

Aspartato e alanina transaminasi: alcune considerazioni su due esami della metà del XX° secolo: la fisiopatologia, il metodo ed il razionale della richiesta

Alessandro Camerotto^a, Gian Franco Natali^b, Francesco Carmignoto^a

^aDipartimento di Patologia Clinica, Servizio di Medicina di Laboratorio, Ospedale S. Luca di Trecenta, Azienda ULSS n. 18, Rovigo

^bDipartimento di Medicina, Reparto di Medicina, Ospedale S. Luca di Trecenta, Azienda ULSS n. 18, Rovigo

INTRODUZIONE: BREVE STORIA DI UNA COPPIA D'ENZIMI

L'aspartato-transaminasi e l'alanina-transaminasi, identificate ora universalmente con le sigle AST e ALT (in precedenza GOT e GPT), sono indubbiamente tra i test di laboratorio più utilizzati in Medicina. Esse hanno costituito l'armamentario diagnostico di diverse generazioni di medici e, anche in questi ultimi anni, sono stabilmente tra i primi posti nella graduatoria dei test più richiesti.

I motivi di questo duraturo successo sono da ascrivere da una parte alla loro ubiquità nell'organismo con aumento in numerose patologie e, dall'altra, alla economicità e facilità del dosaggio. Le prime determinazioni per uso clinico, risalenti agli anni '50 del XX° secolo¹⁻⁴, utilizzavano metodi manuali che furono progressivamente adattati per strumentazioni automatizzate.

Negli anni '70 fu proposta la standardizzazione del metodo che, come sarà successivamente discusso, non ottenne quel successo d'applicazione che era ragionevole attendersi e ripropone, a distanza di trent'anni, le problematiche, anche cliniche, conseguenti all'utilizzo di metodi diversi tra i laboratori.

Il 21 luglio 1990 il Decreto Ministeriale "Misure dirette ad escludere il rischio di infezioni epatiche da trasfusioni di sangue", pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n° 195 del 22.08.90, all'art. 2 recitava che "possono essere destinate alla trasfusione di sangue solo le unità risultate negative alla ricerca dell'HBsAg, degli anticorpi anti HIV e HCV ed in cui siano stati riscontrati livelli di ALT non superiori a 1.5 volte il valore massimo dell'intervallo normale". In questo modo, una legge dello Stato Italiano scioglieva, nel difficile e delicato ambito della Medicina Trasfusionale, la storica ed inseparabile coppia di enzimi.

In effetti da quando cominciarono a essere dosati nei disparati contesti clinici, le elaborazioni statistiche hanno costantemente evidenziato come i medici, nella libera prescrizione, non disgiungono praticamente mai i due esami, come se non fossero individuabili ambiti specifici di richiesta. Ciò è confermato dal numero sostanzialmente identico di dosaggi per entrambi gli enzimi, sia nelle richieste per utenti esterni che per i pazienti ricoverati.

Nella nostra Azienda le eccezioni sono rappresentate dal Centro Trasfusionale, che dal 1990 ha accolto la nuova normativa, e dalle richieste interne urgenti nelle quali l'AST non è più compresa tra i test richiedibili. In questa rassegna questi temi saranno posti in discussione partendo da una rivisitazione di alcuni aspetti di fisiopatologia e dalle motivazioni che giustificano la richiesta.

FISIOPATOLOGIA E RAZIONALE DELLA RICHIESTA

Le transaminasi sono enzimi che catalizzano il trasferimento del gruppo γ amminico dell'acido aspartico e dell'alanina all' α chetogruppo dell'acido chetoglutarico, determinando sintesi di acido ossalacetico e di acido piruvico.

L'AST è largamente diffusa, soprattutto nel fegato oltre che, in ordine decrescente di concentrazione, anche nel miocardio, nel muscolo scheletrico, nel rene, nel cervello, nel pancreas, nei polmoni, nella mucosa gastrica, nei leucociti e negli eritrociti. Ne esiste una frazione citoplasmatica (60%) ed una mitocondriale (40%).

L'ALT, invece, è più specifica del fegato ed è contenuta quasi esclusivamente nei microsomi citoplasmatici. Pur essendo un enzima prevalentemente epatico è presente anche nel miocardio, nel muscolo scheletrico, nel rene, nel pancreas e nella milza.

Prima di addentrarci nella descrizione dei principali ambiti in cui è indicata la determinazione delle transaminasi è opportuno ricordare che questi esami non dovrebbero essere utilizzati per valutare lo stato funzionale epatico nel contesto di una malattia epatica cronica.

