

Biomarkörer kan fånga tidigt riskbruk av alkohol

Alkoholmarkörer ger svart på vitt om en persons alkoholintag över tid. Därmed kan riskbruk fastställas tidigt. Detta ger möjligheter att nå ut till många fler med professionell hjälp för att minska alkoholrelaterade skador.

ANDERS HELANDER, adjungerad professor, Alkoholab, institutionen för laboratoriemedicin, Karolinska institutet och Karo-

linska universitetslaboratoriet, Stockholm
anders.helander@ki.se

Alkohol konsumeras mer eller mindre regelbundet av det stora flertalet i befolkningen. Ingen torde vara omedveten om att regelbunden hög alkoholkonsumtion och berusningsdrickande är vanliga riskfaktorer för en rad negativa medicinska och sociala konsekvenser som drabbar individen själv, familj, andra närstående och arbetskollegor såväl som helt utomstående.

Sammantaget kostar alkoholen samhället enorma belopp på grund av produktionsbortfall, olyckor (tex fall-, drucknings- och fordonsolyckor) och brottslighet (tex störande av ordning, misshandel, dråp och mord) samt i form av hälsoproblem, sjukdomar och missbruks- och beroendevård. Organskador på lever (cirros) och bukspottkörtel (pankreatit) och störd fosterutveckling (fetala alkoholspektrumstörningar) är välkända medicinska konsekvenser av alkoholöverkonsumtion. Totalt inkluderar dock fler än 30 koder i det internationella sjukdomsklassificeringssystemet ICD-10 alkohol i sitt namn eller sin definition; alkohol är dessutom en bidragande eller komplicerande faktor för ytterligare fler än 200 sjukdomstillstånd [1].

För att kunna erbjuda adekvat sjukvård krävs kännedom om grundproblemet och förekomst av riskfaktorer, vilket ofta är svårt när det gäller alkohol. Förnekande av alkoholkonsumtion och underrapportering av omfattningen och varaktigheten är mycket vanligt, varför det dolda risk- och missbruket är betydande. Utandningsprov används i syfte att upptäcka alkoholpåverkan eller aktuellt bruk, med den viktiga begränsningen att etanolen är mätbar endast under ett fåtal (<12) timmar även efter ett större intag [2].

För att påvisa alkoholöverkonsumtion och relaterade skador utnyttjas därför olika laboratorietest, där »leverenzymerna« (GT, ALAT och ASAT) och MCV (erytrocytmedelvolum) länge varit dominerande. En begränsning med dessa test är dålig sensitivitet för tidig upptäckt av riskabelt bruk. En an-

»Förnekande av alkoholkonsumtion och underrapportering av omfattningen och varaktigheten är mycket vanligt...«

nan begränsning är dålig specificitet för alkohol, eftersom det finns åtskilliga andra orsaker till förhöjda mätvärden, tex andra leversjukdomar och viss läkemedelsbehandling.

I Sverige har det under lång tid pågått forskningsarbete syftande till att utveckla känsligare och mer träffsäkra alkoholmarkörer, som kan påvisa ett enskilt intag betydligt längre tid efteråt än ett utandningsprov och överkonsumtion innan den har medfört allvarliga medicinska konsekvenser. På senare tid har utbudet av biomarkörer förändrats, och det har tillkommit ny kunskap som kan påverka tolkningen.

Denna artikel beskriver det aktuella kunskapsläget vad gäller nyare alkoholmarkörer och exemplifierar hur de kan utnyttjas kliniskt genom några fallbeskrivningar.

Etylglukuronid (EtG) och etylsulfat (EtS) i urin

Efter alkoholintag oxideras merparten av etanolen till acetaldehyd av alkoholdehydrogenas (ADH) i framför allt levern. En liten andel (<0,1 procent) konjugeras i stället med glukuronsyra eller sulfat och utsöndras i urinen som etylglukuronid (EtG) respektive etylsulfat (EtS). Redan inom 1 timme efter ett alkoholintag kan EtG och EtS påvisas i urinen [3], där EtG generellt är den kvantitativt viktigaste. Båda metaboliterna elimineras betydligt långsammare än etanol, där detektions-tiden primärt beror på alkoholmängden [4]. EtG och EtS mäts med vätskekromatografisk-masspektrometrisk (LC-MS) metodik, som möjliggör samtidig analys av båda metaboliterna. För EtG finns även en immunkemisk screeningmetod.

