



Marcatori diagnostici dell'abuso alcolico e ruolo dell'Etil Glucuronide

Lucia Politi, Luca Morini



Werfen Group



**Instrumentation
Laboratory**

Lucia Politi

Dipartimento di Anatomia, Istologia e Medicina Legale,
S.O.D.C. di Tossicologia Forense, Università di Firenze

Luca Morini

Laboratorio di Analisi Chimico-Tossicologiche
Dipartimento di Medicina Legale e Sanità Pubblica
Università di Pavia

Marcatori diagnostici dell'abuso alcolico e ruolo dell'Etil Glucuronide

Introduzione	Pag. 4
Biochimica dell'EtG	Pag. 6
Interesse clinico-diagnostico di EtG	Pag. 7
Scelta della matrice	Pag. 7
Analisi di EtG in sangue e siero: cinetica	Pag. 7
Analisi di EtG in sangue e siero: applicazioni cliniche e forensi	Pag. 8
Analisi di EtG in campioni urinari: cinetica	Pag. 9
Analisi di EtG in campioni urinari: applicazioni cliniche e forensi	Pag. 9
Analisi di EtG in matrice cheratinica: applicazioni cliniche e forensi	Pag. 12
EtG: tecniche di analisi	Pag. 14
Conclusioni	Pag. 15
Bibliografia	Pag. 17

Secondo quanto riportato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) relativamente al 2007⁽¹⁾, l'alcol è direttamente o indirettamente responsabile ogni anno di 1.8 milioni di morti. Di questi, il 32% corrisponde a traumi accidentali, il 13.7% ad altri traumi di *varia* origine mentre il 4.0% delle patologie sviluppate ogni anno globalmente è fatto risalire all'uso di alcol (in particolare il cancro esofageo ed epatico e la cirrosi epatica). Nel 2004, la stessa OMS, nel "Global status report on alcohol", stimò che 76 milioni di persone fossero affette da un deficit di salute riconducibile all'uso di alcol⁽²⁾. Sempre secondo l'OMS in Italia, il 12.8% dei maschi e l'11.5% delle femmine assume alcol in modo non moderato (più di 40 e 20 g/die per maschi e femmine, rispettivamente)⁽³⁾.

La diagnosi di patologie correlate all'alcol segue criteri diagnostici accettati a livello internazionale quali il DSM IV e la Classificazione Internazionale delle Malattie (ICD-10) dell'OMS e gli strumenti diagnostici usufruiscono sia di questionari volti a identificare problemi connessi all'uso di alcol, sia di esami biochimici. Tra questi sono di uso comune quelli che fanno riferimento ad alcuni enzimi epatici gamma glutamiltrasferasi (GGT), aspartato aminotrasferasi (AST), alanina aminotrasferasi (ALT) e, soprattutto, alla transferrina carboidrato carente (CDT, dall'acronimo inglese *Carbohydrate Deficient Transferrin*). Questi marker, che subiscono un incremento in presenza di un consumo di alcol non moderato, difettano per sensibilità e specificità diagnostiche essendo influenzati da vari altri fattori tra cui variabilità genetica, patologie epatiche di altra origine, assunzione di farmaci, fattori ormonali^(4,5).

Ai marker tradizionali (Figura 1) negli ultimi anni si è affiancata la determinazione, sia in matrici convenzionali (sangue, urina), sia alternative (capelli, meconio), di prodotti minori del metabolismo non ossidativo dell'alcol, quali l'etil glucuronide (EtG), l'etil solfato (EtS) e gli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE). In quanto metaboliti diretti dell'alcol, tali molecole sono virtualmente dotate di specificità assoluta e si sono dimostrate particolarmente promettenti anche in termini di sensibilità.

Indicatori, sensibilità e specificità

Indicatore (marker): sostanza la cui presenza indica un particolare stato dell'organismo (patologia, esposizione a una determinata sostanza).

Sensibilità: probabilità che il marker sia positivo in presenza della patologia o della sostanza, ossia, proporzione di veri positivi: veri positivi / (veri positivi + falsi negativi).

Specificità: probabilità che il marker sia negativo in assenza della patologia o della sostanza, ossia, proporzione di veri negativi: veri negativi / (veri negativi + falsi positivi).

