

Nuovi marcatori di abuso alcolico: transferrina carboidrato carente (CDT) ed etilglucuronide (EtG) (Rassegna)

Vincenza Bianchi^{1,2}, Alessia Raspagni³, Carlo Arfini²

¹Laboratorio di Tossicologia e ²Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera SS. Antonio e Biagio e C. Arrigo, Alessandria

³Dipartimento di Chimica Farmaceutica, Università degli Studi, Pavia

INTRODUZIONE

Nel mondo occidentale si sta osservando un forte aumento delle problematiche sanitarie legate all'eccessivo consumo di alcol¹, le statistiche correnti indicano che il 20-30% dei costi relativi alla cure sanitarie e alla ospedalizzazione sono da attribuire all'abuso alcolico, anche il consumo pro capite è aumentato tanto che potrebbe ipotizzarsi una diminuzione dell'aspettativa di vita nei paesi con più elevato consumo di alcol². Per questa ragione occorre sviluppare politiche più efficaci che possano portare ad una riduzione del consumo alcolico individuale e della popolazione e trovare modalità diagnostiche in grado di evidenziare precocemente il danno legato al consumo di alcol. Anche se nei fatti sono disponibili una varietà di questionari e test specifici³, attraverso di essi i clinici non sono sempre in grado di individuare correttamente i disordini legati all'eccessivo uso. Infatti i questionari (CAGE, MAST o AUDIT) sono autocompilati e come tali non sempre sono rispondenti alla reale situazione del paziente. Sebbene non ci sia una chiara soglia per definire il forte consumo di alcol, dati epidemiologici indicano che quando si eccede il livello di circa 300 g/settimana nell'uomo o di 200 g/settimana nella donna può venirsi a creare un significativo rischio per la salute. I problemi alcol correlati sono tipicamente associati a conseguenze negative mediche, economiche e sociali sia per gli individui che per la società. Il consumo eccessivo è un fattore di rischio per malattie, incidenti, traumi e danni ed è causa di morte prematura⁴. L'alcol è chiamato in causa nell'attività criminale, nella violenza personale, e nel danno verso la proprietà. Per evidenziare l'uso di alcol come reale causa dei sintomi manifestati, bisogna avere a disposizione test di laboratorio che costituiscano un'evidenza oggettiva di consumo di etano-

lo; il dosaggio di biomarcatori specifici potrebbero aiutare il medico nel follow-up e nel miglioramento della *compliance* del paziente e nell'esito del trattamento stesso⁵. La loro validità diagnostica ad oggi è ancora incompleta e l'informazione sulla loro sensibilità e specificità, anche dei marcatori più comuni, rimane ancora controversa, tuttavia studi raccomandano l'uso di test di screening, anche solo in caso di sospetto, nella medicina di base, in ospedale e sul posto di lavoro in modo da evidenziare precocemente il problema prima ancora che compaiano i sintomi⁶.

BIOMARCATORI

Definizione

Esistono diversi tipi di biomarcatori: quelli che individuano la predisposizione genetica a sviluppare dipendenza da alcol dopo esposizione cronica (biomarcatori di *trait*) e quelli che evidenziano il consumo acuto o cronico di alcol o il danno di un organo alcol-indotto (biomarcatori di *stato*). I primi sono ancora confinati nell'ambito della ricerca, gli studi appaiono promettenti ma qualche volta contraddittori, mentre i secondi sono stati utilizzati con successo in ambito clinico, e non solo, per individuare e monitorare l'uso di alcol (Fig. 1). Perché i clinici possano oggettivamente valutare assunzioni a rischio, sono stati proposti un largo numero di marcatori di *stato* nel sangue e nelle urine, basati sulla misura diretta o indiretta degli effetti derivanti dal consumo di alcol. Essi rappresentano un modo obiettivo per stimare approssimativamente la quantità consumata e le modalità (es. assunzioni pesanti acute o croniche) nonché per valutare l'effetto dannoso sull'organismo dovuto ad un prolungato abuso (es. danno epatico alcol indotto).

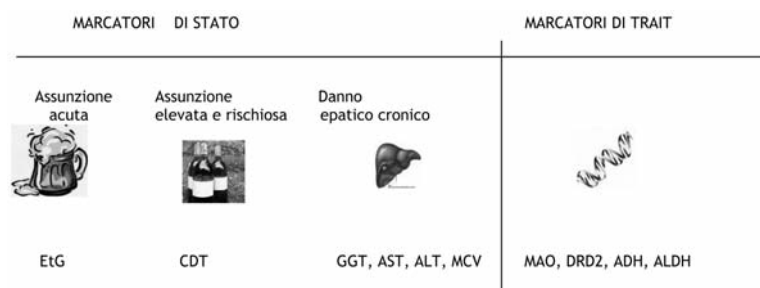


Figura 1

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

EtG: etilglucuronide, CDT: transferrina carboidrato-carente; MCV: volume corpuscolare medio; MAO: monoaminossidasi; DRD2: recettore della dopamina D2; ALDH: aldeiddeidrogenasi

