alling C, Aradottir S, et al. Emerging biomarkers: new direction and clinical applications. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:465-73
73. Varga A et al. Phosphatidylethanol in blood as a marker of ethanol consumption in healthy volunteers: comparison with other markers. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1832-7
74. Aradottir S, Asanovska G, Gjerss S, Hansson P, Alling C. Phosphatidylethanol in blood are correlated to report alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* 2006;41:431-437
75. Laposata M. Fatty acid ethyl esters: nonox metabolites of ethanol. *Addict Biol* 1988;3:5-14
76. Hamamoto T et al. Nonoxidative metabolism of ethanol in the pancreas: implication in alcoholic pancreatitis damage. *Biochem. Pharmacol* 1990;39:241-5
77. Laposata EA et al. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* 1986;231:487-9
78. Lange LG et al. Identification of fatty acid ethylesters as a product of rabbit myocardial metabolism. *J Biol Chem* 1981;256:12968-73
79. Laposata M. Differences in the fatty acid composition of fatty acid ethyl esters in organs and their secretions. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1488-91
80. Laposata M. Fatty acid ethyl esters: recent observations. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acid* 2002;67:193-6
81. Doyle KM. Fatty acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake. *JAMA* 1997;277:792
82. Chick J, Kreitman N, Plant M. Mean cell volume and gamma-glutamyltransferase as markers of drinking in working men. *Lancet* 1981; i: 1249-1251
83. Aubin HJ, Laureaux C, Zerah F, Tilikete S, Vernier F, Vallat B, Barrucand D. Joint influence of alcohol, tobacco, and coffee on biological markers of heavy drinking in alcoholics. *Biol Psychiatry* 1998;44: 638-643
84. Nilssen O, Førde OH. Seven year longitudinal population study of change in gamma-glutamyltransferase: The Trømsø study. *Am J Epidemiol* 1994;139:787-792
85. Rosalki SB, Rau D. Serum gamma-glutamyltranspeptidase activity in alcoholism. *Clin Chim Acta* 1972;39:41-47
86. Tanaka K, Tokunaga S, Kono S, Tokudome S, Akamatsu T, Moriyama T, Zakouji H. Coffee consumption and decreased gamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. *Int J Epidemiol* 1998;27:438-443
87. Helander A, Tabakoff B. Biochemical markers of alcohol use and abuse: experiences from the Pilot Study of the WHO/ISBRA Collaborative, project on state and trait markers of alcohol. *International Society for Biomedical Research on Alcoholism. Alcohol Alcohol* 1997;32:133-44

88. Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Anttila P, Niemelä O. Comparison of the combined marker GGT-CDT and the conventional laboratory markers of alcohol abuse in heavy drinkers, moderate drinkers and abstainers. *Alcohol Alcohol* 2006;41:528-33
89. Salaspuro M. Conventional and coming laboratory markers of alcoholism and heavy drinking. *Alcohol Clin Exp Res* 1986; 10:5S-12S
90. Anton RF, Lieber C, Tabakoff B. carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase for the detection and monitoring of alcohol use: results from a multisided study. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1215-22
91. Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* 2003;98(Suppl2):31-43
92. Hietala J, Puukka K, Koivisto H, Anttila P, Niemelä O. Serum gamma-glutamyltransferase in alcoholics, moderate drinkers and abstainers: effect on GT reference intervals at population level. *Alcohol Alcohol* 2005;40:511-4
93. Anton RF, Moak DH. Carbohydrate deficient and gamma-glutamyltransferase as markers of heavy alcohol consumption: gender differences. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:747-54
94. Yersin B, Nicolet JF, Dercrey H, Burnier M, van Melle G, Pecoud A. Screening for excessive alcohol drinking. Comparative value of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase and mean corpuscular volume. *Arch Intern Med* 1995;155:1907-11
95. Mundle G, Munkes J, Ackermann K, Mann K. Sex differences of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase and mean corpuscular volume in alcohol-dependent patients. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1400-5
96. Daepfen JB, Smith TL, Schuckit MA. Influence of age and body mass index on gamma-glutamyltransferase activity: a 15-year follow up evaluation in a community sample. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:941-4 Lam GM
97. Lam GM, Mobahar S. Central obesity and elevated liver enzymes. *Nutr Rev* 2004;62:394-9
98. Lawlor DA, Sattar N, Smith GD, Ebrahim S. The associations of physical activity and adiposity with alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase. *Am J Epidemiol* 2005;161:1081-8
99. Puukka K, Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Bloigu R, Niemelä O. Additive effects of moderate drinking and obesity on serum gamma-glutamyltransferase activity. *Am J Clin Nutr* 2006;83:1351-4
100. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004;114:1752-61.
101. Lee DH, Blomhoff R, Jacobs Jr DR. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of oxidative stress?. *Free Rad Res* 2004;38:535-9
102. Nakanishi N, Nakamura K, Suzuki K, Tatara K. Lifestyle and serum gamma-glutamyltransferase: a study of middle-aged Japanese men. *Occup Med (Lond)* 2000;50:115-20
103. Gelatti U, Covolo L, Franceschini M, et al. Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *J Hepatol* 2005;42:528-34
104. Klatsky AL, Morton C, Udaltsova N, Friedman GD. Coffee, cirrhosis and transaminase enzymes. *Arch Intern Med* 2006;166:1190-5,
105. Speisky H, Shackel N, Varghese G, Wade D, Israel Y. Role of hepatic gamma-glutamyltransferase in the degradation of circulating glutathione: studies in the intact guinea pig perfused liver. *Hepatology* 1990;11:843-9
106. Shoveller AK, Stoll B, Ball RO, Burrin DG. Nutritional and functional importance of intestinal sulphur amino acid metabolism. *J Nutr* 2005;135:1609-12
107. Conigrave KM, Degenhardt LJ, Whitfield JB, Saunders JB, Helander A, Tabakoff B. CDT, GGT, and AST as marker of alcohol abuse; the WHO/ISBRA collaborative project. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:332-339
108. Puukka K, Hietala J, Koivisto H, Anttila P, Bloigu R, Niemelä O. Age-related change on serum gamma-glutamyltransferase activity and the assessment of ethanol intake. *Alcohol Alcohol* 2006;41:522-7

109. Sillauke P, Aalto M, SeppäK. Carbohydrate-deficient transferrin and conventional alcohol markers as indicator for brief intervention among heavy drinkers in primary health care. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:892-6
110. Stromme JH, Rustad P, Steensland H, Theodorsen L, Urdal P. Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37°C: part of the Nordic Reference Interval Project. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64:371-84
111. Chan AW, Leong FW, Schanley DL, et al. Transferrin and mitochondrial aspartate aminotransferase in young adult alcoholics. *Drug Alcohol Depend* 1989;23:13-8
112. Chan AW. Racial differences in alcohol sensitivity. *Alcohol Alcohol* 1986;21:93-104
113. Moussavian SN, Becker RC, Pipmeyer JL, Mezey E, Bozian RC. Serum gamma-glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism. Influence of alcohol ingestion and liver disease. *Dig Dis Sci* 1985;30:211-4
114. Savage DG, Ogundipe A, Allen RH, Stabler SP., Lindenbaum J. Etiology and diagnostic evaluation of macrocytosis. *Am J Med Sci* 2000;319:343-52
115. Wymer A, Becker DM. recognition and evaluation of red blood cell macrocytosis in the primary care setting. *J Gen Intern Med* 1990;5:192-7
116. Morgan MY, Camilo MF, Luck W, Sherlock S, Hoffbrand AV. Macrocytosis in alcohol-related liver disease: its value for screening. *Clin Lab Haematol* 1981;3:35-44i
117. Koivisto H, Hietala J, , Anttila P, Parkkila S, Niemelä O. Long-term ethanol consumption and macrocytosis: diagnostic and pathogenic implications. *J Lab Clin Med* 2006;147:191-6
118. Nordin G, Mårtenson A, Swolin B et al. A multicentre study of reference intervals for haemoglobin, basic blood cell counts and erythrocyte indices in the adult population of the Nordic countries. *Scan J Clin Lab Invest* 2004;64:385-98
119. Sarkola T, Eriksson CJP, Niemelä O, Sillanaukee P, Halmesmäki F. Mean cell volume and gamma-glutamyltransferase are superior to carbohydrate -deficient transferrin and hemoglobin-acetaldehyde adducts in the follow-up of pregnant women with alcohol abuse. *Acta Obstet Gynecol Scan* 2000;79:359-66
120. Lindenbaum J. Hematologic complications of alcohol abuse. *Semin Liver Dis* 1987;7: 169-81
121. Maruyama S, Hirayama C, Yamamoto S et al. Red blood cell status in alcoholic and non-alcoholic liver disease. *J Lab Clin Med* 2001;138:332-7
122. Eriksson CJP. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:15S-32S
123. Latvala J, Parkkila S, Melkko J, Niemelä O. Acetaldehyde adducts in blood and bone marrow of patients with ethanol-induced erythrocyte abnormalities. *Mol Med* 2001;7:401-5
124. Niemelä O, Parkkila S. Alcoholic macrocytosis – is there a role for acetaldehyde and adducts?. *Addict Biol* 2004;9:3-10
125. Tyulina OV, Prokovieva VD, Boldyrev AA, Johnson P. Erythrocyte and plasma protein modification in alcoholism: a possible role of acetaldehyde. *Biochem Biophys Acta* 2006;1762:558-63
126. Hernández-Muñoz R, Baraona E, Blacksberg I, Lieber CS. Characterization of the increased binding of acetaldehyde to red blood cells in alcoholics. *Alcohol Clin Exp Res* 1989;13:634-9
127. Peterson CM, Jovanovic-Peterson L, Schmid-Formby F. rapid association of acetaldehyde with haemoglobin in human volunteer after low dose ethanol. *Alcohol* 1988;5:371-4
128. Niemelä O, Israel Y. Hemoglobin-acetaldehyde adducts in human alcohol abusers. *Lab Invest* 1992;67:246-52
129. Stevens VJ, Fantl WJ, Newna CB, Sims RV, Cerami A, Peterson CM. Acetaldehyde adducts with haemoglobin. *J Clin Invest* 1981; 67:361-9