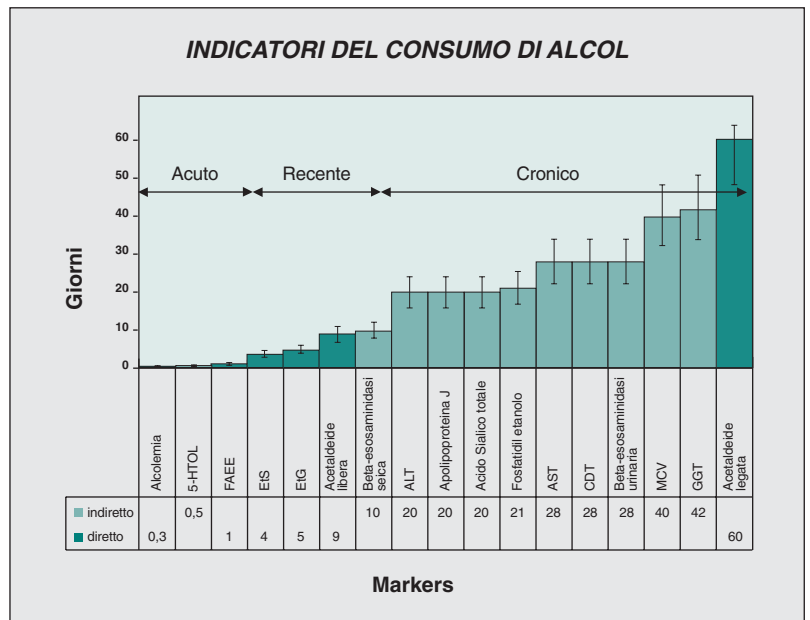


Figura 1

L'EtG è una molecola non volatile, polare, relativamente stabile, formata dalla coniugazione dell'etanolo con l'acido glucuronico con la mediazione delle UDP-glucuronil transferasi (UGT), una superfamiglia di enzimi altamente polimorfici (Figura 2). L'EtG sembra essere sintetizzato da varie isoforme delle UGT cosicché differenze funzionali individuali non debbano risultare in una distorsione del dato analitico⁽⁶⁾.

Di conseguenza, la mancanza in un individuo di una isoforma dell'enzima non fa supporre variazioni significative nella formazione di EtG, e quindi individui appartenenti a etnie differenti sintetizzano con ogni probabilità la stessa percentuale del composto in seguito all'assunzione di alcool. In generale, è stato stimato che lo 0.02-0.06% dell'etanolo assunto sia trasformato in EtG.

L'EtS è formato dal trasferimento di un gruppo solforico dalla 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosolfato all'etanolo dalla famiglia di solfotrasferasi (SULT), anch'esse caratterizzate da un elevato polimorfismo⁽⁷⁻⁹⁾. Il processo di esterificazione a solfato è con ogni probabilità dello stesso ordine di grandezza della esterificazione a glucuronide tanto che nel controllo di 86 campioni di urina è stato osservato un rapporto molare EtG/EtS compreso tra 0.3 e 6.1 (media: 2.3, mediana: 1.7)⁽¹⁰⁾.

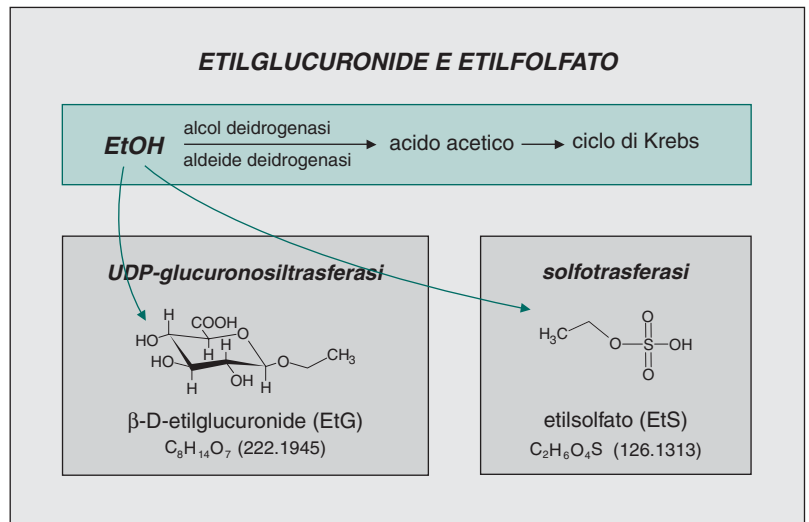


Figura 2

Glucuronide o glucuronato?

La corretta nomenclatura italiana dell'estere etilico dell'acido glucuronico è "etil glucuronato". Tuttavia, la dizione inglese di "glucuronide" è senza dubbio molto più diffusa di quella "legittima", in particolare se riferita all'estere etilico. Parlare di "etil glucuronato" suona quasi come parlare di "topo" nel senso di "mouse" del computer...

Scelta della matrice

La Figura 3 mostra lo schema generico di rilevabilità di una sostanza in seguito all'assunzione. Dopo l'ingestione, la sostanza è rilevabile nel sangue per alcune ore, poi nell'urina per alcuni giorni e infine nei capelli (se l'assunzione è sufficiente a permetterne l'incorporazione) fino a mesi di distanza. Anche l'analisi di metaboliti, come EtG ed EtS, sarà effettuata nel sangue o nel siero, se si vuole verificare l'esposizione nel momento immediatamente precedente il prelievo (o la morte, nel caso di indagine necroscopica), nell'urina e nei capelli, rispettivamente, se sono d'interesse i 2-3 giorni oppure i mesi precedenti il prelievo.