Un marcatore biochimico è una sostanza presente nei fluidi biologici (sangue, urina, ecc.) in grado di dare evidenza della presenza o del progredire di una condizione patologica, in particolare quelli di abuso alcolico sono usati negli screening per fare diagnosi, specialmente nelle prime fasi della malattia, per monitorarne l'uso o per scopi di ricerca. Un biomarcatore ideale possiede alcune caratteristiche che lo rendano affidabile, infatti deve:

- dare risultati attendibili e riproducibili
- essere capace di distinguere assunzione di piccole o moderate quantità di alcol rispetto a quelle più pesanti
- rappresentare accuratamente la quantità di alcol che è stata consumata durante un periodo di tempo
- avere un facile modo di misura, anche ripetuto nel tempo
- essere economico e facilmente disponibile

Quando si sceglie un biomarcatore occorre considerare

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

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

Sensibilità, specificità e valori predittivi

I marcatori biologici sono valutati in termini di sensibilità e specificità diagnostiche. In questo contesto la sensibilità si riferisce alla capacità del test di identificare quegli individui con un particolare livello e/o durata di consumo alcolico, mentre la specificità si riferisce alla capacità del test di escludere quelli che bevono meno⁷. Di conseguenza un marcatore altamente sensibile individua pochi falsi negativi ed uno con alta specificità pochi falsi positivi. Un marcatore ideale dovrebbe avere 100% di specificità e di sensibilità ma questa situazione è solo teorica. Infatti, a causa della variabilità biologica intra- ed inter- individuale del livello basale e di quello dopo assunzione di una quantità nota di alcol, quando si determinano gli intervalli di riferimento della popolazione "normale" e dedita all'alcol i valori di solito si sovrappongono parzialmente, così che si ha una zona diagnostica grigia. Alcune persone sono capaci di bere eccessivamente senza avere risultati anormali, questo significa che quel marcatore, in quei soggetti, ha bassa sensibilità. D'altra parte le concentrazioni di alcuni marcatori dell'alcol possono essere elevate anche in persone che non sono affette da problemi alcol correlati, questo significa che essi sono affetti da bassa specificità in quel tipo di popolazione.

Per i parametri di laboratorio gli intervalli di riferimento sono normalmente calcolati come la media \pm 2 ds dei valori di una ben definita popolazione di controllo sana. Assumendo che i valori si distribuiscano secondo una curva gaussiana normale, questo ha come risultato una specificità minore del 100% poiché il 5% dei valori di controllo si posizionano fuori del più alto e del più basso limi-

te di riferimento. Quando si definiscono i valori di riferimento per i marcatori dell'alcol ci sono diversi fattori che si devono considerare:

a) esiste una limitazione nella valutazione di sensibilità e specificità dei marcatori biologici in relazione al fatto che molte volte si utilizzano, come *gold standard* per il consumo di alcol, dati autocompilati dai soggetti interessati allo studio ed è noto che molti pazienti non riferiscono la storia accurata della loro vera assunzione; questa metodologia crea allora non pochi problemi di validità.

b) il modello di consumo alcolico e le consuetudini del bere sociale variano tra culture e società e questo fa variare le modalità con cui viene reclutata la popolazione normale di controllo. L'uso di curve *Receiver-Operating Characteristic* (ROC), dove è valutata la relazione tra sensibilità e specificità a differenti cut-off nei normali e nei bevitori, è diventato uno strumento utilizzato per paragonare le prestazioni dei marcatori alcolici e selezionare le soglie limite⁸.

Nella routine, la possibilità di ottenere una corretta classificazione (valori predittivi) con un marcatore biologico per l'alcol è fortemente legato alla prevalenza dell'uso/abuso di alcol nella popolazione da studiare. Il valore predittivo positivo (VPP) fornisce la proporzione di risultati dei test veramente positivi tra tutti i risultati positivi (somma di veri e falsi positivi) e il valore predittivo negativo (VPN) la proporzione di risultati dei test veramente negativi tra tutti i risultati negativi (somma dei veri e falsi negativi). Ancora quando si usa un marcatore con sensibilità e specificità abbastanza alti, il rischio per una errata classificazione può essere piuttosto elevata se la patologia che si studia è poco frequente nella popolazione studiata. Di conseguenza, marcatori usati per individuare l'eccessivo consumo di alcol funzioneranno meglio (VPP più alto) negli studi su popolazioni selezionate ad alto rischio (per esempio guidatori ubriachi) che nella popolazione in generale. La sensibilità, specificità e valori predittivi dei marcatori biologici sono fortemente influenzati dal cut-off (livello decisionale) che è il limite scelto per distinguere tra un valore normale e uno patologico. Per esempio l'intervallo di riferimento può essere "aggiustato" per ottenere una più alta specificità del test, ma allo stesso tempo la sensibilità si riduce e viceversa.