EtG och EtS är känsliga och specifika urinmarkörer som används för att upptäcka aktuell alkoholkonsumtion även sedan etanolen försvunnit ur kroppen eller för att bekräfta nykterhet. Också mycket små intag (tex lättöl) kan påvisas åtskilliga timmar efteråt och större intag upp till 2–3 dygn [4]. Det är dock stor individuell variation i de EtG- och EtS-halter som uppmäts efter intag av samma dos och vid samma promille-nivå. Därför är det svårt att, baserat på ett enskilt mätvärde, uppskatta vilken alkoholmängd som har konsumerats eller när intaget skedde. För att undvika positiva resultat efter användning av munsköljprodukter och desinfektionsmedel som innehåller etanol används vanligen en lägsta kvantifierings-nivå på 0,5 mg/l för EtG och 0,1 mg/l för EtS [4].

EtG- och EtS-koncentrationen påverkas dessutom av utspädning av urinen. Intag av stora mängder vätska före prov-

■ sammanfattat

Förnekande och underrapportering av alkoholkonsumtion är vanligt förekommande, vilket leder till svårigheter att identifiera riskbruk på ett tidigt stadium.

Ett omfattande dolt risk- och missbruk innebär att många med alkoholproblem inte får hjälp inom hälso- och sjukvården.

Dagens känsliga och specifi-

ka alkoholmarkörer kan identifiera ett enskilt intag upp till ett par dagar efteråt.

Biomarkörer för alkoholöverkonsumtion kan utnyttjas för tidig upptäckt av riskbruk.

En alkoholutredning med både korttids- och långtidsmarkörer kan ge god uppfattning om problemets omfattning och varaktighet.

■ fakta 1.

Alkoholmarkörer och deras användningsområden

Etylglukuronid (EtG) och etylsulfat (EtS) är konjugerade etanolmetaboliter som vanligen mäts i urinprov men som även kan mätas i blod- och hårprov. EtG och EtS i urin utnyttjas som markörer för att upptäcka alkoholkonsumtion eller bekräfta nykterhet under de senaste dygnen. Ett mindre till måttligt alkoholintag kan påvisas i upp till 1 dygn och berusningsdrickande i upp till ett par dygn efteråt.

Fosfatidyletanol (PEth) är en grupp membranlipider som bildas från fosfatidylkolin i närvaro av etanol och som mäts i helblod. PEth utnyttjas

som markör för att påvisa regelbunden alkoholöverkonsumtion och »riskbruk« eller bekräfta nykterhet under de senaste veckorna. Personer som regelbundet dricker måttliga alkoholmängder kan uppvisa låga PEth-nivåer.

Kolhydratfattigt transferrin (CDT) visar alkoholinducerad förändring i transferrinets glykosyleringsmönster, vilken mäts i serumprov. CDT utnyttjas som markör för att påvisa regelbunden alkoholöverkonsumtion och »riskbruk/missbruk«, där mätvärdet avspeglar intaget under de senaste veckorna – månaden. Enstaka större alkoholintag påverkar inte CDT-nivån.

tagning eller direkt utspädning av provet med vatten, vilket används för provmanipulering i samband med drogtestning, kan resultera i ett falskt negativt eller falskt lågt provsvar. För att minimera denna risk bör urinprovets kreatininhalt bestämmas, vilket sker rutinmässigt i samband med drogtestning [5].