Per questi scopi sono tradizionalmente considerati utili l'albumina, il tempo di protrombina (PT)⁵, la pseudo colinesterasi e l'ammonio⁶ e l'utilizzo di protocolli che attribuiscono un punteggio (score) in base a risultati di laboratorio associati alla valutazione di aspetti clinici. Uno di questi modelli è la classificazione di Child-Turcotte-Pugh che - proposta inizialmente nel 1964 per una stratificazione dei pazienti cirrotici da sottoporre a shunts porto cava - utilizza i valori di bilirubina, PT e albumina, la valutazione dell'ascite e dell'encefalopatia porto sistemica⁷.

Un approccio simile è il modello MELD (Mayo End Stage Liver Disease) usato per la stratificazione di pazienti destinati al trapianto epatico, che utilizza i valori della bilirubina, del tempo di protrombina, della creatinina, l'eziologia dell'epatopatia e la necessità o meno di eseguire dialisi⁸.

L'interesse clinico della determinazione dell'ALT, per la prevalente localizzazione, è legato principalmente alle patologie epatiche. Ad esclusione delle patologie alcool correlate, l'ALT aumenta nel siero più dell'AST, sia perché questa è inattivata più rapidamente in circolo, sia perché l'ALT, presente nel citoplasma in concentrazioni maggiori, diffonde più rapidamente attraverso la membrana cellulare⁹. E' noto del resto che il rilascio nel siero può avvenire a seguito di un danno di membrana con aumento della permeabilità anche senza necrosi. Ciò può concorrere a spiegare la scarsa correlazione tra grado di danno epatico e livello enzimatico¹⁰. E' stato suggerito che un rapporto AST:ALT superiore a 2 sia suggestivo di epatopatia alcolica¹¹⁻¹², nella quale i bassi valori di ALT sono soprattutto imputabili alla carenza di piridossina (vitamina B6)¹³⁻¹⁴.

Questa vitamina, una volta fosforilata e ossidata a piridossal-5'-fosfato (P-5-P), funge da coenzima per le transaminasi, funzione che è più critica per l'ALT che per l'AST. Nell'alcolismo cronico, in conseguenza di fattori quali la carenza dietetica, l'inibizione della conversione metabolica a P-5-P e l'accelerato catabolismo, si ha un tipico deficit della vitamina¹⁵. Al di fuori dell'abuso alcolico la carenza vitaminica è rara, considerata soprattutto l'ampia distribuzione negli alimenti. Stati di deficit sono stati segnalati per malassorbimento, inattivazione da parte di alcuni farmaci (idrazide dell'acido isonicotinico, contraccettivi orali, d-penicillamina), difetti congeniti del metabolismo della B6, aumentate necessità (gravidanza) e dieta squilibrata con eccesso di proteine¹⁶.

Il rapporto tra i due enzimi è caratteristicamente alterato anche in una rara patologia quale il morbo di Wilson¹⁷ e ne è stato suggerito l'utilizzo, insieme all'indice di massa corporea (BMI), il Diabete tipo 2 e l'età, per distinguere la steatosi non alcolica (NAFLD, Non Alcoholic Fatty Liver Disease), in cui il rapporto è caratteristicamente inferiore a 1, dalla steatoepatite non alcolica (NASH, Non Alcoholic Steatohepatitis)¹⁸⁻²⁰. Il grande interesse emerso negli ultimi anni per la NAFLD nasce dalla constatazione che essa rappresenta probabilmente la più comune causa di

alterazione epatica. Le alterazioni istologiche che definiscono questa condizione vanno dalla semplice steatosi alla NASH nelle sue forme estreme²¹. E' opportuno evidenziare che, nonostante alcuni autori riportino come predittori di malattia avanzata l'elevazione dell'AST e dell'ALT, sono stati segnalati casi di NAFLD con significativa malattia epatica e livello enzimatico all'interno dei valori di riferimento²². Infine, l'utilizzo del rapporto, considerata l'origine mitocondriale dell'AST e citoplasmatica dell'ALT, potrebbe essere utile, in caso di aumento della prima, come indice di gravità del processo necrotico. Per inciso sottolineiamo che nei laboratori in cui è utilizzato il metodo ottimizzato con l'aggiunta di P-5-P l'utilizzo del rapporto non è ovviamente utilizzabile²³.