Se un marcatore per l'alcol deve essere usato per uno screening generale o per la individuazione precoce di una ricaduta in relazione alla riabilitazione del paziente, allora questo deve essere molto sensibile. In contrasto se un risultato positivo può portare a sanzioni legali per l'individuo, come la perdita del lavoro o la revoca della patente di guida, il marcatore deve essere altamente specifico così da avere un basso rischio di ottenere falsi positivi.

BIOMARCATORI DI ABUSO ALCOLICO

Sono numerosi i test di laboratorio proposti per il riconoscimento dell'abuso alcolico sia acuto che cronico, alcuni di questi sono in uso da così tanto tempo da essere ormai considerati test tradizionali - γ GT, AST, ALT ed MCV, mentre alcuni sono stati introdotti più recentemente - transferrina carboidrato carente e etilglucuronide. Appunto questi ultimi saranno l'oggetto della rassegna.

Mentre l'EtG è un marcatore diretto dell'alcol, infatti si

forma per azione della UDP-glucuronosiltransferasi (UGT) sull'etanolo, la transferrina, nelle sue glicoforiche asialata e disialata viene sintetizzata maggiormente in presenza di elevate concentrazioni di etanolo e come tale rappresenta un marcatore indiretto.

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT)

La CDT è un marcatore di abuso alcolico cronico caratterizzato da una alta specificità^{4,9}. Stibler¹⁰ negli anni '70 per prima evidenziò che la quantità di glicoforiche desialate della transferrina nel liquor e nel siero aumentava in seguito ad una pesante assunzione di alcol. Ad oggi rimane ancora non completamente chiarito il meccanismo attraverso il quale l'alcol altera la sializzazione¹¹. La transferrina, principale proteina che veicola il ferro, sintetizzata e secreta dal fegato, ha una struttura a singola catena e presenta una microeterogeneità complessa. Ciò è dovuto alla possibilità di un differente carico dei siti che legano il metallo, alla complessità della catena glucidica, al numero di residui terminali di acido sialico legati alla catena dei glicani e all'esistenza di varianti genetiche della catena polipeptidica. L'eccessivo consumo di alcol può danneggiare la sintesi (incorporazione di residui di acido sialico), la secrezione e l'assemblaggio delle glicoproteine. La desializzazione della transferrina richiede quantità abbastanza elevate di etanolo in vivo, individui che hanno bevuto almeno 50-80 g di etanolo al giorno come media nelle 2 o più settimane trascorse spesso mostrano un aumento delle molecole di transferrina che hanno perso una (disialotransferrina) o entrambe (asialotransferrina) le catene oligosaccaridiche (Fig. 2). E' stato postulato che la sintesi della catena glucidica della transferrina può essere alterata dai metaboliti dell'etanolo che interferiscono nel processo degli enzimi transferasici, in particolare che l'etanolo o l'acetaldeide aumentano l'attività degli enzimi sialidasi che rimuovono i gruppi carboidrati dalla transferrina, alterando altresì la funzionalità dei recettori di diverse cellule epatiche con il risultato finale di avere un significativo aumento della concentrazione delle frazioni desializzate¹². La glicoforica della transferrina predominante, con oltre l'80% sia nella popolazione sana che negli alcolisti, è la tetrasialotransferrina¹³; le glicoforiche, dal punto di vista diagnostico più interessanti, sono senza dubbio la asialotransferrina e la disialotransferrina, entrambe aumentano negli alcolisti, mentre la asialotransferrina non è rilevabile negli astemi e nei bevitori moderati¹⁴. Pertanto il marcatore più sensibile resterebbe la disialotransferrina, anche se il più specifico è senz'altro l'asialotransferrina.

Incrementi della CDT si osservano anche nel siero di persone affette da malattie congenite della glicosazione (CDG)¹⁵, un disordine neurologico ereditario, estremamente raro, con ritardo mentale variabile, tuttavia lo spettro delle diverse glicoforiche è alquanto differente rispetto a quello di un bevitore pesante. E' ormai riconosciuto che il rischio di una non corretta determinazione della CDT dipende dalla scelta del metodo analitico^{16,17}, infatti oggi grazie all'utilizzo di tecniche separative ad alta prestazione viene facilmente individuata la presenza di interferenze. Nei dosaggi routinari della CDT nei laboratori vengono utilizzate procedure differenti che evidenziano glicoforiche

della transferrina diverse e quindi la frazione CDT refertata risulta diversa e metodo dipendente.