Studier har påvisat en risk för falskt negativa EtG-resultat på grund av bakteriell hydrolys, om urinprovet är infekterat med *E coli* (vanlig orsak till urinvägsinfektion) och lagras utan kylning eller frysning. Om provet dessutom innehåller glukos eller annat substrat för etanoljäsning, kan EtG bildas också under sådana omständigheter, dvs ge falskt positivt resultat. Förekomst av bakterier i provet påverkar däremot inte EtS-koncentrationen [6], vilket antyder att EtS generellt är ett säkrare test än EtG.

EtG och EtS kan även mätas i blodprov, men detektionstiden är betydligt kortare än i urin. Håranalys är också möjlig men utnyttjas främst i rättsmedicinska sammanhang.

Kolhydratfattigt transferrin (CDT) i serum

Transferrin är ett glykoprotein som transporterar järn i blodbanan. På transferrinmolekylen är 0–2 grenade kolhydratkedjor kopplade, där varje kedja oftast avslutas med en sialinsyra. Den vanligaste »glykoformen« har två kolhydratkedjor med vardera två sidogrenar, dvs totalt fyra terminala sialinsyramolekyler, och kallas tetrasialotransferrin (utgör ungefär 80 procent av serumtransferrin).

Kronisk hög alkoholkonsumtion leder till en dosberoende förändring i transferrinets kolhydratinnehåll, varvid andelen av två mindre vanliga former, disialotransferrin som saknar en hel kolhydratkedja och asialotransferrin som saknar båda två, ökar [7]. Dessa former benämns gemensamt »kolhydratfattigt transferrin«, eller CDT (från engelskans »carbohydrate-deficient transferrin«), och utnyttjas som en biomarkör för alkoholöverkonsumtion.

Genom åren har många olika analysmetoder använts för CDT. Detta har påverkat den kliniska användningen av testet, eftersom metodberoende skillnader i definitionen på CDT och referensintervall har försvårat möjligheten att jämföra resultat.

I dag används huvudsakligen två analysprinciper i Sverige. Med HPLC-metodik separeras de järnmättade transferrin-formerna i serum med vätskekromatografi, varefter andelen disialotransferrin bestäms genom absorptionsmätning vid 470 nm, vilket är järntransferrinkomplexets absorptionsmaximum [8]. Metodiken ger en visuell bild av transferrinmönstret och har föreslagits som internationell referensmetod [9]. Förutom HPLC används en immunkemisk metod (N Latex CDT), som i stället mäter en CDT-fraktion bestående av asialo-, monosialo- och disialotransferrin [10].

Båda metoderna uttrycker svaret i relation till provets totala transferrininnehåll, vilket kompenserar för CDT-förändringar som beror på skillnader i totaltransferrin. En nackdel är att metoderna använder olika referensintervall; vanligtvis <2,0 procent med HPLC-metoden och <2,5 procent med N Latex-metoden. Av den anledningen pågår ett internationellt standardiseringsarbete syftande till att alla CDT-resultat ska vara direkt jämförbara oavsett mätmetodik [11].

Förhöjda CDT-värden ses oftast men inte alltid hos personer som regelbundet konsumerar större alkoholmängder. Studier indikerar att det krävs ett genomsnittligt dagligt intag överstigande 40 gram etanol (motsvarar ungefär 2 burkar starköl, en halv flaska vin eller 12 cl starksprit) i några veckor för att testet ska ge utslag [12]. Individuella förändringar i mätvärdet kan dock noteras vid lägre alkoholintag. Transferrinets halveringstid är ungefär 10 dygn, och vid alkoholabstinens återgår ett förhöjt CDT-värde till normal nivå inom 2 till 4 veckor.

CDT är en mycket mera alkoholspecifik biomarkör än lever-enzym, eftersom ökningen av disialo- och asialotransferrin nästan uteslutande beror på överkonsumtion av alkohol. Medfödda ämnesomsättningssjukdomar (CDG-syndrom; congenital disorders of glycosylation) kan visserligen ge ett falskt högt CDT-värde, men dels är dessa sjukdomar extremt sällsynta, dels diagnostiseras de vanligtvis redan under första levnadstiden. Genetiska transferrinvarianter, som förekommer hos någon procent av populationen, och leversjukdom kan ibland försvåra tolkningen av analysresultatet [13]. HPLC-metoden identifierar dock varianterna, som dessutom är konstanta över tiden, varför risken för falskt positiva resultat är liten.