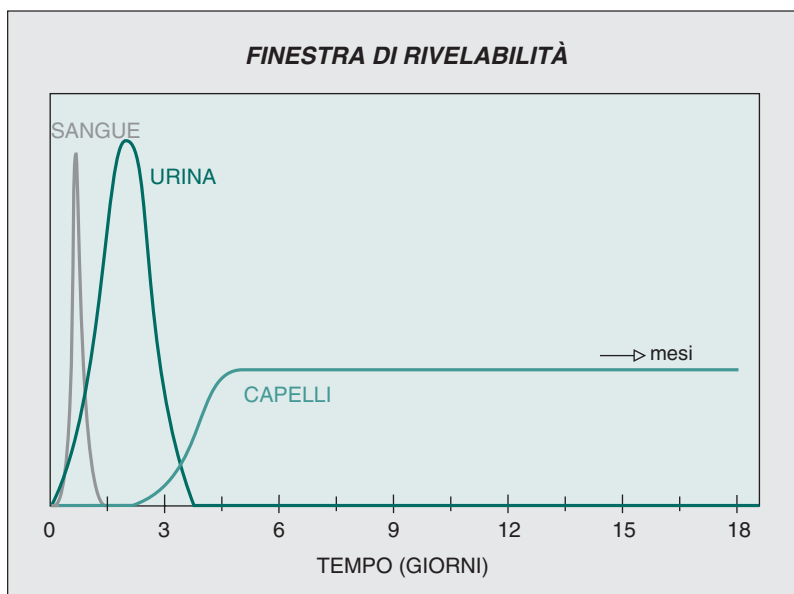


Figura 3

Analisi dell'EtG in sangue e siero: cinetica

La cinetica di EtG ed EtS è stata recentemente studiata nel dettaglio da Halter *et al.*⁽¹¹⁾. A tredici volontari classificati come "social drinker", dopo almeno una settimana di astinenza dall'alcol, è stata somministrata una quantità di vino tale da produrre un'alcolemia di circa 0.5 g/kg. Campioni di siero sono stati raccolti per 10 ore e campioni di urina per 3 giorni dopo la somministrazione. Siero e urina sono stati analizzati con metodi validati in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS-MS) dopo estrazione su fase solida (SPE, limite inferiore di quantificazione (LLOQ): 100 µg/l per entrambe le molecole). L'etanolo ha presentato il picco di concentrazione sierica, pari a 0.51 ± 0.17 g/kg, dopo un tempo di 1.8 ore (deviazione standard: ± 0.2 , mediana: 1.9 ore).

I picchi dell'EtG e dell'EtS si sono manifestati rispettivamente dopo 4.0 ore (deviazione standard: ± 0.9 , mediana: 4.25 ore) alla concentrazione di $644 \pm 289 \mu\text{g/l}$ (mediana: $622 \mu\text{g/l}$) e dopo 3.0 ore (deviazione standard: ± 0.9 , mediana: 2.9 ore) alla concentrazione di $353 \pm 202 \mu\text{g/l}$, (mediana: $290 \mu\text{g/l}$) (Figura 4).

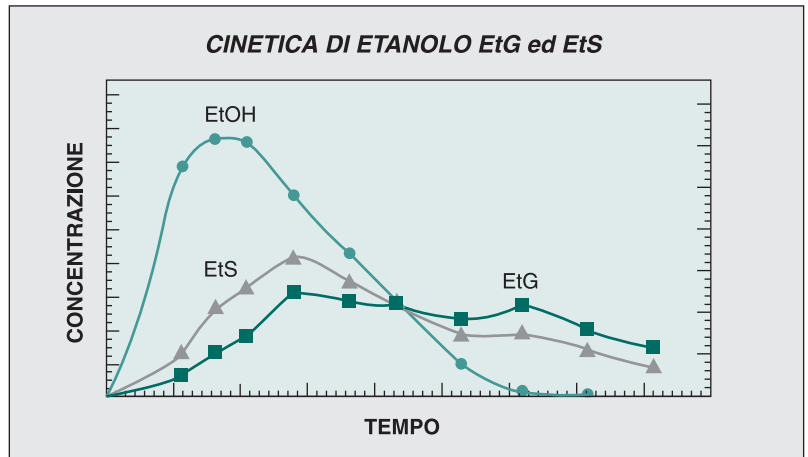


Figura 4

Analisi dell'EtG in sangue e siero: applicazioni cliniche e forensi

La determinazione dell'EtG o dell'EtS nei campioni di siero permette di prolungare la finestra temporale di rilevabilità dell'assunzione di etanolo. Questo fatto può essere sfruttato quando è necessario stabilire se un individuo fosse sotto l'effetto dell'alcol in un determinato evento (per esempio un incidente stradale) avvenuto alcune ore prima del prelievo.

La presenza di EtG o EtS nel siero può anche permettere di discriminare una presenza di etanolo dovuta a fermentazione o a contaminazione esterna (per esempio da disinfettanti). La fermentazione batterica è in grado di produrre etanolo anche in campioni di sangue cadaverico. Høiseth *et al.*⁽¹²⁾ determinarono l'EtG dopo deproteinizzazione e LC-MS-MS (LLOQ: $60 \mu\text{g/l}$) nel sangue prelevato al momento dell'autopsia da due gruppi di soggetti: il gruppo 1, composto da 93 casi con probabile assunzione in vita di etanolo (per la presenza di etanolo nel sangue e nell'umor vitreo e l'assenza di putrefazione) e il gruppo 2, composto da 53 individui, 42 risultati negativi alla ricerca dell'etanolo nei fluidi corporei, e 11 soggetti nei quali era stata individuata la probabile formazione post-mortale di etanolo (presenza di etanolo nel sangue e assenza nell'umor vitreo, presenza di putrefazione). Tutti i casi del gruppo 1 risultarono positivi all'EtG, anche in presenza di concentrazioni basse di etanolo, mentre nessun caso del gruppo 2 risultò positivo all'EtG. La ricerca dell'EtG può di conseguenza essere di supporto risolutivo quando è necessario distinguere l'ingestione ante-mortem di etanolo dalla formazione post-mortale dell'alcol.

Infine, la determinazione quantitativa di EtG o EtS nel siero, in due campioni prelevati in un breve lasso temporale, e confrontati con le concentrazioni ematiche di etanolo, consente di valutare quei casi conosciuti come "hip-flask defence", ove il guidatore, sotto accusa per essere risultato positivo al test dell'etilometro a seguito di un incidente stradale, sostiene di aver consumato bevande alcoliche solo in un secondo tempo, per scaricare la

tensione accumulata. Incrociando i risultati quantitativi di etanolo, EtG o EtS nei due campioni e tenendo presente le diverse cinetiche di queste molecole, è possibile determinare con buona approssimazione il reale tempo di assunzione di sostanze alcoliche.