Il solo dosaggio immunologico oggi in commercio è un metodo diretto in cui l'anticorpo riconosce, almeno in teoria, la mancanza di una o di entrambi le catene glucidiche nel loro punto di attacco sulla catena proteica, pertanto l'anticorpo sembra reagire con la glicoforica asialo, monosialo e disialotransferrina e non essere influenzato da varianti genetiche. Questo metodo trova la sua più appropriata applicazione nei laboratori con alta produttività; la letteratura più recente¹⁸ ha evidenziato, attraverso uno specifico controllo di qualità svedese, come i diversi lotti di reagente abbiano nel tempo diminuito le loro prestazioni, tanto da indurre il produttore a consigliare, attraverso una nota tecnica¹⁹, un richiamo dei pazienti con CDT tra 2,0 e 2,5%. Questo programma svedese evidenzia che i dati provenienti da laboratori che utilizzano il metodo immunologico diretto costituiscono una popolazione a sé stante di dati, rispetto ai metodi separativi, quali HPLC ed elettroforesi capillare (dati non riportati). I metodi separativi, prima dell'analisi strumentale, richiedono sempre una preparazione del campione in cui la transferrina viene completamente saturata con cloruro ferrico e le lipoproteine precipitate. La delicatezza della preparazione e anche l'importanza del risultato rende necessaria la standardizzazione della misura della CDT.

Nell'ambito della *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) è stato costituito un gruppo di lavoro specifico *Standardization of CDT measurements* che ha definito²⁰

- la disialotransferrina come molecola di riferimento per la CDT,
- l'espressione del risultato come rapporto tra la somma della asialotransferrina e disialotransferrina rispetto alla transferrina totale (% CDT) per eliminare tutte le cause di aumento e diminuzione della transferrina che potrebbero falsamente influenzare il risultato
- la HPLC come metodo candidato ad essere metodo

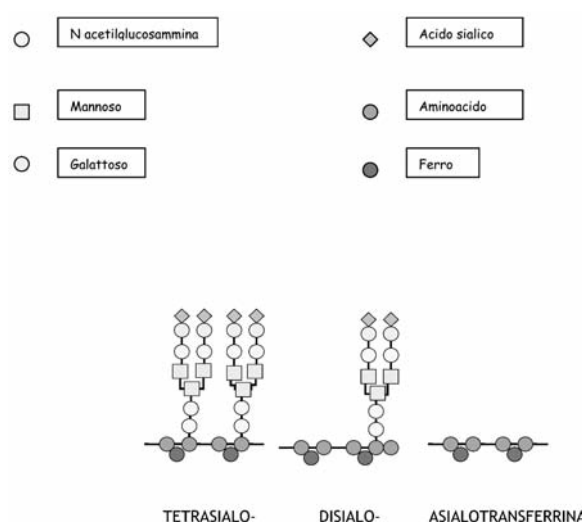


Figura 2

Glicoforiche della transferrina

La tetrasialotransferrina rappresenta la glicoforica normale più abbondante, la disialotransferrina e la asialotransferrina rappresentano le glicoforiche marker dell'abuso alcolico.

di riferimento in attesa che vengano sviluppati metodi in spettrometria di massa.

Nel passato la mancanza di una standardizzazione metodologica ha impedito una corretta determinazione della sensibilità e della specificità della CDT nelle sperimentazioni cliniche e ha generato conclusioni controverse quando la CDT veniva confrontata con altri marcatori. Per calcolare i parametri dell'efficienza diagnostica, il prerequisito richiesto è che si conosca con chiarezza ed attendibilità il consumo di alcol così da poter classificare i falsi positivi e i falsi negativi, ed inoltre è importante utilizzare metodi attendibili. E' noto che i metodi immunometrici potrebbe incorrere in errori dovuti ad una mancanza di standardizzazione dei lotti dei reagenti utilizzati. E' stato dimostrato che i parametri di efficienza diagnostica possono presentare variazioni anche del 12% quando si utilizzano metodi diversi per il dosaggio della CDT⁷. La specificità diagnostica della CDT varia dal 83.6 al 94.2% nell'uomo e dal 96.9 al 91.9% nella donna a seconda della presenza o meno di danno epatico. Di contro si osserva che per la GGT le specificità diagnostiche nell'uomo variano dal 36.1% al 24% e nella donna dal 36.6% al 50% rispettivamente con e senza danno epatico⁷. Da qui è chiaro che la CDT è un marcatore più specifico dell'abuso alcolico, anche se confrontata con la GGT.