L'interesse clinico della AST, indipendentemente dalla patologia epatica, era legato fino agli anni '90 prevalentemente all'infarto del miocardio. Con l'avvento dei marker di danno cardiaco – troponina, mioglobina e CK MB massa- il dosaggio è stato gradualmente eliminato ed è ora considerato obsoleto ed inappropriato. Altre condizioni cliniche in cui è riscontrabile un aumento dell'enzima sono l'anemia emolitica, le necrosi renali, muscolari, cerebrali e pancreatiche²⁴, l'ipertiroidismo²⁵ e l'ipotiroidismo²⁶.

Sono patologie, in realtà, che dovrebbero incidere marginalmente sulla richiesta complessiva, per la relativa bassa prevalenza di alcune di queste condizioni e per la possibilità di utilizzare test più specifici. In riferimento all'utilizzo epatico, considerato l'aumento e la diminuzione in parallelo dell'ALT e la maggiore sensibilità di quest'ultima, il dosaggio dell'AST appare ridondante sia nello screening²⁷⁻²⁹ sia nella diagnosi e monitoraggio delle patologie epatiche³⁰, salvo, come ricordato, l'utilizzo del rapporto AST:ALT qualora si utilizzino metodi senza P-5-P. E' sulla base di queste evidenze che è stato possibile togliere l'AST dalle schede di richiesta degli esami urgenti³¹, ed eliminare ope legis questo esame nello screening per l'idoneità alla donazione di sangue.

L'OPINIONE DEI CLINICI

Alla luce di queste considerazioni la richiesta dell'AST dovrebbe risultare mirata, non associata nella maggior parte dei casi all'ALT e, quindi, in quantità molto ridotta.

Considerando però che le statistiche dimostrano un altissimo numero di prestazioni ed un numero praticamente identico di dosaggi tra i due test, abbiamo ritenuto di chiedere direttamente ai medici le motivazioni che giustificano la richiesta. Abbiamo così effettuato un questionario telefonico su un campione di 50 medici equamente distribuiti tra ospedalieri e di Medicina Generale.

I quesiti posti erano:

- Quali sono le principali patologie per le quali richiede le transaminasi?
- Ci sono altre situazioni cliniche per le quali i test sono richiesti?
- Se sì, queste patologie quanto pesano percentualmente rispetto alla richiesta totale di transaminasi?

Dall'elaborazione delle risposte si evidenzia che: il 100% dei medici richiede i test principalmente per patologia epatica. Il 3 % dei clinici richiede gli enzimi anche per patologie extraepatiche. Queste ultime condizioni rappresentano meno del 5 % delle richieste complessive di transaminasi. Dall'analisi delle risposte si può concludere che, essendo il test solo marginalmente richiesto per le patologie extraepatiche nelle quali può trovare un razionale, il dosaggio dell'AST può essere considerato sostanzialmente inappropriato.

QUANTE SONO E QUANTO COSTANO LE AST DOSATE IN ITALIA?

La particolare situazione logistica ed organizzativa dei laboratori della provincia di Rovigo ci ha permesso una valutazione delle prestazioni e dei costi, sia pur come macro dato, non limitata all'ambito strettamente locale. Infatti, poiché nella nostra real-

tà meno del 5% dei test di laboratorio sono effettuati da strutture private, possiamo ragionevolmente ritenere che i test effettuati dal laboratorio rappresentino il numero totale di esami eseguiti per i 170.323 residenti nella nostra Azienda Socio Sanitaria.

Questo ci consente una proiezione, se pur approssimativa, dei dati a livello nazionale (57 milioni di abitanti).

Il numero di dosaggi di AST della nostra azienda nel 2005 è stato di n. 84.370. La proiezione a livello nazionale è di n. 28.235.117 determinazioni. Sulla base del Tariffario Regionale Veneto, il costo annuo approssimativo dei dosaggi si attesta a €73.411.306, pur considerando che i costi complessivi di laboratorio, inclusi i costi del personale e quelli generali dell'istituzione, rappresentano l'80-85 % del valore tariffario³². Per comprendere in concreto cosa rappresenti la cifra sopra riportata, si consideri che il Servizio di Medicina di Laboratorio della nostra Azienda, con volumi annui di prestazioni pari a 2.500.000 test, ha costi per reattivi, materiali e noleggio attrezzature di €2.380.000.

A questi costi vanno aggiunti quelli legati alle dinamiche che originano quando ad una persona sana è refertato un risultato anormale, quali ad esempio ripetizioni del test o effettuazioni di esami di approfondimento, spesso, tra l'altro, molto più costosi³³.