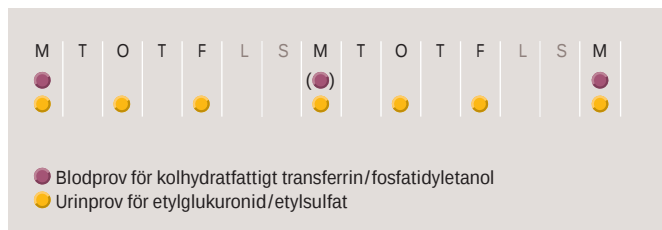
Det finns ingen könsskillnad i CDT-värdet när det uttrycks som procentandel, men nivån ökar gradvis under graviditet. Därför krävs försiktighet i tolkningen av testresultat från gravida, eftersom nivån kan nå upp till referensintervallets övre gräns under tredje trimestern [14].

Eftersom inte alla högkonsumenter av alkohol uppvisar ett förhöjt CDT-värde, är det viktigt att notera att ett normalt provresultat inte utesluter alkoholöverkonsumtion, dvs det finns risk för falskt negativa resultat.

Fosfatidyletanol (PEth) i helblod

Fosfatidyletanol (PEth; phosphatidylethanol) är ett samlingsnamn för en grupp fosfolipider som bildas från fosfatidylkolin i närvaro av etanol. Fosfatidylkolin metaboliseras till fosfatidsyra av enzymet fosfolipas D, men i närvaro av etanol bildas i stället PEth. PEth kan därigenom utnyttjas som en specifik alkoholmarkör. PEth-molekylen består av en fosfoetanol-

»I Sverige har det under lång tid pågått forskningsarbete syftande till att utveckla känsligare och mer träffsäkra alkoholmarkörer ...«



Figur 1. Exempel på upplägg för ett 2-veckors provtagningsschema, som kan användas för alkoholutredning med biomarkörer. Provtagningsfrekvensen är baserad på markörernas olika tidsfönster (M = måndag osv).

grupp på vilken två fettsyror är bundna. Hos personer som regelbundet konsumerar alkohol uppträder ett flertal PETH-former, vilka skiljer sig åt i fettsyrasammansättning. PETH-16:0/18:1 – som innehåller en palmitinsyra (16:0; siffrorna anger antalet kolatomer respektive antalet dubbelbindningar) och en oljesyra (18:1) – är ofta den kvantitativt viktigaste formen [15].

Mätningen utförs i helblod (vanligen EDTA-plasmarör) efter det att PETH extraherats från cellmembranen. Tidigare mättes PETH med en HPLC-metod som inte kunde identifiera enskilda former utan mätte en odefinierad totalmängd [16]. I dag utnyttjas i stället en känslig och specifik LC-MS-metodik som möjliggör mätning av såväl enskilda PETH-former som totalmängden [15]. Vid Karolinska universitetslaboratoriet i Stockholm introducerades LC-MS för rutinmässig PETH-mätning i början av 2010, och metoden har senare börjat användas även vid andra laboratorier. Karolinska universitetslaboratoriet rapporterar resultatet både som uppmätt delmängd av huvudformen PETH-16:0/18:1 och (för jämförelse med tidigare HPLC-värden) som uppskattad totalmängd. Totalmängden baseras på mätning av PETH-16:0/18:1 och PETH-16:0/18:2, eftersom summan av dessa två huvudformer korrelerar betydligt bättre med totalmängden än var och en separat [17].