Non c'è una comune opinione di quanto sia l'ammontare e lo schema di assunzione che è necessario per fare aumentare la CDT. Si crede che i livelli aumentino una volta che l'assunzione di alcol supera 50-80 g al giorno per 2 o 3 settimane, almeno in pazienti alcol dipendenti, sebbene altrove sia stato suggerito che un ammontare di 60 g o perfino 80 g di alcol al giorno non sono sufficienti a far aumentare i valori di CDT oltre ai limiti di riferimento nella popolazione in generale. Gli studi condotti da Anton e collaboratori²¹ in pazienti alcolisti hanno indicato che nel 30% dei casi in cui si ha incremento o decremento della %CDT, si hanno anche significative variazioni nel consumo di alcol. Uno dei vantaggi postulati della CDT rispetto ad gli altri marcatori è quello di non essere influenzata dalla presenza di malattie epatiche²² né dall'assunzione di farmaci²³.

In un lavoro²⁴ effettuato su oltre un migliaio di campioni provenienti da diverse parti del mondo in cui è stato misurato il corredo delle glicofornie con metodo HPLC, si è trovato che se la popolazione viene divisa, secondo precisi criteri, in tre gruppi: non-bevitori, bevitori moderati e pesanti bevitori (Tab. 1) si può osservare che l'asialotransferrina è presente nei bevitori moderati e pesanti e assente nei non-bevitori, che la disialotransferrina e la trisialotransferrina sono più alte nei bevitori moderati e

pesanti che nei non-bevitori, che la media della disialotransferrina aumenta passando dai non bevitori (1,14%) ai bevitori moderati (1,34%) ai forti bevitori (2,25%). Nelle popolazioni caucasiche la disialotransferrina aumenta dal non-bevitore al bevitore pesante, mentre nella popolazione asiatico-indiana e di etnia nera non c'è differenza tra non-bevitori e bevitori moderati, mentre la differenza è significativa tra moderati e pesanti bevitori. Non si osservano invece differenze statisticamente significative della CDT in funzione dell'età. Quando si definiscono i cut-off occorre tenere presente che le specifiche dei diversi metodi e kit sono differenti e quindi anche i valori decisionali sono metodo-dipendente, ogni laboratorio dovrebbe definire i propri cut-off su una popolazione con normali abitudini all'alcol, non astemia. Nel definire tale soglia bisogna sempre tenere conto anche dell'imprecisione del metodo utilizzato nel laboratorio per il dosaggio della CDT²⁵.

La CDT si dosa esclusivamente su siero e sono comunemente accettati cut-off di 1,8-2,0% per i metodi separativi e di 2,5% per metodi immunometrici²⁵. L'esperienza su pazienti ricoverati con diagnosi istologica di cirrosi alcolica, cirrosi biliare primaria, epatiti croniche, carcinoma epatico non ha evidenziato significativi aumenti della CDT se l'individuo non sta assumendo alcol (dati non riportati).

ETILGLUCURONIDE (EtG)

Nel 1901 Neubauer descrisse per la prima volta un meccanismo detossificante di eliminazione dell'alcol attraverso la coniugazione con acido glucuronico attivato e nel 1952 l'EtG fu isolato da Kamil e altri come triacetil-metil-estere dalle urine di coniglio^{26,27}. L'EtG è un metabolita minore del meccanismo di metabolizzazione dell'etanolo nell'uomo²⁸, è un prodotto di coniugazione dell'etanolo (in media < 0,1%) che si forma per reazione con l'acido glucuronico attivato. Questo enzima microsomiale esiste come superfamiglia di enzimi e ne è stato descritto un polimorfismo genetico per sei dei 16 geni umani²⁹. Le varianti polimorfiche nei geni che codificano l'UTG possono avere un impatto significativo sulla capacità degli esseri umani a sintetizzare EtG e possono contribuire a spiegare le differenze interindividuali nel livello di EtG dopo consumo alcolico. L'EtG è presente nei vari fluidi biologici, tessuti e capelli³⁰, recentemente è stato trovato anche nel meconio³¹ e nei fluidi di un uomo esumato, morto 27 anni prima³²; è solubile in acqua, è un metabolita diretto dell'alcol etilico e come tale viene considerato altamente specifico per la valutazione dell'assunzione di alcol³³. Ha il vantaggio di essere presente nelle urine dopo 40- 60 ore e nel sangue dopo 14 ore dall'assunzione alcolica: questo

Tabella 1
Classificazione e criteri di classificazione dei bevitori

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

intervallo temporale è funzione della quantità di alcol assunta³⁴. L'EtG viene normalmente misurato nelle urine perché queste sono di più facile raccolta. Soluzioni acquose contenenti EtG e soluzioni di EtG in urine a differenti pH, conservate a temperatura differente per alcuni giorni, anche dopo successivi cicli di congelamento e scongelamento, non hanno evidenziato degradazioni significative³⁵, mentre urine contaminate con batteri quali *Escherichia coli*, che ha attività glucuronidasi, possono presentare concentrazioni di EtG falsamente basse in quanto tali batteri liberano il residuo glucuronico dall'etanolo. Viceversa in presenza di *E. coli* ed etanolo si può avere neoformazione di EtG³⁶, inoltre l'uso di colluttori, prodotti igienici per il lavaggio delle mani, cibi cotti nel vino e birra analcolica possono portare a risultati falsamente positivi^{37,38}. E' stato anche dimostrato che la diuresi forzata diminuisce la concentrazione di EtG nelle urine³⁵.

La gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (GC-MS)³⁹ con standard deuterato è stato il primo metodo utilizzato per dosare l'EtG, più tardi si è utilizzata la LC/MS e la LC-MS-MS^{40,41} poiché permette di raggiungere sensibilità più basse e come tale può essere utilizzata anche su matrici biologiche non convenzionali quali capello o meconio. Recentemente è stata messa a punto, e commercializzata, una metodica immunometrica che utilizza anticorpi monoclonali. Il saggio si basa sulla competizione, nei confronti dell'anticorpo anti- EtG, tra EtG marcato con G6PDH e EtG contenuto nel campione di urine. Se l'EtG è presente nelle urine, esso si lega all'anticorpo anti-EtG, determinando un aumento dell'attività enzimatica della G6PDH proporzionale alla concentrazione di EtG presente nelle urine. La rilevazione avviene accoppiando l'ossidazione della coppia NAD⁺/NADH, il G6PDH riduce il NAD⁺ a NADH con aumento dell'assorbimento a 340 nm.

La sensibilità dichiarata è di circa 0,1 mg/L, la metodica è stata validata per campioni urinari ed i risultati ottenuti evidenziano un'ottima correlazione con il metodo di riferimento (LC/MS)⁴². La metodica immunometrica presenta quale criticità maggiore un'alta densità ottica al momento della miscelazione del campione con i reattivi. Questo porta inevitabilmente a dover ripetere la determinazione di un numero considerevole di campioni dopo averli diluiti⁴². Per ovviare a questo problema alcuni autori hanno introdotto una modifica del metodo originario, in questo modo la ripetizione della misura su campione diluito è passata dal 20% a meno di 5%⁴³.

Quando il dosaggio dell'EtG viene utilizzato per scopi tossicologico-forensi e amministrativi si raccomanda di confermare tutti i risultati positivi con tecnica di spettrometria di massa^{44,45} anche alla luce di una recente pubblicazione in cui gli autori evidenziano una elevata reattività crociata tra EtG e triclolo-EtG⁴⁶ in paziente che assumeva cloralio idrato.

Poiché la quantità di EtG nelle urine dipende dalla quantità di acqua assunta è raccomandabile esprimere l'EtG come rapporto rispetto alla creatinina, anche se si potrebbero utilizzare altri parametri per misurare la diluizione, quali osmolalità o densità. Per quel che riguarda il cut-off, non esiste una soglia comunemente accettata, la letteratura propone come miglior compromesso per ottenere la massima sensibilità, ed evitare risultati positivi per esposizione non intenzionale di alcol, il valore soglia urina-

rio di 0,5 mg/L⁴². Ci sono infatti evidenze che l'esposizione accidentale ad alcol (es. l'utilizzo di colluttori) possa contribuire valori di EtG pari a 0,37 mg/L nelle urine⁴⁷.

Poiché l'enzima che catalizza la glucuronazione dell'etanolo presenta un polimorfismo genetico, la popolazione generale non ha un comportamento univoco, è stato stimato che il 60% degli individui è *high responders* mentre il 40% *low responder*. Non si hanno ancora cut-off validati per la popolazione italiana.

Sebbene l'EtG sia il metabolita diretto dell'etanolo più studiato per scopi clinici, molti sono gli aspetti che devono ancora essere chiariti. I parametri che influenzano significativamente i livelli di EtG nelle urine sono età, sesso, uso di Cannabis, patologie renali, quantità di etanolo consumata nell'ultimo mese, mentre etnia, BMI, fumo, cirrosi epatica non influenzerebbero il livello di EtG urinario⁴⁸. Per quel che riguarda sensibilità e specificità, a seconda della popolazione presa in esame, del consumo alcolico e delle modalità di determinazione la sensibilità varia da 83.5 a 90.8% e la specificità da 68.3 a 76.5%⁴⁸. Gli stessi autori enfatizzano la capacità dell'EtG di distinguere tra bevitori sociali (non bevitori e bevitori moderati) e pericolosi (pesanti bevitori che necessitano di trattamento) se il consumo di etanolo è molto recente (entro le 24 ore).