Considerato l'elevato numero di dosaggi, il numero di falsi positivi statisticamente atteso è veramente rilevante. Poiché per l'AST si considerano privi di significato clinico i bassi valori, possiamo affermare che nel 2.5% dei soggetti sani saranno necessariamente riscontrati valori al di sopra dell'intervallo di riferimento. In considerazione quindi delle moltissime prestazioni eseguite e dell'usuale utilizzo del test nei check up di soggetti asintomatici, il numero di falsi positivi attesi sarà quindi nell'ordine delle centinaia di migliaia, cui vanno aggiunti gli aumenti legati ad emolisi, esercizio fisico intenso³⁴ e a macroenzimi³⁵. Queste stime sono in accordo con uno studio dell'American Gastroenterological Association secondo il quale nell'1 - 4 % della popolazione asintomatica sono riscontrabili elevati valori di transaminasi³⁶.

IL METODO DI DOSAGGIO

Dal lontano 1977 l'International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)³⁷⁻³⁸ ed alcune Società nazionali come quella svizzera e francese³⁹⁻⁴⁰, hanno raccomandato metodi standardizzati per la determinazione di AST e ALT in condizioni ottimali di determinazione quali l'utilizzo di concentrazioni adeguate del substrato, l'adozione di tampone tris (idrossimetil) – aminometano, l'attivazione dell'enzima con P-5-P e la temperatura a 30°, successivamente modificata con l'ottimizzazione a 37°⁴¹⁻⁴⁴. Poiché era stato dimostrato che le transaminasi presenti nel siero umano possono non essere completamente saturate dal loro coenzima⁴⁵, fu indicata una concentrazione tale di P-5-P da saturare completamente l'enzima al fine di assicurare la misurazione del massimo di attività catalitica⁴⁶.

La promozione, trent'anni fa, di questi metodi fu effettuata per ottenere la massima attendibilità e riproducibilità analitica. Considerando la non trasferibilità dei risultati dei dosaggi tra metodi che differiscono per la presenza o meno del P-5-P⁴⁷, la standardizzazione avrebbe dovuto permettere una maggiore confrontabilità dei risultati dei pazienti ottenuti sia nel singolo sia tra diversi laboratori⁴⁸⁻⁵⁰. Il condizionale è d'obbligo se si considera che nel 1993 i dati raccolti tra i partecipanti alla verifica esterna di qualità del Centro di Ricerca Biomedica della Regione Veneto evidenziavano che su 113 laboratori solo il 30% utilizzava il metodo IFCC⁵¹. A distanza di 13 anni i dati dello stesso Centro e del Gruppo Controllo Qualità Analitica dell'Azienda S. Orsola-Malpighi di Bologna non sono certo migliorati poiché su 530 laboratori solo il 3.5 % utilizza il metodo raccomandato IFCC con P-5-P. Come controprova sul lato commerciale, una nostra indagine effettuata a febbraio 2006 sulle principali Aziende di diagnostica evidenzia che in Italia meno del 5% dei laboratori si è uniformato alle raccomandazioni dell'IFCC. Naturalmente questi dati non considerano il mercato in continua espansione dei point of care testing nel quale il dosaggio non è mai

secondo IFCC.

Quali sono le ragioni di questo insuccesso? Non essendo riusciti a reperire nella letteratura degli anni '70 e '80 delle obiezioni all'utilizzo del metodo standardizzato possiamo formulare solo delle ipotesi. Di certo la componente economica relativa al solo costo del P-5-P, nell'ordine di 1 centesimo di Euro per determinazione, non crediamo possa costituire un fattore rilevante. Grande è invece la differenza di stabilità del reattivo: 6 giorni contro i 28 del metodo senza il P-5-P. Questo fattore potrebbe incidere sui costi nei piccoli laboratori per lo spreco legato al non completo utilizzo del reagente prima della data di stabilità. D'altra parte, la necessità di un reattivo aggiuntivo, le compresse di P-5-P, rappresenta un passaggio supplementare nelle procedure di preparazione dei reattivi.

Infine, una ragione squisitamente clinica potrebbe essere rappresentata dall'opportunità diagnostica offerta dal metodo non ottimizzato con l'utilizzo del rapporto AST:ALT. Al di là delle congetture razionali deve essere considerata anche la possibilità che il metodo non abbia preso piede per l'inerzia o l'incapacità delle Società Scientifiche di proporre adeguate contromisure nei confronti di comportamenti legati all'abitudine che, come in altri campi del sapere, oppongono forti resistenze all'innovazione⁵².