Applicazioni in sangue/siero

- a. quando è necessario stabilire se un individuo fosse sotto l'effetto dell'alcol in un determinato evento avvenuto alcune ore prima del prelievo (esempio: pirata della strada)
- b. quando è necessario distinguere l'ingestione *ante mortem* dalla formazione *post mortem* di etanolo
- c. *hip-flask defence* (guidatore positivo all'etilometro a seguito di un incidente stradale che sostiene di aver consumato alcol in un secondo tempo): è possibile determinare con buona approssimazione il reale momento di assunzione di sostanze alcoliche

Analisi dell'EtG in campioni urinari: cinetica

Secondo il lavoro di Halter, l'assunzione di una quantità di etanolo tale da produrre un'alcolemia di circa 0.5 g/kg determina concentrazioni urinarie di picco dell'ordine di 89.0 mg/l (\pm 51.5, mediana : 90.8 mg/l) per l'EtG e di 33.5 mg/l (\pm 19.3, mediana :35.7 mg/l) per l'EtS rispettivamente dopo 6.2 ore (\pm 0.9, mediana: 6.2 ore) e 5.3 ore (\pm 1.2, mediana :5.5 ore). I due metaboliti sono pertanto rilebabili nell'urina ben più a lungo dell'etanolo, per periodi di tempo di almeno 10 volte (EtG) e di 3-8 volte (EtS) superiori⁽¹¹⁾.

Analisi dell'EtG in campioni urinari: applicazioni cliniche e forensi

Il recente lavoro di Halter ha l'indubbio merito di aver puntualizzato i tempi di rivelabilità dell'assunzione di alcol in siero e urina; già in precedenza era tuttavia noto il fatto che l'EtG potesse essere utilizzato nel **monitoraggio di pazienti in trattamento per la dismissione da alcol**. Nel 2004 Skipper *et al.*⁽¹³⁾, analizzarono le urine di 100 professionisti dell'ambito sanitario sottoposti a monitoraggio per l'uso di alcol. Dei 100 campioni, tutti negativi all'etanolo (gas cromatografia con spazio di testa, HS-GC, *cut-off*: 0.1 g/l), 7 risultarono positivi all'EtG, per valori da 0.5 a 196 mg/l (SPE e LC-MS-MS; LLOQ: 0.3 mg/l). Similmente Borucki *et al.*⁽¹⁴⁾ raccolsero per 5 giorni dopo un party universitario le urine e il sangue di 17 studenti. Le analisi furono mirate alla ricerca di: EtG (estrazione su resina e LC-MS-MS, LLOQ: 0.1 mg/l), etanolo nel siero (HS-GC, *cut-off*: 3.26 μ mol/l), FAEE nel siero (GC-MS, *cut-off*: 0.072 μ mol/l); rapporto tra 5-idrossitriptofolo e acido 5-idrossi-indolacetico nell'urina (LC, *cut-off*: 0.015). Tra gli indicatori considerati, l'EtG dimostrò una finestra di rivelabilità maggiore rispetto agli altri, e più precisamente **fino a 78 ore dalla cessazione dell'assunzione di alcol**. Per questo motivo l'EtG è particolarmente adatto al monitoraggio continuo di pazienti in trattamento per alcolismo e in tutti i casi in cui deve essere provata la "totale" astinenza dal alcol, come, ad esempio, nel caso dei soggetti in lista d'attesa per il trapianto epatico⁽¹⁵⁾.

In questi lavori e in molti altri non è citato l'EtS poiché i primi metodi analitici di identificazione e determinazione dell'EtS comparvero in letteratura nel 2004, ad opera di due diversi gruppi di lavoro^(16,10). Fin dall'inizio e come recentemente ribadito da Halter⁽¹¹⁾, la cinetica dell'EtS si rivelò sovrapponibile a quella dell'EtG. Tuttavia il significato interpretativo dell'EtS non si limita alla conferma della formazione di metaboliti di fase II dell'alcol. Infatti, Helander e Beck⁽¹⁷⁾ analizzarono 354 urine di pazienti in monitoraggio per l'uso di alcol e di esse 86 risultarono positive e 261 negative per entrambi i marker, ma 3 risultarono positive per il solo EtG e 4 per il solo EtS (LC-MS-MS, LLOQ: 0.05 mg/l). A partire dalla considerazione che EtG ed EtS sono scissi da enzimi specifici, quali la β -glucuronidasi e la solfatasi e dal fatto che la *Escherichia coli*, responsabile dell'80% circa delle infezioni urinarie è dotata di β -glucuronidasi, lo stesso gruppo analizzò per EtG ed EtS 46 urine risultate positive a diversi batteri dopo aggiunta di 1 mg/ml di EtG ed EtS. Dopo 5 giorni il 68% dei campioni urinari positivi per *E. coli* mantenuti a 22°C presentò un decremento nella concentrazione di EtG. **Nessun decremento fu notato per quanto riguarda l'EtS e sia EtG sia EtS nei campioni mantenuti a 4°C o -20°C⁽¹⁸⁾**. Inoltre, la stessa *E. coli* e altri batteri sono dotati di altri sistemi enzimatici quali la UDP-glucuronil transferasi e la solfotransferasi. Per questo motivo Helander et al.⁽¹⁹⁾ aggiunsero di 1 g/l di etanolo 48 urine affette da *E. coli* o *Klebsiella pneumoniae* o *Enterobacter cloacae* osservando la comparsa dell'EtG (0.5-17.6 mg/l), dopo 24 ore di incubazione a 22°C, nel 35% dei campioni infettati con *E. coli*. In un altro esperimento, gli stessi campioni urinari furono aggiunti di glucosio e *Candida albicans*; dopo 7 giorni a 22°C, fu osservata la formazione di etanolo in tutti i campioni (0.73-1.47 g/l) e la presenza di EtG (1.8-71.4 mg/l) nel 43% delle urine contenenti *E. coli*. Nessuna formazione di EtG fu evidenziata nei campioni nei quali erano presenti gli altri ceppi batterici (*K. pneumoniae* o *E. cloaca*). Né fu mai osservata la neoformazione di EtS. Gli esiti di tali esperimenti ribadiscono il significato diagnostico della ricerca sia di EtG che di EtS - attuata con tecniche e metodi capaci di fornire risultati altamente affidabili - in particolare nei casi in cui la finalità dell'analisi sia di natura amministrativa o medico legale.