Halveringstiden för PETH i blodet har uppgivits till ungefär 4 dygn, och som alkoholmarkör avspeglar testet de senaste veckornas konsumtion. PETH-bildningen är dosberoende om än med stor individuell variation [18], och enstaka större alkoholintag verkar inte ge en mätbar nivå. Kunskapen om PETH baseras dock ännu primärt på erfarenheter som erhållits med HPLC-metoden. Eftersom LC-MS-metoden är betydligt känsligare, kan den mäta betydligt lägre konsumtionsnivåer [15]. Exempelvis påvisades PETH i ungefär två tredjedelar av alla prov från blodgivare. Baserat på dessa resultat anses PETH-16:0/18:1-värden överstigande 0,2 $\mu\text{mol/l}$ indikera alkoholöverkonsumtion, medan motsvarande gränsvärde för total-PETH är 0,7 $\mu\text{mol/l}$ [17].

En nackdel är att PETH under vissa förhållanden kan bildas efter provtagningen. Detta förutsätter dels att blodprovet innehåller etanol, dels att det hanteras felaktigt. För att förhindra sådan PETH-bildning ska provet inte förvaras vid rumstemperatur, men inte heller frysas vid -20°C , eftersom enzymet fosfolipas D är aktivt vid låg temperatur. Blodprov som inte innehåller etanol kan däremot förvaras vid rumstemperatur i minst några dygn, någon vecka i kylskåp eller mycket lång tid vid -80°C , utan att mätvärdet förändras.

Fallbeskrivningar

Ett enstaka provresultat kan jämföras endast med referensintervallet, vilket anger spridningen i mätvärden för hela populationen. Vid behandling och uppföljning av patienter som utreds för eller diagnostiserats med alkoholrelaterade problem



Figur 2. Fyra fallbeskrivningar där en alkoholutredning med biomarkörer bidragit med värdefull information om den individuella alkoholkonsumtionen. Samtliga EtG-positiva prov var även positiva för EtS. Ytterligare detaljer beskrivs i texten. (Notera olika skalor på y-axlarna.)

finns ett stort värde i att utföra upprepade mätningar av biomarkörer för att upptäcka individuella förändringar, vilka kan indikera återfall. Dessutom är det ofta en fördel att kombinera korttids- och långtidsmarkörer för att därigenom få en bättre uppfattning om problemets omfattning och varaktighet.

Denna teststrategi har under den senaste 5-årsperioden utnyttjats framgångsrikt i ett flertal kliniska och rättsmedicinska fall, varav några presenteras nedan. Metoden baseras på upprepade övervakad urinprovstagning för mätning av EtG och EtS under 2 veckors tid samt blodprovstagning för mätning av CDT och PEth i början och slutet av perioden (Figur 1).

Fall 1. En anställd hade under senare år varit långtidsfrånvarande vid upprepade tillfällen, och orsaken misstänktes vara alkoholrelaterad, bl.a. baserat på ett kraftigt förhöjt CDT-värde. Den anställde förnekade alkoholproblem, och även företagsläkaren ifrågasatte riktigheten i detta. I samband med ett läkarbyte utfördes dock en utredning med alkoholmarkörer.

Provresultaten visade på ett kraftigt förhöjt CDT-värde vid periodens början (Figur 2). De urinprov som togs varannan veckodag var i samtliga fall positiva för EtG och EtS, och vid ett tillfälle missade patienten provtagningen. Vid periodens slut hade CDT-värdet stigit ytterligare, och även PEth-värdet var klart förhöjt.

Sammantaget bekräftade detta att personen regelbundet överkonsumerade alkohol. Efter en tid på behandlingshem återvände personen i tjänst, och CDT-värdet hade då sjunkit kraftigt och låg inom referensintervallet.

Fall 2. En anställd med tidigare alkoholproblem blev aktuell för alkoholutredning med biomarkörer sedan det inkommit klagomål på arbetsinsatsen. Personen medgav intag av mindre mängder alkohol men förnekade överkonsumtion.

Analysresultaten visade på kraftigt förhöjda CDT-, PEth- och EtG-/EtS-värden vid periodens början (Figur 2). Även efterföljande urinprov var i samtliga fall positiva, även om nivåerna var relativt låga den första veckan. Vid periodens slut hade CDT- och PEth-värdena sjunkit något.