Queste differenze di metodo provocano significative criticità nell'utilizzo clinico dei risultati e soprattutto nella comparazione di valori ottenuti da laboratori diversi: una recente ricerca su 590 laboratori Italiani ha infatti dimostrato come siano presenti differenze significative sui limiti superiori di riferimento per l'ALT che vanno da 29 a 83 U/L⁵³. D'altro canto, come abbiamo già sottolineato, non è possibile utilizzare i rapporti tra le concentrazioni catalitiche qualora si utilizzino metodi ottimizzati. Riguardo quest'ultimo aspetto, come abbiamo descritto nel paragrafo della fisiopatologia, è facile constatare come la letteratura specializzata ed autorevoli e diffusi trattati di medicina generale propongono ancor oggi l'utilità del rapporto - affiancato o meno ad altri test quali l'MCV, la γ GT, la transferrina carboidrato carente - non solo nell'epatopatia cronica da alcool, ma anche nella valutazione della gravità delle steatosi e steatoepatiti non alcoliche.

Il clinico che intenda seguire questa indicazione diagnostica dovrebbe ovviamente essere a conoscenza del metodo utilizzato. Peccato che nel referto e/o nella Carta del Servizio questa informazione non sia spesso presente oppure, se fornita, non sia esaurientemente esplicitata. In effetti scrivere, com'è possibile verificare in questi documenti, metodo IFCC, non è sufficiente perché purtroppo, anche se il metodo IFCC è uno solo e preveda esclusivamente la presenza di P-5-P, non esiste univocità su questa accezione: a titolo d'esempio si può constatare come nei fogli illustrativi delle metodiche di una delle aziende del diagnostico maggiormente presente nel mercato⁵⁴⁻⁵⁵, si reciti "metodo secondo l'IFCC con/senza l'attivazione del piridossal fosfato" e conseguentemente lo stesso lessico sia presente nei documenti del Centro di Ricerca Biomedica della Regione Veneto che, per elaborare il risultati dei programmi di VEQ per gruppo omogeneo, ha dovuto necessariamente adottare lo stesso linguaggio⁵⁶⁻⁵⁷.

COMMENTO E CONCLUSIONI

Sintetizzando quanto è emerso nei paragrafi precedenti possiamo asserire che:

- Il test AST è richiesto nel nostro paese in modo inappropriato nell'ordine di decine di milioni di dosaggi annui. Anche se non sono facilmente dimostrabili le ricadute sull'outcome, è possibile tuttavia stimare costi annui per utenti e SSN attorno ai 70 milioni di Euro.
- Il metodo standardizzato e ottimizzato secondo l'IFCC non è utilizzato dalla maggior parte dei laboratori.
- Esiste un'equivocità nella terminologia utilizzata per designare il metodo IFCC.
- Non è esaurientemente esplicitato nei referti o nelle Carte dei Servizi il metodo

utilizzato.

- I clinici non hanno gli strumenti informativi per comprendere con quali metodi sono ottenuti i risultati.

Queste conclusioni dimostrano che, contrariamente a quanto si potrebbe forse ritenere, l'utilizzo di test inappropriati non s'incentra solo su test di nuova introduzione, in cui le conoscenze non sono ancora consolidate, i medici non hanno ancora familiarità di impiego ed in cui non sono state valutate sufficientemente le indicazioni per l'utilizzo nei vari ambiti della diagnostica, compresi vantaggi e svantaggi sul singolo individuo o su ampie popolazioni. In una recente pubblicazione avevamo posto l'accento che se l'inappropriatezza è così diffusa nei confronti di test che potremo ormai definire storici- dei quali l'AST rappresenta solo un esempio - non possiamo che prefigurare scenari peggiori per esami di recente introduzione e di elevata complessità (e costo) quali i test per biologia molecolare, genomica e proteomica⁵⁸. Queste considerazioni mettono in luce le difficoltà dell'aggiornamento continuo in medicina che non deve dare per scontato che le conoscenze scientifiche da tempo ritenute acquisite siano, in effetti, debitamente conosciute ed applicate⁵⁹. Per risolvere o ridurre queste criticità possono essere d'aiuto strategie e strumenti innovativi che utilizzino pienamente le possibilità offerte dalla Technology Information⁶⁰. Si tratta di soluzioni che, attraverso una prescrizione informatizzata con programmi dedicati per la prescrizione intra ed extraospedaliera possono guidare i clinici nella scelta dei test in rapporto a criteri clinici basati sull'Evidence Based Medicine e sulle linee guida. Questi programmi, se utilizzati ai fini della rimborsabilità delle prestazioni, potrebbero rappresentare anche un'efficace soluzione per il contenimento dei costi legati all'inappropriatezza⁶¹⁻⁶².