EtG e idrolisi batterica: soluzioni (più o meno) future

- a.** Campioni di urina mantenuti a 4 o -20° C dal campionamento all'analisi.
- b.** Provette contenenti ioni fluoruro per inattivare la β -glucuronidasi (limitazione dei falsi negativi).
- c.** Provette contenenti sali di azide per prevenire la crescita batterica (limitazione dei falsi positivi).
- d.** SampleCheck assay: permette di identificare le urine con crescita batterica (risultati tra 110 e 150%).

Al momento è in fase di valutazione la possibilità di sviluppare apposite provette per il campionamento di urine per l'analisi di EtG.

E' stato inoltre puntualizzato che la concentrazione di EtG ed EtS nell'urina varia in funzione della diuresi⁽²⁰⁾. Pertanto, sia nel monitoraggio dei pazienti in trattamento per alcolismo, sia nel corso di accertamenti di natura amministrativa o medico legale, **è consigliabile riportare la concentrazione urinaria dei due metaboliti a quella della creatinina**. Un'ultima considerazione è necessaria in riferimento al valore di *cut-off* urinario da adottare per l'EtG, in seguito al dibattito in corso nei Paesi in

cui il test dell'EtG nell'urina è di routine nel monitoraggio degli individui in trattamento per la dismissione⁽²¹⁾. Nonostante la virtuale specificità assoluta dell'EtG quale indicatore del consumo di alcol, è di primaria importanza l'individuazione di un valore di *cut-off* rapportato alla finalità dell'analisi. Al momento, tuttavia, non esistono ancora indicazioni condivise in campo internazionale. La determinazione di un *cut-off* - con ogni probabilità nettamente superiore ai valori di LLOQ facilmente raggiunti in sede di sviluppo e validazione dei metodi - servirà a sanare eventuali problemi interpretativi connessi con l'impiego di prodotti a base alcolica. Infatti, è stato provato che l'uso di colluttori e di detergenti per le mani contenenti etanolo può produrre positività urinaria all'EtG^(22,23). Tuttavia, alcune critiche di ordine chimico-analitico sono state mosse all'affidabilità dello studio relativo all'uso del collutorio⁽²⁴⁾ e, altresì, altri tipi di contaminazione non sono stati presi in considerazione in questa prospettiva. Non si può, infatti, escludere che altre situazioni di esposizione non intenzionale all'etanolo (vari cibi lo contengono) possano ripercuotersi sulla comparsa del metabolita nell'urina. In Figura 5 sono esemplificate le cause della presenza di EtG nell'urina in relazione alla concentrazione alcolica nei prodotti a base di etanolo. La presenza della *grey zone* suggerisce cautela nell'interpretazione dei risultati inferiori ai 1000 ng/ml.

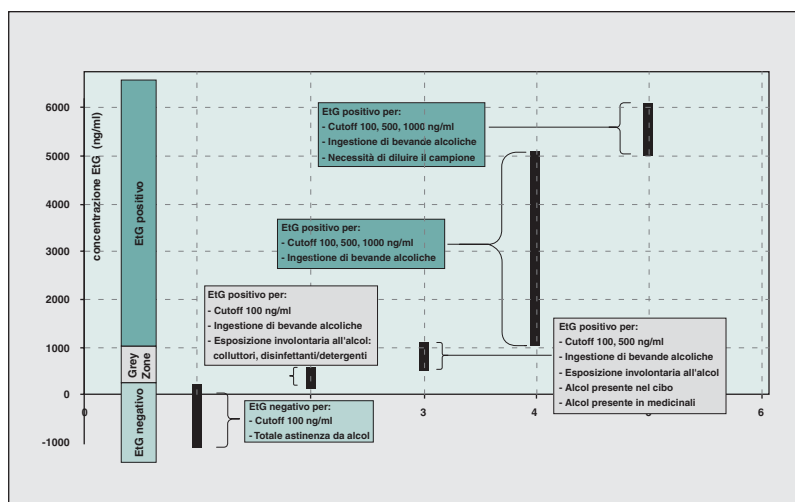


Figura 5

Applicazioni in urina

- nel monitoraggio di pazienti in trattamento per la dismissione da alcol (finestra di rivelabilità: fino a 78 h)
- nel monitoraggio di altri pazienti in "totale" astinenza da alcol (esempio: soggetto in lista d'attesa per trapianto epatico)
- quando è necessario stabilire se è stato assunto alcol in caso di campionamento tardivo
- quando è necessario discriminare la formazione in vitro di etanolo
- quando è necessario discriminare la contaminazione con etanolo (esempio: disinfettante/detergente)

