

Etilglucuronide ed Etilsolfato nella Diagnosi di Abuso Alcolico

Aldo Poletti

*Dipartimento di Medicina Legale e Sanità Pubblica,
Università di Pavia*

Indicatori utilizzati nella diagnosi di abuso alcolico

- Intervista al paziente
- Alcolemia, alcoluria
- Enzimi epatici (GGT, SGOT, SGPT)
- Volume Corpuscolare Medio (MCV)
- Apolipoproteina J
- Acido Sialico Totale
- β -esosaminidasi sierica (β -HEX)
- 5-idrossitriptofolo (5-HTOL)
- Fosfatidiletanolo (PEth)
- Esteri etilici degli acidi grassi (FAEE)
- Transferrina Carboidrato Carente (CDT)

CDT: sensibilità e specificità

- Interferiscono con CDT (o interferiscono i farmaci utilizzati nel trattamento):
 - varianti genetiche della transferrina D
 - *congenital disorder of glycosylation syndrome*
 - cirrosi biliare primaria
 - carcinoma epatico
 - cirrosi epatica virale
 - trapianto di pancreas e rene
 - gravidanza
 - uso di estrogeni o di anti-epilettici

CDT: sensibilità e specificità

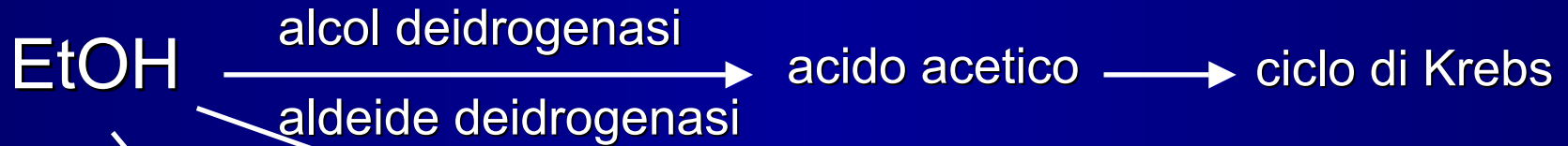
- WHO/ISBRA Collaborative Study:

	Uomini	Donne
Sensibilità (SE)	60%	29%
Specificità (SP)	92%	92%

rispetto alla testimonianza verbale

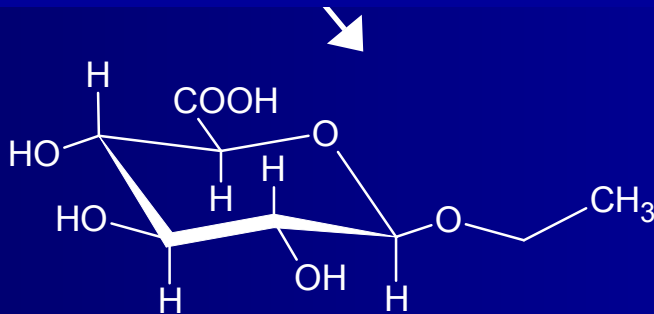
- Molti falsi negativi (\downarrow SE), pochi falsi positivi (\uparrow SP)
- Soggetti sotto i 20 anni non presentano livelli elevati di CDT
- Soggetti BMI basso ($< 20 \text{ kg/m}^2$) hanno elevati livelli di CDT

Etilglucuronide e etilsolfato



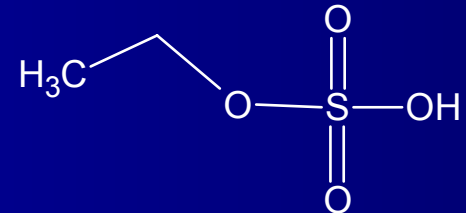
UDP-glucuronosiltrasferasi

solfotrasferasi



β -D-etilglucuronide (EtG)

$C_8H_{14}O_7$ (222.1945)



etilsolfato (EtS)

$C_2H_6O_4S$ (126.1313)