EtG in altre matrici biologiche

Numerose pubblicazioni riportano metodi accurati per il dosaggio dell'EtG in matrici biologiche alternative^{21,49}. Particolarmente interessante l'uso dei capelli per la determinazione dell'abuso alcolico pregresso che troverebbe applicazione nei casi di rilevanza amministrativo-forense e l'uso del meconio quale marcatore di esposizione cronica di alcol in utero.

CONCLUSIONI

I marcatori di stato dell'uso e dell'abuso alcolico sono un modo diretto e indiretto per stimare la quantità di alcol consumato e la modalità dell'assunzione. Il numero di marcatori biochimici dell'alcol è elevato e anche per quelli di più recente introduzione, quali CDT ed EtG, ne sono ben documentate le applicazioni sia in ambito clinico che forense. Si raccomanda sempre l'uso accoppiato di CDT su siero ed EtG su urine con protocolli adeguati, ad esempio EtG a giorni alterni e CDT all'inizio e dopo 15 giorni. Quando questi biomarcatori vengono usati in modo appropriato, migliorano le conoscenze sulle abitudini verso l'alcol e rappresentano una metodologia di valutazione oggettiva del trattamento di cura.

BIBLIOGRAFIA

1. **Room R, Babor T, Rehm J.** Alcohol and public health. *Lancet* 2005;365:519-30
2. **Leon DA, Mc Cambridge J.** Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2002: an analysis of routine data. *Lancet* 2006;367:52-6
3. **Allen JP, Litten RZ.** Recommendations on use of biomarkers in alcoholism treatment trials. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:1667-70

4. **Cherpitel CJ.** Violent crime: the role of alcohol and new approaches to the prevention of injury. *Alcohol Alcohol* 1997;13:105-18
5. **Niemelä O.** Serum diagnosis of alcoholic liver disease and markers of ethanol intake, in : Sherman DIN, Preedy V (eds). *Ethanol and the liver*. 1th. Edition. Taylor and Francis, New York 2002;441-9
6. **D'Onofrio G, Degutis LC.** Preventive care in the emergency department: screening and brief intervention for alcohol problems in the emergency department: a systematic review. *Acad Emerg Med* 2002;9:627-38
7. **Helander A.** Biological markers in alcoholism. *Neural Trasm Suppl* 2003;15-32
8. **Zweig MH, Campell G.** Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 1993; 39: 561-7
9. **Scouller K, Conigrave KM, Macaskill P et al.** Should we use carbohydrate-deficient transferrin instead of gamma-glutamyltransferase for detecting problem drinkers? A systematic review and meta-analysis. *Clin Chem* 2000;46:1894-902
10. **Stibler H.** Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem* 1991;37:2029-37
11. **Salaspuro M.** Carbohydrate-deficient transferrin as compared to other markers of alcoholism: a systematic review. *Alcohol* 1999;19:261-71
12. **Sillanaukee P, Strid N, Allen JP et al.** Possible reasons why heavy drinking increases carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Clin Exp Res* 2001;25:34-40
13. **Legros FJ, Nuyens V, Minet E et al.** Carbohydrate-deficient transferrin isoforms measured by capillary zone electrophoresis for detection of alcohol abuse. *Clin Chem* 2002;48:2177-86
14. **Legros FJ, Nuyens V, Baudoux M et al.** Use of capillary zone electrophoresis for differentiating excessive from moderate alcohol consumption. *Clin Chem* 2003; 49:440-9
15. **Helander A, Eriksson G, Stibler H et al.** Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse. *Clin Chem* 2001; 47: 1225-33
16. **Bianchi V, Arfini C, Helander A.** Carbohydrate-deficient Transferrin (CDT) in Italy. *Clin. Chem Med Lab* 2008;46:1759-62
17. **Bianchi V, Arfini C.** L'immunosottrazione come tecnica di conferma delle glicoforme atipiche della transferrina desialate. *JCLA* 2006;29:111-4
18. **Helander A, Nordin G.** Insufficient standardization of a direct carbohydrate-deficient transferrin immunoassay. *Clin Chem* 2008;54:1090-1
19. Dade Behring GmbH Urgent Field Safety Note BR-040008 2008-04-01
20. **Jeppsson J-O, Arndt T, Schellenberg F 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
21. **Anton RF, Lieber C, Tabakoff B.** Carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase for the detection and monitoring of alcohol use: results from a multisided study. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26:1215-22
22. **Lawlor DA, Sattar N, Smith GD et al.** The associations of physical activity and adiposity with alanine aminotransferase and gamma-glutamyltransferase. *Am J Epidemiol* 2005;161:1081-8
23. **Fleming MF, Anton RF, Spies CD.** A review of genetic, biological, pharmacological, and clinical factors that affect carbohydrate-deficient transferrin levels. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1347-55
24. **Bergström JP, Helander A.** Influence of alcohol use, ethnicity, age, gender, BMI and smoking on the serum transferrin glycoform pattern: implications for use of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as alcohol biomarker. *Clin Chim Acta* 2007 doi: 10.1016/j.cca.2007.10.011
25. **Bianchi V, Arfini C, Helander A.** Suggestions carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurement in forensic use and a traffic safety context. *Clin Chem Med Lab* 2007;45:A161
26. **Neubauer O.** Ueber Glucuronsäurepaarung bei Stoffen der Fettreihe. *Archiv für Experimentelle und Pathologische Pharmakologie* 1901;46:133-54.
27. **Kamil IA, Smith JN, Williams RT.** A new aspect of ethanol metabolism: isolation of ethyl-glucuronide. *Biochemical J* 1952;51:32-3.
28. **Besserer K, Schmidt V.** Ein Beitrag zur renalen Ausscheidung von Äthylglucuronid nach oraler Alkoholaufnahme (A contribution on the renal excretion of ethyl glucuronide following oral ethanol intake). *Zentralblatt für Rechtsmedizin* 1983;25:369.
29. **Miners JO, McKinnon RA.** Genetic polymorphisms of UDP glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology* 2002;181:453-6.
30. **Wurst FM, Skipper GE, Weinmann W.** Ethyl glucuronide the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* 2003;98 suppl 2: 51-61.
31. **Morini L, Marchei E, Pellegini M et al.** Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for measurement of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium: new biomarkers of gestational ethanol exposure? *Ther Drug Monit* 2008;30:725-32.
32. **Politi L, Morini L, Mari F et al.** EtG and EtS in autopsy samples 27 years after death. *Int J Legal Med* 2008; 122:507-9.
33. **Dahl H, Stephanson N, Helander A.** Comparison of urinary excretion of ethanol and ethyl glucuronide. *J Anal Tox* 2002;26:201-4.
34. **Halter CC, Dresen S, Auwaerter V et al.** Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulphate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med* 2008;122:123-8