130. Yokohama A, Yokohama T, Muramatsu T et al. Macrocytosis, a new predictor for esophageal squamous cell carcinoma in Japanese alcoholic men. *Carcinogenesis* 2003;24:1773-8
131. Latvala J, Parkkila S, Niemelä O. Excess alcohol consumption is common in patients with cytopenia: studies in blood and bone marrow cells. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:619-24
132. Scouller K, Conigrave KM, Macaskill P, Irwing L, Whitfield JB. Should we use carbohydrate-deficient transferrin instead of gamma-glutamyltransferase for detecting problem drinkers? A systematic review and meta-analysis. *Clin Chem* 2000;46:1894-902
133. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991;37: 2029-2037
134. Salaspuro M. Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol* 1999;19:261-71
135. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin a markers of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis and interpretation. *Clin Chem* 2001;47:13-27
136. Sillanaukee P, Strid N, Allen JP, Litten RZ. Possible reasons why heavy drinking increases carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:34-40
137. Xin Y, Lasker JM, Lieber CS. Serum carbohydrate-deficient transferrin: mechanism of increase after chronic alcohol intake. *Hepatology* 1995;22:1462-8
138. LöfK, Lindros K, Seppä K et al. The effect of ethanol or hepatotoxin exposure on rat transferrin desialylation. *Alcohol* 1996;31:445-51
139. Legros FJ, Nuyens V, Minet E et al. Carbohydrate-deficient transferrin isoforms measured by capillary zone electrophoresis for detection of alcohol abuse. *Clin Chem* 2002;48:2177-86
140. Legros FJ, Nuyens V, Baudoux M et al. Use of capillary zone electrophoresis for differentiating excessive from moderate alcohol consumption. *Clin Chem* 2003;49:440-9
141. Meerkerk GJ, Njoo KH, Bongers IM, Trienekens P, van Oers JA. The specificity of the CDT assay in general practice: the influence of common chronic diseases and medication on the serum CDT concentration. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:908-913
142. DiMartini A, Day N, Lane T, Beisler AT, Dew MA, Anton R. Carbohydrate-deficient transferrin in abstaining patients with end-stage liver disease. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1729-1733
143. Helander A, Eriksson G, Stibler H, Jeppsson J-O. Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 2001; 47:1225-1233
144. Freeze HH. Update and perspectives on congenital disorders of glycosation. *Glycobiology* 2001;11:129R-143R
145. Helander A, Nordin G. Insufficient standardization of a direct carbohydrate-deficient transferrin immunoassay. *Clin Chem* 2008;54:6:1090-1091
146. Dade Behring GmbH Urgent Field Safety Note BR-040008 2008-04-01
147. Jeppsson J-O, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JPM, Anton RF, Whitfield JB, Helander A "Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method" *Clin Chem Lab Med* 2007;45:558-562
148. Anton RF, Dominick C, Bigelow M, Westby C. Comparison of Bio-rad% CDT TIA and CDTtecc as laboratory markers of heavy alcohol use and their relationships with gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem* 2001;47:1769-75
149. Helander A. Absolute or relative measurement of carbohydrate-deficient transferrin in serum? Experiences with three immunological assays. *Clin Chem* 1999; 45: 131-135
150. Keating J, Cheung C, Peters TJ, Sherwood RA. Carbohydrate-deficient transferrin in the assessment of alcohol misuse: absolute or relative measurements? A comparison of two methods with regard to total transferrin concentration. *Clin Chim Acta* 1998: 272:159-69