Sammantaget visade detta att personen överkonsumerade alkohol, och intaget fortsatte även under provtagningsperioden, om än initialt på en lägre nivå. Detta resulterade i något lägre CDT- och PEth-nivåer vid periodens slut. Vid total avhållsamhet från alkohol skulle sänkningen dock ha blivit betydligt större.

Fall 3. En anställd som misstänktes ha alkoholproblem blev aktuell för utredning på grund av upprepade förhöjda CDT- och PEth-värden. Personen medgav alkoholintag men endast i mindre omfattning.

Analysresultaten vid periodens början visade på ett normalt om än relativt högt CDT-värde och ett lågt PEth-värde (Figur 2). De urinprov som togs varannan dag var negativa för EtG och EtS i samtliga fall utom ett, där ett svagt positivt resultat uppmättes. Vid periodens slut hade CDT- och PEth-värdena sjunkit ytterligare.

Provresultaten indikerade att personen tidigare hade överkonsumerat alkohol, vilket resulterat i förhöjda CDT- och PEth-värden. Inför alkoholutredningen hade dock intaget uppenbarligen minskat betydligt eller upphört, vilket avspeglades i avsevärt lägre mätvärden än tidigare. Nämnas bör att starten på provtagningen sköts upp 1 vecka på patientens initiativ, möjligen i syfte att markörnivåerna skulle hinna sjunka ytterligare. Liknande fall, där patienter med tidigare förhöjda mätvärden uppvisar betydligt lägre nivåer när alkoholutredningen påbörjas, har noterats vid flera tillfällen.

Fall 4. En patient i öppenvårdsbehandling för tidigare alkoholproblem blev aktuell för utredning på grund av upprepade måttligt förhöjda CDT-värden. Patienten förnekade allt alkoholintag, och denna uppfattning stöddes av behandlingspersonalen.

Analysresultaten visade på ett lätt förhöjt CDT-värde vid periodens början (Figur 2). Samtliga urinprov var negativa för EtG och EtS. Vid provtagningsperiodens slut var CDT-värdet konstant förhöjt på tidigare nivå och inget PEth kunde påvisas.

EtG- och EtS-resultaten visade att patienten inte hade druckit alkohol under provtagningsperioden. Trots det låga CDT-värdet stabilt över referensintervallet, vilket indikerade att detta var patientens »normalnivå» och inte beroende på överkonsumtion av alkohol. Genom åren har ett par liknande fall (bl.a. ett körkortsärende) identifierats, där personer uppvisat ett stabilt lätt/måttligt förhöjt CDT-värde utan att det funnits andra tecken på alkoholöverkonsumtion.

Konklusion

Utredningen av den svenska missbruks- och beroendevården [19] har fastslagit att betydligt fler måste få professionell hjälp för att minska alkoholrelaterade skadeverkningar i form av lidande, sjukdom och död på individuell nivå samt kriminalitet och produktionsbortfall på samhällsnivå. Att endast ett fåtal personer med alkoholproblem når vården i dag beror på ett omfattande dolt risk- och missbruk. Utredningen betonar därför vikten av tidig upptäckt och intervention för att förhindra att riskbruk övergår i missbruk eller beroende.

Dagens känsliga och specifika alkoholmarkörer erbjuder objektiv kvantitativ information om aktuell konsumtionsnivå och kan indikera om bruket riskerar att leda till medicinska komplikationer. Vilket eller vilka test som ska utnyttjas i det enskilda fallet beror på syftet och provtagningsfrekvensen. För att påvisa eller avfärda alkoholintag under de senaste 1–2 dyggen är mätning av EtG och EtS i urinprov aktuellt. Om frågan i stället gäller regelbunden alkoholöverkonsumtion är CDT och PEth i blodprov lämpliga test. Mätning av leverenzymet GT kan utnyttjas som ett komplement för att indikera organ- och vävnadsskada, vilket inte minst är viktigt hos patienter som behandlas med antabus. Effektivt är även att kombinera korttids- och långtidsmarkörer för att därigenom samla information om problemets omfattning och varaktighet.