La Technology Information potrebbe quindi finalmente permettere un approccio olistico nella gestione dell'appropriatezza che valuti, oltre alle problematiche cliniche ed etiche del problema, anche aspetti pratici ed economici, e le possibili soluzioni realisticamente realizzabili. In riferimento alla mancata standardizzazione del metodo, risulta palese l'esigenza di non allentare il presidio e la vigilanza della fase analitica che, per le indubbie miglie del processo indotte dall'informatica, dall'automazione e dalla robotica e forse per un eccesso di delega all'industria del diagnostico, è stata in questi anni meno curata rispetto alle fasi pre e post analitiche. In effetti, se è vero che alcuni test storici non sono ancora debitamente utilizzati dai clinici⁶¹, allo stesso modo test implementati nella metà del XX° secolo non sono ancora debitamente standardizzati, come fornisce evidenze l'utilizzo di metodi e risultati diversi tra i laboratori. Infine, un aspetto fondamentale appare la necessità da parte dei laboratori di comunicare ai clinici il metodo per quei dosaggi in cui questa informazione può influire concretamente sulle decisioni cliniche.

Nel 1988, Angelo Burlina⁶³ sottolineava come la scelta del metodo più idoneo per eseguire un test fosse tra le principali prerogative del medico di laboratorio, ed indicava come criterio fondamentale la necessità di "commisurare le possibilità tecniche e la qualità del risultato con i problemi clinici". I temi esposti in questa rassegna ripropongono, a distanza di vent'anni da quelle osservazioni, l'importanza di questo aspetto affinché il Laboratorio, offrendo al medico curante un risultato accurato e confrontabile, possa contribuire efficacemente alla gestione clinica del paziente.

BIBLIOGRAFIA

1. Reitman S, Frankel E. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 1957;28:56-62.
2. Karmen A. A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 1955;34:131-139.
3. Wroblewski F, La Due JS. Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc Soc exp Biol Med* 1956;91:569-78.
4. Tonhazy NE, White NG, Umbreit WW. A rapid method for the estimation of the glutamic-aspartic transaminase in tissue and its application to radiation sickness. *Arch Biochem* 1980;28:36-41.