Analisi dell' EtG in matrici cheratiniche: applicazioni cliniche e forensi

Negli ultimi anni l'esigenza di disporre di un'analisi sufficientemente sensibile e specifica per la diagnosi di abuso cronico dell'alcol ha portato a studiare sempre più approfonditamente questo metabolita nel capello. La matrice pilifera, infatti, ha l'indubbio vantaggio di poter ampliare la finestra di sorveglianza, permettendo teoricamente di individuare non soltanto un abuso continuo recente, ma anche un abuso in tempi pregressi. Al contrario dei parametri ematici ordinariamente utilizzati per questo tipo di diagnosi (quali le sopraccitate AST, ALT, GGT, CDT, e il volume corpuscolare medio), l'EtG è, come già sottolineato, un marker diretto, quindi presente nel capello solo in seguito a un consumo di alcol. Inoltre, la matrice cheratinica presenta molti vantaggi di tipo pratico rispetto ad altri campioni biologici, e tra questi vale sottolineare la maggiore facilità di prelievo attuabile anche da personale non medico, la non invasività del campionamento, la facile conservazione del suddetto materiale e la stabilità intramatrice degli analiti, molto superiore rispetto agli altri campioni biologici. L'EtG è stato studiato nel campione pilifero per la prima volta nel 2000 da Skopp *et al.*⁽²⁵⁾. Nel corso dei successivi sette anni sono stati pubblicati altri 15 articoli originali e 4 review correlati a questo argomento, sintomo evidente di un interesse crescente verso questo tipo di accertamento.

Nel 2004 Yegles *et al.*⁽²⁶⁾ osservarono, analizzando capelli di 10 pazienti all'inizio di una terapia di riabilitazione alcolologica, che non esiste una correlazione quantitativa tra i livelli di EtG nel capello con quelli degli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE) che rappresentano un'altra famiglia di metaboliti diretti dell'etanolo. Al contrario, e con ogni probabilità in conseguenza del miglioramento della sensibilità dell'analisi specifica ottenuto nel 2006 dal nostro gruppo di lavoro attraverso l'esame dei capelli di alcolisti, bevitori moderati e soggetti astinenti, venne osservata l'esistenza di una **buona correlazione tra la concentrazione di EtG nella matrice cheratinica e il consumo di alcol dichiarato, in rapporto al peso del soggetto**⁽²⁷⁾. In uno studio successivo⁽²⁸⁾ si mise a confronto questo marker con un altro metabolita dell'etanolo, sempre studiato nel capello e che si forma con l'assunzione simultanea di alcol e cocaina, ossia la cocaetilene. Lo studio prese in considerazione 47 soggetti positivi per cocaina 26 dei quali furono trovati positivi anche per cocaetilene. Si ottenne una buona correlazione qualitativa tra i due metaboliti, ma nessuna correlazione quantitativa con ogni probabilità da attribuirsi alla grande diversità strutturale delle due molecole, oltre che a differenze nei tempi e modi di assunzione e metabolizzazione da parte dei singoli individui. In uno studio presentato al 44° Meeting del TIAFT "The International Association of Forensic Toxicologists"⁽²⁹⁾ la ricerca dell'EtG nel capello venne messo a confronto con la valutazione della CDT nel siero, il test più usato fino ad oggi nella diagnosi da abuso cronico di alcol. I risultati ottenuti sui primi 37 soggetti analizzati, mostrarono che **l'EtG ha una specificità molto buona e perfettamente sovrapponibile a quella della CDT, ma una sensibilità doppia**. Il gruppo del professor Wennig nel 2007 pubblicò due diversi articoli concernenti l'EtG nel capello. Nel primo studio⁽³⁰⁾ si evidenziò come la concentrazione dell'EtG nel capello non è direttamente proporzionale ai livelli di melanina della matrice. Questo risultato è di notevole importanza perché sottolinea che l'EtG **non è soggetto a bias di tipo razziale**, come invece lo sono le più comuni droghe d'abuso ricercate nel capello.

Il secondo studio invece⁽³¹⁾, dove si analizzò l'EtG nei capelli di 15 soggetti all'inizio di un trattamento di riabilitazione alcolica, confermò l'esistenza di una **buona correlazione tra i livelli di EtG nei capelli con il consumo dichiarato di alcol**, confermando così i risultati ottenuti in precedenza dal gruppo del professor Poletini nell'anno precedente. E' evidente che, sebbene tali studi siano da considerarsi ancora preliminari, la concordanza tra i risultati ottenuti in merito alla correlazione quantitativa tra EtG nei capelli e quantità di alcol assunta è senz'altro promettente nella prospettiva di definire valori di soglia di *cut-off* adatti a discriminare l'astemio dal bevitore moderato e il bevitore moderato da quello non moderato.