151. Viitala K, Lähdesmäki K, Niemelä O, Comparison of the Axis% CDT TIA and the CDTest method as laboratory tests of alcohol abuse. *Clin Chem* 1998;44:1209-15
152. Helander A, Wielders JP, Te SR, Bergström JP. Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 2005;51:1528-31
153. Arndt T, Kropf J. Alcohol abuse and carbohydrate-deficient transferrin analysis: are screening and confirmatory analysis required? *Clin Chem* 2002;48:2072-4
154. Appenzeller BM, Wenning R, Altered distribution of transferrin according to serum storage. ? *Clin Chem* 2005;51:2159-62
155. Renner F, Kanitz RD. Quantification of carbohydrate-deficient transferrin by ion-exchange chromatography with an enzymatically prepared calibrator. *Clin Chem*.1997;43:485-90
156. Dibbelt L. Does trisialo-transferrin provide valuable information for the laboratory diagnosis of chronically increased alcohol consumption by determination of carbohydrate-deficient transferrin? *Clin.Chem.* 2000;46:1203-1205
157. Arndt T. Asialotransferrin-an alternative to carbohydrate-deficient transferrin?. *Clin Chem* 2003;49:1022-3
158. Aldén A, Ohlson S, Pålsson P, Rydén I. HPLC analysis of carbohydrate-deficient transferrin isoforms isolated by the Axis-Shield%CDT method. *Clin Chim Acta* 2005;356:143-6
159. Fleming MF, Anton RF, Spies CD. A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1347-55
160. Anttila P, Järvi K, Latvala J, Niemelä O. Method-dependent characteristics of carbohydrate-deficient transferrin measurements in the follow-up of alcoholics. *Alcohol Alcohol* 2004;39:59-63
161. Ohtuka T, Tsutsumi M, Fukumura A, Tsuchishima M, Takase S. Use of serum carbohydrate-deficient transferrin values to exclude alcoholic hepatitis from non-alcoholic steatohepatitis: a pilot study. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:236S-9S
162. Bergström JP, Helander A "Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking on the serum transferrin glycoform pattern: implications for use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker" *Clin Chim Acta* 2007 doi:10.1016/j.cca.2007.10.011
163. Helander A, Husa A, Jeppsson J-O. Improved HPLC method for Carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin.Chem* 2003;49:1881-1890
164. Helander A Chromatographic measurement of transferrin glycoforms for detecting alcohol abuse and congenital disorders of glycosylation in Chromatographic methods in clinical chemistry and toxicology edited by R L Bertholf and R.E Winnecker Wiley (2007)
165. Helander A. Biological markers in alcoholism. *J Neural Transm Suppl* 2003;15-32
166. Delanghe JR, Helander A, Wielders JPM, Pekelharing JM, Roth H, Schelleberg F, Born C, Yagmur E, Gentzer W, Althaus H. Development and multicenter evaluation of the N Latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem* 2007;53:1115-1121
167. Simonsson P, Lindberg S, Alling C. Carbohydrate-deficient transferrin measured by high-performance liquid chromatography and CDTest immunoassay. *Alcohol Alcohol* 1996;31: 397-402
168. 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
169. Allen J, Sillanaukee P " carbohydrate-deficient transferrin is a useful marker for the detection of chronic alcohol abuse (letter) *Eur J Clin Invest* 1999;29:899-901
170. Arndt T, Gilg T, Soyka M " Alkoholismus-Diagnose: CDT-Test hilft doch (Diagnosis of alcoholism: CDT test does help) *MMW Fortschr Med* 2000;142:10-1
171. Watson RR, Mohs ME, Eskelson C, Sampliner RE, Hartmann B. Identification of alcohol abuse and alcoholism with biological parameters. *Alcohol Clin Exp Res* 1986;10:364-85