Complessivamente <1% della dose di alcol

Etilglucuronide e etilsolfato

Diagnosi di Abuso Alcolico

- *Marker diretti* dell'etanolo: la loro presenza in campione biologico attesta indiscutibilmente l'esposizione all'alcol
- Elevata specificità diagnostica
- Indicatori di abuso alcolico a breve (sangue), medio (urina) e lungo termine (capelli)

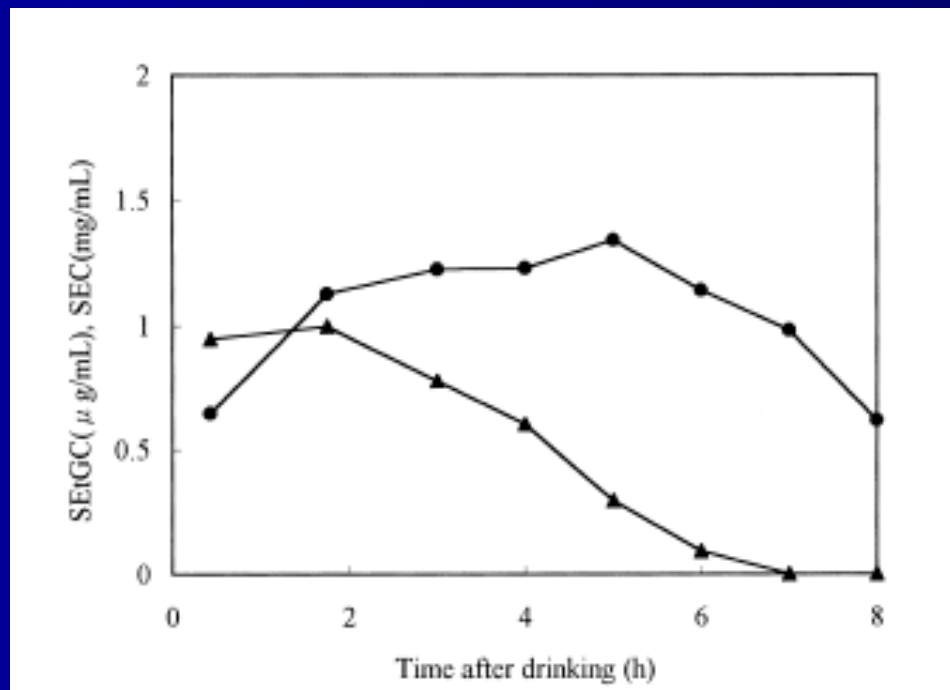
EtG/EtS nel siero: perché?

EtG: picco plasmatico
2-3.5 ore dopo EtOH

EtG: rilevabile nel siero
per almeno 8 ore dopo
l'eliminazione di EtOH



- Prelievo ematico ritardato nel tempo (es: pirata della strada)



Nishikawa *et al.*, *J Chromatogr B*, 1999

EtG: determinazione nel siero

Autore (anno)	Preparazione	Metodo (ioni/transiz)	LLOQ (mg/l)	Validazione
Schmitt (1997)	deprotein/ evap/deriv	GC-MS (4)	0.2	Parziale
Nishikawa (1999)	deprotein/evap/ ricostituz	LC-MS-MS (1)	0.03	No
Zimmer (2002)	deprotein/evap/ deriv	GC-MS (4)	0.25	No
Janda (2001)	deprot/SPE(SAX) /evap/deriv	GC-MS (3)	0.17	Si
Křivánková (2005)		CZE	0.1	No
Nostro metodo	deprotein/ diluizione	LC-MS-MS (3)	0.05	Si