Applicazioni nei capelli

- a.** nel monitoraggio di pazienti in trattamento per la dismissione
- b.** nel monitoraggio di altri pazienti in astinenza da alcol
(esempio: soggetto in lista d'attesa per trapianto epatico)
- c.** verifica dell'idoneità alla guida

I primi metodi analitici di determinazione dell'EtG furono sviluppati in GC-MS, dopo estrazione dalla matrice e derivatizzazione (sia a trimetilsilil- che ad acetil-derivati)⁽³²⁾. Tuttavia, la totalità dei metodi pubblicati negli ultimi anni prevede l'uso della LC-MS(-MS). Tale tecnica è particolarmente adatta alla rivelazione di molecole molto polari come EtG ed EtS, e, in particolare, di molecole la cui derivatizzazione è molto difficilmente praticabile, come l'EtS. Inoltre, la LC-MS(-MS) dotata di fase inversa per la parte cromatografia, e di un rivelatore particolarmente sensibile per la spettrometria di massa, ha permesso di ridurre la preparazione dei campioni alla semplice diluizione dell'urina⁽³³⁾ e del liquido di incubazione dei capelli⁽³⁴⁾ e alle sole deproteinizzazione e diluizione nel caso del siero e del sangue⁽³⁵⁾.

Recentemente è stato messo a punto un test immunoenzimatico omogeneo per la determinazione dell'EtG nell'urina⁽³⁶⁾; il test è stato comparato alla LC-MS mediante l'analisi di 400 campioni di urina; la correlazione quantitativa è risultata buona ($r = 0.959$ per i campioni positivi con entrambe le tecniche, $n = 138$) mentre sensibilità e specificità sono risultate superiori al 98.5% (con *cut-off* sia a 1 che a 0.5 mg/l). Si tratta di un metodo che impiega un anticorpo monoclonale ed è applicabile sui più comuni analizzatori di chimica clinica.

...Test immunoenzimatico o spettrometria di massa?

In funzione della finalità dell'analisi e come per ogni altro indicatore, essa può essere limitata al solo screening (metodo immunochimico), o includere l'analisi di conferma con tecnica più specifica (in genere LC-MS-MS o GC-MS). Per la definizione di quale sia la tecnica idonea è necessario rifarsi alle linee guida del settore.

La diffusione della LC-MS e l'attuale sviluppo di tecniche immunoenzimatiche stanno rendendo l'analisi di EtG ed EtS maggiormente fruibile da parte di strutture chiamate a esprimersi in merito a diversi casi concreti. In particolare, la determinazione dei due metaboliti nel siero del vivente è d'aiuto quando è richiesto di stabilire se un individuo fosse sotto l'effetto dell'alcol in situazioni verificatesi anche alcune ore prima del prelievo (come nel caso di un incidente causato da un pirata della strada), o di dirimere casi di *hip-flask defence*, determinando con buona approssimazione il reale momento di assunzione di sostanze alcoliche.

Il rilievo dei due metaboliti nell'urina amplia ulteriormente la finestra di rivelabilità dell'assunzione di alcol (fino a 78 h) e risulta prezioso nel monitoraggio di pazienti in trattamento per la dismissione da alcol o di altri soggetti in auspicabile e "totale" astinenza da alcol (ad esempio pazienti in lista d'attesa per trapianto epatico). L'analisi dell'EtG e dell'EtS, permette inoltre, non solo di discriminare la formazione *in vitro* di etanolo e la contaminazione dei campioni con etanolo proveniente da disinfettanti o detergenti ma anche di distinguere esaminando il sangue cadaverico, l'ingestione *ante mortem* di etanolo dalla formazione *post mortem* ad opera di fenomeni putrefattivi.

L'analisi di EtG nel capello ha recentemente dimostrato di avere stessa specificità e sensibilità doppia della CDT quale marker del consumo di alcol superiore a 60 g al giorno e, pertanto, di essere utile nel monitoraggio di pazienti, sia in trattamento per la dismissione dal consumo di etanolo, sia in astinenza da alcol per altri motivi. Infine, in modo analogo a quanto da tempo avviene in merito alla ricerca di sostanze stupefacenti nel capello al fine di accertare un'eventuale tossicodipendenza pregressa in ordine alla verifica dell'idoneità alla guida, la ricerca dell'EtG nella medesima matrice assume significativa valenza in tal senso anche nei confronti dell'abuso alcolico.