Upprepade patientkontakter med kontinuerlig provtagning och återkoppling (biofeedback) kan vara mycket effektivt för att bryta förnekande och uppmärksamma personer på att de använder alkohol på ett riskabelt sätt [20]. Om analysresultatet kan få rättsliga konsekvenser, som i anställnings- och körkortsärenden, är det dock av yttersta vikt att den som tolkar resultatet är väl insatt i testens eventuella begränsningar, eftersom det ibland kan finnas andra orsaker än alkohol till ett positivt provsvar.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

REFERENSER

1. WHO. Global status report on alcohol and health. 2011. http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf
2. Helander A, Walthers RI, Jones AW. Bestämning av alkohol i utandningsluft kan ge fel mätvärde. Varning för ospecifik testning med vissa instrument. Läkartidningen. 2010;107:110-2.
3. Helander A, Beck O. Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans. Clin Chem. 2004;50:936-7.
4. Helander A, Böttcher M, Fehr C, Dahmen N, Beck O. Detection

- times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol Alcohol*. 2009;44:55-61.
5. Helander A, Ohlson M, Beck O, Hansson T, Kugelberg FC, Kronstrand R. Kreatininkoncentrationen i urin bör mätas vid drogtestning. Riktlinjer för beslutsgräns och tolkning behövs – inte minst för rättssäkerheten. *Läkartidningen*. 2011;108:1311-4.
 6. Helander A, Olsson I, Dahl H. Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem*. 2007;53:1855-7.
 7. 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*. 2008;388:59-67.
 8. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem*. 2003;49:1881-90.
 9. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wienders JP, Anton RF, Whitfield JB, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:558-62.
 10. Delanghe JR, Helander A, Wienders JP, Pekelharing JM, Roth HJ, Schellenberg F, et al. Development and multicenter evaluation of the N latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem*. 2007;53:1115-21.
 11. Helander A, Wienders JP, Jeppsson JO, Weykamp C, Siebelder C, Anton RF, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: II. Performance of a laboratory network running the HPLC candidate reference measurement procedure and evaluation of a candidate reference material. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48:1585-92.
 12. Schellenberg F, Schwan R, Menetrey L, Loiseaux MN, Pages JC, Reynaud M. Dose-effect relation between daily ethanol intake in the range 0-70 grams and %CDT value: validation of a cut-off value. *Alcohol Alcohol*. 2005;40:531-4.
 13. Stewart SH, Comte-Walters S, Bowen E, Anton RF. Liver disease and HPLC quantification of disialotransferrin for heavy alcohol use: A case series. *Alcohol Clin Exp Res*. 2010;34:1956-60.
 14. Kenan N, Larsson A, Axelsson O, Helander A. Changes in transferrin glycosylation during pregnancy may lead to false-positive carbohydrate-deficient transferrin (CDT) results in testing for riskful alcohol consumption. *Clin Chim Acta*. 2010;412:129-33.
 15. Helander A, Zheng Y. Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin Chem*. 2009;55:1395-405.
 16. Isaksson A, Walther L, Alling C, Hansson T. Fosfatidyletanol i blod (B-PEth) – ny markör för alkoholmissbruk. *Läkartidningen*. 2009;106:1094-8.
 17. Zheng Y, Beck O, Helander A. Method development for routine liquid chromatography-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood. *Clin Chim Acta*. 2011;412:1428-35.
 18. Aradottir S, Asanovska G, Gjerds S, Hansson P, Alling C. Phosphatidylethanol (PEth) concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol*. 2006;41:431-7.
 19. Statens offentliga utredningar. Missbruksutredningen. <http://www.sou.gov.se/missbruk/index.htm>
 20. Hermansson U, Helander A, Brandt L, Huss A, Rönnerberg S. Screening and brief intervention for risky alcohol consumption in the workplace: results of a 1-year randomized controlled study. *Alcohol Alcohol*. 2010;45:252-7.