5. Robert A.,Chazouilleres O. Prothorombin Time in Liver failure: Time, Ratio, Activity Percentage, or International Normalized Ratio? *Hepatology* 1996. 1392-1393.
6. Naccarato R, Martin A, Chiaromonte M. Insufficienza epatica. In L.A. Scuro. *Fisiopatologia Clinica*. Piccin Nuova Libreria, Padova 1983; 626-630.
7. Child C, Turcotte J. Surgery and portal Hypertension. In Child C. *The Liver and Portal Hypertension*. Saunders ed. Philadelphia 1964: 50-75.
8. Kamath PS, Wiesner RH, Malincoch M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER and Ray King W. A Model to Predict Survival in Patients With End-Stage Liver Disease. *Hepatology* 2001; 33: 464-470.
9. Speicher CE. *Malattie del Fegato*. In Speicher CE. *Test di laboratorio e prove di efficacia*. Il Pensiero Scientifico Editore; Roma 1999:253-288.
10. Zatti M. Lechi C. *Enzimi*. In Zatti M. Lechi C. *Medicina di Laboratorio. Interpretazione in biochimica e patologia clinica*. Ed. Sorbona; Milano 1998: 101-10.
11. *Epatopatia Alcolica*. In Beers MH, Berkow R, Bogin R, Fletcher A. *Merck Manual IV° ed. Italiana* Medicom Italia Editore, Milano 2000; capitolo 40:399-402.
12. Pratt DS, Kaplan MM. Valutazione della funzione epatica in Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL Longo DL, Jameson JL. *Harrison Principi di Medicina Interna XV° ed* McGraw-Hill Editore. Milano 2002; Cap. 134: 1988-1991.
13. Sorbi D, Boynton J, Lindor KD. The ratio of aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase: potential value in differentiating non alcoholic steatohepatitis from alcoholic liver disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94: 1018-22.
14. Conigrave KM, Davies P; Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* 2003; 98 Suppl 2: 31-43.
15. A. H.B. WU. *Enzimologia Clinica*. In: McClatchey KD. *Clinica e Medicina di laboratorio*. Roma: Verduci Editore 1996; Cap.11:259-86.
16. *Disturbi della nutrizione* In Beers MH, Berkow R, Bogin R, Fletcher A. *Merck Manual IV° ed. Italiana* Medicom Italia Editore, Milano 2000; capitolo 1:1-66.
17. Davern TJ Scharschmidt BF, Biochemical liver tests. In Feldman M, Friedman LS, Sleisenger MH. *Sleinger & Fordtran's Gastrointestinal and liver disease: pathophysiology, diagnosis, managenet*. 7th Sauders ed. Philadelphia 2002:1227-38.
18. American Gastroenterological Association. AGA Medical Position Statement: Non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002;123:1702-1705.
19. Marchesini G, Buglianesi E, Forlani G. Non-alcoholic fatty liver, steatohepatitis and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003;37:917-923.
20. Brent A. Neuschwander – Tetri and Stephen H.Caldwell. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003;37:1202-1219.
21. Brunt EM, Janney CG, BiSceglie AM, Neusch-wander-Tetri BA, Bacon BR. Non- alcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474.
22. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Non-alcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999;116:1413-1419.
23. Caldini M, Pasquinelli F. *Enzimi*. In Pasquinelli F. *Diagnostica e tecniche di laboratorio* Firenze: Rosini Ed 1979. p. 841-897.
24. Pratt DS, Kaplan MM. Evaluation of abnormal liver-enzyme results in asymptomatic patients. *N Engl J Med* 2000;342:1267-71.
25. Bayraktar M, Van Thiel DH. Abnormalities in measures of liver function and injury in thyroid disorders. *Hepatogastroenterology* 1997;44:1614-8.
26. Zatti M. Lechi C. *Orientamenti in endocrinologia*. In Zatti M. Lechi C. *Medicina di Laboratorio. Interpretazione in biochimica e patologia clinica*. Ed. Sorbona; Milano 1998: 173-186.
27. Sacher RA, McPherson RA. *Attività enzimatiche di utilità diagnostica in chimica clinica*. In Sacher RA, McPherson RA. *Widmann Interpretazione clinica degli esami di laboratorio*. Milano: McGraw-Hill Libri Italia srl 1991:253-65.
28. Giboney PT, Mildly elevated liver transaminase levels in the asymptomatic patient *Am Fam Phys* 2005; 71:1105-10.
29. Ioannou GN, Boyko EJ, Lee SP. The prevalence and predictors of elevated serum aminotransferase activity in The United States in 1999-2002 [Abstract] *Am J Gastroenterology* 2006; 101 (1):76-82.
30. Dubois F, Francois M, Mariotte N. Serum alanine aminotransferase measurement as a guide to selective testing for hepatitis C during medical check-up. *J Hepatol* 1994;21:83742.
31. Rizzotti P. Esperienze di valutazione dell'appropriatezza. *RIMeL IJLaM* 2005; 1 (Suppl):115-118.
32. Marzioli G, Mazzoni C. Come ti ottimizzo i costi di un laboratorio di analisi. *Sole 24 Ore Sanità* 2004;10 (16-22 marzo):26-7.
33. Rang M. The Ulysses syndrome. *Can Med Assoc J* 1972;160: 122-3.
34. Nosaka K, Clarkson PM, Apple FS. Time course of serum protein changes after strenuous