172. Sillanauke P, Olsson U. Improved diagnostic classification of alcohol abusersw by combining carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase. *Clin Chem* 2001;47:681-5
173. Anttila P, Järvi K, Iatvala J, Blake JE, Niemelä O. A new modified gamma-%CDT method improves the detection of problem drinking: studies in alcoholics with or without liver disease. *Clin Chim Acta* 2003;338:45-51
174. Borucki K, Kunstman S, Dierkes J et al. In heavy drinkers fatty acid ethyl esters in the serum are increased for 44hr after ethanol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1102-06
175. Whitfield JB, Zhu G, Heath AC, Powell LW, Martin NG. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:1037-45
176. Choi HK, Atkunson K, Karlson EW, Willett W, Curhan G. Alcohol intake and risk of incident gout in men: a prospective study *Lancet* 2004;363:1277-81
177. Nishiota K, Sumida T, Iwatani M et al. Influence of moderate drinking on purine and carbohydrate metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:20S-5S
178. Mc Quade WH, Levy SM, Yanek LR, Davis SW, Liepman MR. Detecting symptoms of alcohol abuse in primary care setting. *Arch Fam Med* 2000;9:814-821
179. Aertgeerts B, Buntix F, Ansoms S, Fevery J. Screening proprieties of questionnaires and laboratory tests for the detection of alcohol abuse or dependence in a general practice population . *Br J Gen Pract* 2001;51:206-217
180. Meerkerk GJ, Njoo KH, Bongers IM, Trienekens P, van Oers JA. Comparing the diagnostic accuracy of carbohydrate-deficient transferrin, gamma-glutamyltransferase and mean cell volume in a general practice population. *Alcohol Clin Exp Res* 1999;23:1052-1059
181. Hermansson U, Knutsson A, Rönnerberg S, Brant L. Feasibility of brief intervention in the work place for the detection and treatment of excessive alcohol consumption. *Int J Occup Environ Health* 1998;4:71-78,
182. Carrigan TD, Field H, Illingwood RN, Gaffney P, Hamer DW. Toxicological screening in trauma. *J Acc Emerg Med* 2000;17:33-37
183. Hearne R, Connolly A, Sheehan J. Alcohol abuse: prevalence and detection in a general hospital. *J R Soc Med* 2002;95: 84-87
184. Cherpitel CJ, Griesbrecht N, McDonald S. Alcohol and injury: a comparison of emergency room population in two Canadian provinces. *Am J Drug Alcohol Abuse* 1999;25: 743-759
185. Holt S, Steward IC, Dixon JM, Elton RA, Taylor TV, Little K. Alcohol and the emergency service patient. *Br Med J* 1980;281:638-640
186. Eggers V, Tio J, Neumann T, Pragst F, Muller C, Schmidt LG, Knox WJ, Spies CD. Blood alcohol concentration for monitoring ethanol treatment to prevent alcohol withdrawal in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 2002;28:1475-1482
187. Martin MJ, Heymann C, Neumann T, Schmidt L, Soost F, Mazurek B, Bonn B, Marks C, Helling K, Lenzenhuber E, Muller C, Knox WJ, Spies CD. Preoperative evaluation of chronic alcoholists assessed for surgery of the upper digestive tract. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:836-840
188. Spies CD, Nordmann A, Brummer G, Marks C, Conrad D, Berger G, Runkel N, Neumann T, Müller C, Rommelspracher H, Specht M, Hannemann L, Striebel HW, Schaffartzik W. Intensive care unit stay in prolonged in cronic alcoholic men following tumor resection of the upper digestive tract. *Acta Anaesthesiol Scan* 1996;40:649-656
189. Tønnesen H. The alcohol patient and surgery. *Alcohol Alcohol* 1999;34:148-152
190. Spies CD, Kissner M, Neumann T, Blum S, Voigh C, Funk T, Runkel N, Pragst FW. Elevated carbohydrate-deficient transferrin predicts prolonged intensive care unit stay in traumatized men. *Alcohol Alcohol* 1998;33:661-669
191. Helander A, Voltaire Carlsson A, Borg S. Longitudinal comparison of carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase: complementary markers of excessive alcohol consumption *Clin Chem* 1996;42:618-624