35. **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; 53:1-3.
36. **Helander A, Dahl H.** Urinary trait infection. A risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem* 2005;51:1728-30.
37. **Baranowski S, Serr A, Thierauf A et al.** In vitro study of bacterial degradation of ethylglucuronide and ethylsulfate. *Int J Legal Med* 2008;122:389-93
38. **Constantino A, Di Gregorio J, Korn W et al.** The effect of the use of mouthwash on ethyl glucuronide concentrations in urine. *J Anal Tox* 2006;30:659-62.
39. **Wurst FM, Kempfer C, Seidl S et al.** Ethyl glucuronide- a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcohol* 1999;34:71-7.
40. **Stephanson N, Dahl H, Helander A et al.** Direct quantification of ethyl glucuronide in Clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Therap Drug Monit* 2002;24:645-51.
41. **Politi L, Morini L, Groppi A et al.** Direct determination of ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:1321-31.
42. **Bottcher M, Beck O, Helander A.** Evaluation of new immunoassay for urinary EtG testing. *Alcohol Alcohol* 2008;43:46-8
43. **Bianchi V, Piccinini S, Raspagni A et al.** Determinazione dell'Etilglucuronide (EtG) nelle urine su piattaforma ADVIA 2400©. *Biochimica Clinica* 2009; 33:245-8
44. **Bianchi V, Raspagni A, Arfini C.** Vecchi e nuovi marcatori di abuso alcolico nelle matrici biologiche convenzionali. Ananke, Ed Torino 2008
45. **Bianchi V, Raspagni A, Arfini C.** Etilglucuronide : un vecchio e nuovo marcatore di uso recente di alcool. *Biochimica* 2009;3:183-7
46. **Ardnt T, Gierden B, Gussregen B et al.** False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening associated with chloral hydrate medication as confirmed by LC-MS/MS and self medication. *Forensic Sci Int*, dic 2008
47. **Halter C, Bunz SC, Politi L et al.** Even small amounts of ethanol cause positive Ethyl glucuronide results in urine. TIAFT 2007 Seattle (USA) Conference Abstract Poster 118 pag 176
48. **Wurst FM, Wiesbeck GA, Metzger JW et al.** On sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in Urine— Results From the WHO/ISBRA Study. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1220–8.
49. **Morini L, Politi L, Groppi A, et al.** Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2006;41:34-42

Per corrispondenza:

Dott.ssa Vincenza Bianchi
Laboratorio di Tossicologia
Azienda Sanitaria Ospedaliera
"SS Antonio e Biagio e C. Arrigo"
Via Venezia 16 - 15100 Alessandria
Tel.: 0131 206214 - Fax: 0131 206075
e-mail: vbianchi@ospedale.al.it