- exercise of the forearm flexors. *J Lab Clin Med* 1992;119:183-6.
35. Galasso PJ, Litin Sc, O'Brien JF. The macroenzymes: a clinical review. *Mayo Clin Proc* 1993;68:349-56.
 36. Green RM, Flams S. American Gastroenterological Association technical review on the evaluation of liver chemistry tests. *Gastroenterology* 2002;123:1367-84.
 37. EPE-IFCC. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. Part 3. Revised (1977) IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate:2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1) *Clin Chim Acta* 1977;80:21-2F.
 38. Bergmeyer HU, Horder M, Rej R, Approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC Method for alanine aminotransferase. *J Clin Chem Ckin Biochem* 1986;24:481-489.
 39. Fachkommission der Schweizerischen Gesellschaft für Klinische Chemie. Empfohlene Methoden zur Bestimmung von 6 Enzymen im Blutplasma: GOT, GPT, LDH, ALP, CPK and GGT. *Bull Schweiz Ges Klin Chem* 1978;1:3-24.
 40. SFBC-Commission Enzymologie. Recommendations pour la mesure de l'activité catalytique de l'aspartate aminotransférase dans le sérum à 30°C. *Ann Biol Clin* 1976;34:291-302.
 41. Haeckel R, Horder M, Zender R. Documenti Cismel. IFCC. Relazione su una rassegna di opinioni relativa alle temperature di incubazione preferite per la misura degli enzimi (e di altre componenti) in chimica clinica *J Lab Med* 1985; Vol XII n. 4:336-7.
 42. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Jul;40(7):725-33.
 43. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 4. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of alanine aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Jul;40(7):718-24.
 44. Panteghini M. IFCC reference systems for enzyme standardization. *Biochim Clin* 2005; vol.29,n. 2:100.
 45. Jansen AP. Difficulties in the normalization of aminotransferase measurement with enzyme standards. *J Clin Chem Clin Biochem* 1985; 23:209-12.
 46. Lusting V, Activation of alanine aminotransferase in serum by pyridoxal phosphate *Clin Chem* 1977; 34: 79-82.
 47. Rej R, Fasce CF, Vanderlinde RE. Increased aspartate aminotransferase activity of serum after in vitro supplementation with pyridoxal phosphate *Clin Chem* 1973; 19:92-4.
 48. Franzini C. State of standardization in enzymology: results from an european pilot project *Biochim Clin* 2005;vol.29, n. 2:100-1.
 49. Documenti Cismel: Raccomandazione provvisoria (1974) sulle metodiche IFCC per la determinazione della concentrazione catalitica degli enzimi. *LAB* 1977; Vol IV, n. 2:218-223.
 50. Documenti Cismel: Raccomandazione approvata (1978) su: metodi IFCC per la misura della concentrazione catalitica degli enzimi. *LAB* 1982; Vol IX, n. 5:527-533.
 51. Programma VEQ per la Chimica Clinica 1993. In Bacelle L, Bonvicini P, Burlina A, Plebani M, Pradella M, Salmieri G, Sciacovelli L, Secchiero S, Zaninotto M. Valutazione Esterna di Qualità in chimica clinica: esperienza della Regione Veneto dal 1986 al 1993. Edizione a cura del Centro di Ricerca Biomedica della Regione Veneto 1995; 243-4.
 52. Balas EA, Boren SA. Managing clinical knowledge for health care improvements. *Yearbook of medical informatics*. Bethesda: National Library of Medicine; 2000.
 53. Ceriotti G. Homogeneity of reference intervals and decision levels in clinical enzymology: the final target has been met? *Biochim Clin* 2005;vol.29, n. 2:101.
 54. Foglio illustrativo allegato alla confezione AST, ROCHE. Versione 3 del 08-2004.
 55. Foglio illustrativo allegato alla confezione ALT, ROCHE. Versione 6 del 06-2004.
 56. Note esplicative per l'attuazione del programma. In Bacelle L, Bonvicini P, Burlina A, Plebani M, Pradella M, Salmieri G, Sciacovelli L, Secchiero S, Zaninotto M. Valutazione Esterna di Qualità in chimica clinica: esperienza della Regione Veneto dal 1986 al 1993. Edizione a cura del Centro di Ricerca Biomedica della Regione Veneto 1995;221-2.
 57. www.centroricercabiomedica.it Data di consultazione 14.03.06.
 58. Camerotto A, Carmignoto F. Le note per la limitazione della prescrizione. Una nuova possibilità per migliorare l'appropriatezza nella Medicina di Laboratorio. *RIME L IJLaM* 2005; Vol 1, N. 3:229-232.
 59. Camerotto A, Di Liddo R, Carmignoto F. Il tempo di risposta all'innovazione: un indicatore di efficacia nell'applicazione delle linee guida, di procedure e tecnologie innovative. *RIME L IJLaM* In stampa.
 60. Plebani M, Mussap M. Information Technology, automazione e appropriatezza: le logiche organizzative e le logiche diagnostiche. *Riv Med Lab- JLM* 2004;Vol 5, N. 2:92-101.
 61. Camerotto A, De Toni S, Carmignoto F, Marcolongo A. L'adozione di note di prescrivibilità

per i test di laboratorio può essere uno strumento di migliore appropriatezza? *Mecosan* 2004; 51:71-6.

62. Camerotto A, Carmignoto F. L'utilizzo di note informative per gli esami di laboratorio: uno strumento per l'appropriatezza e per il risparmio di risorse nella Medicina di Laboratorio. *Biochim Clin* 2005; vol.29, n.4: 371-83.
63. Burlina A. Le funzioni del medico di laboratorio: le attività dirette. *Progr Med Lab* 1988; Vol 2, N. 4:249-50.