1. Alcohol and injury in Emergency Departments. Summary of the Report from the WHO Collaborative Study on Alcohol and Injuries: www.who.int/substance_abuse/publications/alcohol_injury_summary.pdf
2. Global Status Report on Alcohol 2004: www.who.int/substance_abuse/publications/global_status_report_2004_overview.pdf
3. WHO Global Status Report on Alcohol 2004. Country profiles. www.who.int/substance_abuse/publications/en/italy.pdf
4. Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction*. 2003; 98 Suppl 2: 31-43.
5. Javors MA, Johnson BA. Current status of carbohydrate deficient transferrin, total serum sialic acid, sialic acid index of apolipoprotein J and serum beta-hexosaminidase as markers for alcohol consumption. *Addiction*. 2003; 98 Suppl 2: 45-50.
6. Foti RS, Fisher MB. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int*. 2005; 153(2-3): 109-16.
7. Raftogianis RB, Wood TC, Weinshilboum RM. Human phenol sulfotransferases SULT1A2 and SULT1A1: genetic polymorphisms, allozyme properties, and human liver genotype-phenotype correlations. *Biochem. Pharmacol*. 1999; 58: 605-616.
8. Glatt H, Meini W. Sulfotransferases and acetyltransferases in mutagenicity testing: technical aspects. *Methods Enzymol*. 2005; 400: 230-49.
9. Carlini EJ, Raftogianis RB, Wood TC, Jin F, Zheng W, Rebbeck TR, Weinshilboum RM. Sulfation pharmacogenetics: SULT1A1 and SULT1A2 allele frequencies in Caucasian, Chinese and African-American subjects. *Pharmacogenetics*. 2001 Feb; 11(1):57-68.
10. Helander A, Beck O. Ethyl sulfate: a metabolite of ethanol in humans and a potential biomarker of acute alcohol intake. *J Anal Toxicol*. 2005; 29: 270-274.
11. Halter CC, Dresen S, Auwaerter V, Wurst FM, Weinmann W. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulfate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med*. 2008; 122(2): 123-8.
12. Høiseth G, Karinen R, Christophersen AS, Olsen L, Normann PT, Mørland J. A study of ethyl glucuronide in post-mortem blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol. *Forensic Sci Int*. 2007; 165(1): 41-5
13. Skipper GE, Weinmann W, Thierauf A, Schaefer P, Wiesbeck G, Allen JP, Miller M, Wurst FM. Ethyl glucuronide: a biomarker to identify alcohol use by health professionals recovering from substance use disorders. *Alcohol Alcohol*. 2004; 39(5): 445-9.
14. Borucki K, Schreiner R, Dierkes J, Jachau K, Krause D, Westphal S, Wurst FM, Luley C, Schmidt-Gayk H. Detection of recent ethanol intake with new markers: comparison of fatty acid ethyl esters in serum and of ethyl glucuronide and the ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole acetic acid in urine. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005; 29(5): 781-7.

15. Erim Y, Böttcher M, Dahmen U, Beck O, Broelsch CE, Helander A. Urinary ethyl glucuronide testing detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver Transpl.* 2007; 13(5): 757-61.
16. Dresen S, Weinmann W, Wurst FM. Forensic confirmatory analysis of ethyl sulfate--a new marker for alcohol consumption--by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2004; 15(11): 1644-8.
17. Helander A, Beck O. Mass spectrometric identification of ethyl sulfate as an ethanol metabolite in humans. *Clin Chem.* 2004; 50(5): 936-7.
18. Helander A, Dahl H. Urinary tract infection: a risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in the detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem.* 2005; 51(9): 1728-30.
19. 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(10): 1855-7.
20. Dahl H, Stephanson N, Beck O, Helander A. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethyl glucuronide. *J Anal Toxicol.* 2002; 26: 201-204
21. Ethyl Glucuronide - EtG - Information:...
<http://ethylglucuronide.homestead.com/Update.html>
22. Costantino A, Digregorio EJ, Korn W, Spayd S, Rieders F. The effect of the use of mouthwash on ethylglucuronide concentrations in urine. *J Anal Toxicol.* 2006; 30: 659-662.
23. Rohrig TP, Huber C, Goodson L, Ross W. Detection of ethylglucuronide in urine following the application of Germ-X. *J Anal Toxicol.* 2006; 30: 703-704.
24. Beyer J, Gerostamoulos D, Drummer O, Costantino A. Comments on "The effect of the use of mouthwash on ethylglucuronide concentration in urine". *J Anal Toxicol.* 2007; 31(5): 294-5.
25. Skopp G, Schmitt G, Pötsch L, Drönner P, Aderjan R, Mattern R. Ethyl glucuronide in human hair *Alcohol Alcohol.* 2000; 35(3): 283-5.
26. Yegles M, Labarthe A, Auwärter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. *Forensic Sci Int.* 2004; 145(2-3): 167-73.
27. Politi L, Morini L, Leone F, Poletti A. Ethyl glucuronide in hair: Is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction.* 2006 Oct; 101(10): 1408-12
28. Politi L, Zucchella A, Morini L, Stramesi C, Poletti A. Markers of chronic alcohol use in hair: comparison of ethyl glucuronide and cocaethylene in cocaine users. *Forensic Sci Int.* 2007; 172(1): 23-7.

-
29. Poletini A, Morini L, Stramesi C, Politi L. Sensitivity and selectivity of ethyl glucuronide in hair as a marker of chronic alcohol use: Preliminary results, in: 44th Meeting of the International Association of Forensic Toxicology (TIAFT), Ljubljana, Slovenja, August 27–September 1, 2006, CT-1-11 (Abstracts).
 30. Appenzeller BM, Schuman M, Yegles M, Wennig R. Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation. *Alcohol Alcohol*. 2007 Jul-Aug;42(4): 326-7
 31. Appenzeller BM, Agirman R, Neuberg P, Yegles M, Wennig R. Segmental determination of ethyl glucuronide in hair: a pilot study. *Forensic Sci Int*. 2007; 173(2-3): 87-92.
 32. Politi L, Leone F, Morini L, Poletini A. Bioanalytical procedures for determination of conjugates or fatty acid esters of ethanol as markers of ethanol consumption: a review. *Anal Biochem*. 2007; 368(1): 1-16.
 33. Politi L, Morini L, Groppi A, Poloni V, Pozzi F, Poletini A. Direct determination of the ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2005; 19(10): 1321-31.
 34. Morini L, Politi L, Groppi A, Stramesi C, Poletini A. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2006; 41(1): 34-42.
 35. Morini L, Politi L, Zucchella A, Poletini A. Ethyl glucuronide and ethyl sulphate determination in serum by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2007; 376(1-2): 213-9.
 36. Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of a new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol Alcohol*. 2008; 43(1): 46-8.



Part. No 98085-69