192. Huseby NE, Bjordal E, Nilssen O, Barth T. Utility of biological markers during outpatient treatment of alcohol-dependent subject: carbohydrate-deficient transferrin responds to moderate changes in alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21:1343-1346
193. Voltaire Carlsson A, Hiltunen AJ, Beck O, Stibler H, Borg S. Detection of relapses in alcohol dependent patients: comparison of carbohydrate-deficient transferrin in serum, 5-hydroxytryptofol in urine and self report. *Alcohol Clin Exp Res* 1993;17:703-708.
194. Helander A, Carlsson S. Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase levels during disulfiram therapy. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20: 1202-1205
195. Mitchell C, Simpson D, Chick J. Carbohydrate-deficient transferrin in detecting relapse in alcohol dependence. *Drug Alcohol Depend* 1997;48:97-103,
196. Rosman AS, Basu P, Galvin K, Lieber CS. Utility of carbohydrate-deficient transferrin as a marker of relapse in alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:611-616
197. Borg S, Helander A, Voltaire Carlsson A, Högström-Brandt A-M. Detection of relapses in alcohol dependent patients using carbohydrate-deficient transferrin: improvement with individualized reference levels during long-term monitoring. *Alcohol Clin Exp Res* 1995;19:961-963
198. Irving M, Baird S, Smith TL, Schuckit M. Use of the laboratory tests monitor heavy drinking by alcoholic men discharged from a treatment program" *Am Psychiatry* 1988;145:595-599,
199. Kristenson H, Österling A, Nilsson JÅ, Lingärde F. Prevention of alcohol-related deaths in middle-aged heavy drinkers. *Alcohol Clin Exp Res*, 2002;26:478-484
200. Ifflan R. New ways to use biochemical indicators of alcohol abuse to regrant licences in a fairer manner after drunken driving in Germany. *Alcohol Alcohol* 1996;31:619-620
201. Staak M, Ifflan R. Alcoholism detection markers in blood samples of road users. *Arukoru Kenkyuto Yakubutsu Izon* 1992;27:42-49
202. Kristenson H, Jeppsson J-O. drunken driver examinations. CD-transferrin is a valuable marker of alcohol consumption. *Läkartidningen* 1998;95:1429-1430
203. Dorasfar AH, O'Boyle DJ, McCloy RF. Effects of a moderate dose of alcohol on simulated laparoscopic surgical performance. *Surg Endosc* 2002;16:1753-58
204. Raglan DR, Krause N, Griener BA, Holman BI, Fisher JM, Cunradi CB. Alcohol consumption and incidence of workers' compensation claims: a 5-years prospective study of urban transit operators. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1388-1394
205. Wiese JG, Shlipak MG, Browner WS. The alcohol hangover. *Ann Intern Med* 2000;132:897-902
206. Yesavage JA, Dolehrt N, Taylor JL. Flight simulator performance of younger and older aircraft pilots: effects of age and alcohol. *J Am Geriatr Soc* 1994;42:577-582

INDICE

Introduzione

Consumo di alcol e problemi sanitari

Biomarcatori

Marcatori genetici

Definizione di biomarcatore

Sensibilità, specificità e valori predittivi dei marcatori biologici

Biomarcatori di abuso alcolico

Biomarcatori di consumo alcolico acuto

Etanolo

Etilglucuronato

Rapporto 5HTOL/5HAIA

Addotti dell'acetaldeide

Fosfatidiletanolo

Esteri etilici degli acidi grassi

Biomarcatori di consumo alcolico cronico

Marcatori convenzionali

Aminotransferasi ALT e AST

Gamma-Glutamiltransferasi (GGT)

Volume Corpuscolare Medio (MCV)

Altre anomalie delle cellule ematiche

Transferrina Carboidrato Carente (CDT)

Metodi per il dosaggio della CDT

CDT come marcatore clinico

Variazioni fisiologiche

Efficienza diagnostica

Sensibilità diagnostica

Specificità diagnostica

Valori decisionali

GGT e CDT in combinazione

Altri parametri di laboratorio alcol-sensibili

Applicazioni dei marcatori biologici non tradizionali dell'abuso alcolico

Nella Medicina di base

In Ospedale

Nei soggetti in riabilitazione

In ambito legale

Conclusioni