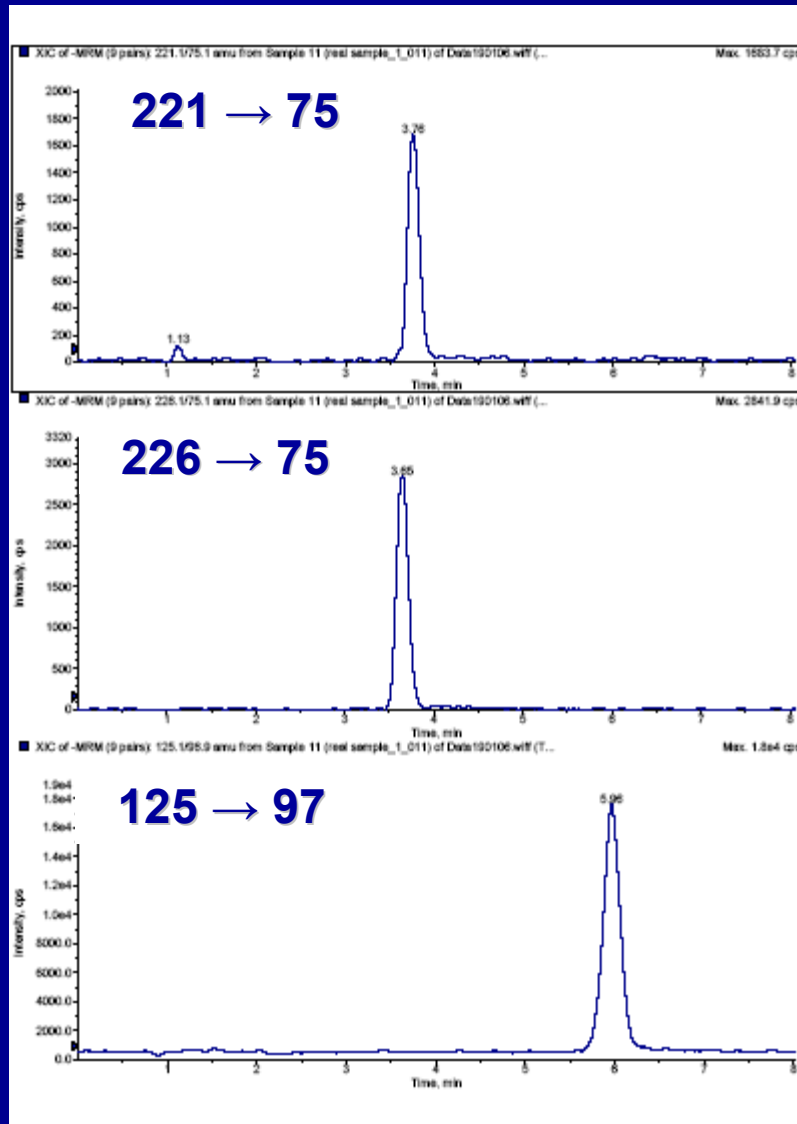
Determinazione anche di EtS

EtG/EtS: campioni reali di siero

EtG 0,22 mg/l

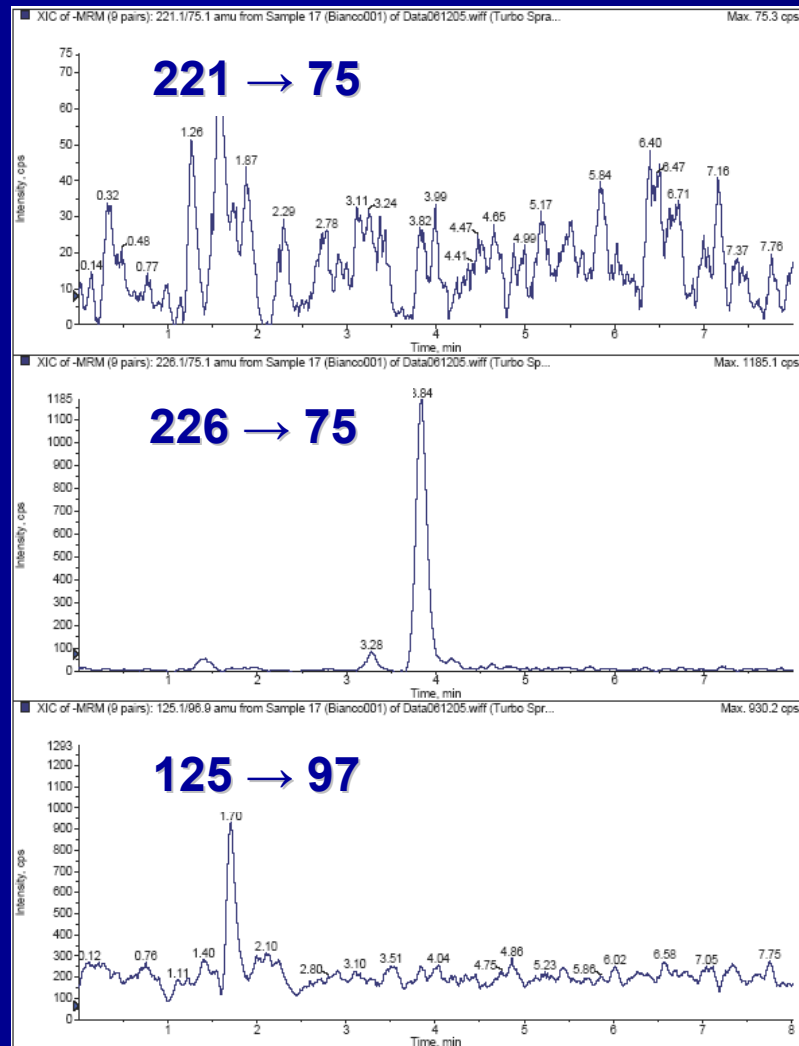
EtS 0,14 mg/l

EtOH 0,20 g/l



EtG/EtS: campioni reali di siero

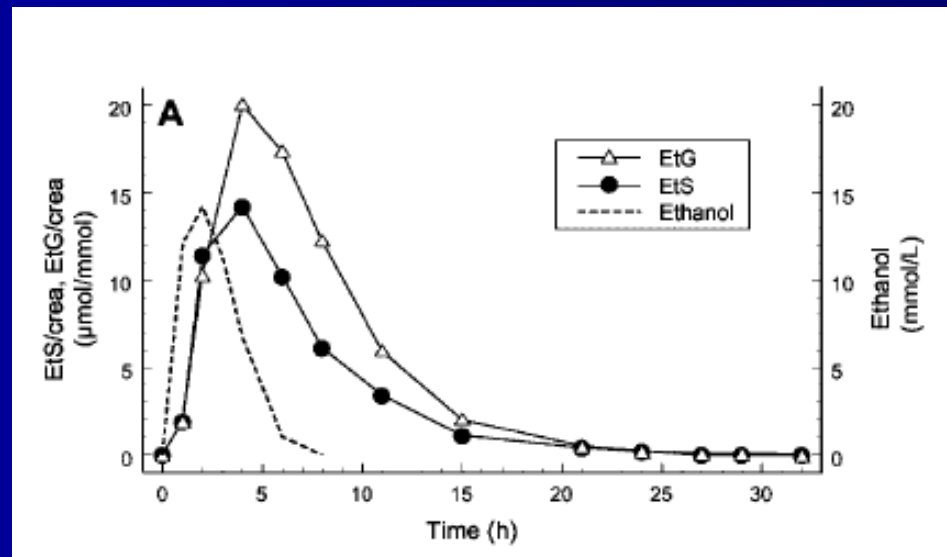
Soggetto fermato
6 ore dopo avere
causato un
incidente



EtG/EtS nell'urina: perché?

EtG: ritrovato nell'urina fino a 80 ore dall'assunzione

EtS: almeno fino a 30 ore



Helander e Beck, *Clin Chem*, 2004

- Monitoraggio di alcolisti e TDP in trattamento (rispetto del contratto terapeutico)
- Diagnosi tardiva di *Binge Drinking* (es. week-end)
- Discriminazione di contaminazione (es. disinfettante)
- Discriminazione di produzione *in vitro* di EtOH

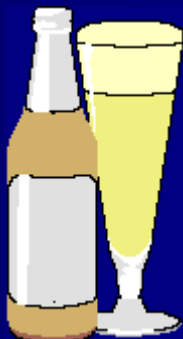
EtG/EtS in vino e birra



8 vini

EtG: 0.15 - 3.97 mg/l

EtS: 0.21 - 39.14 mg/l



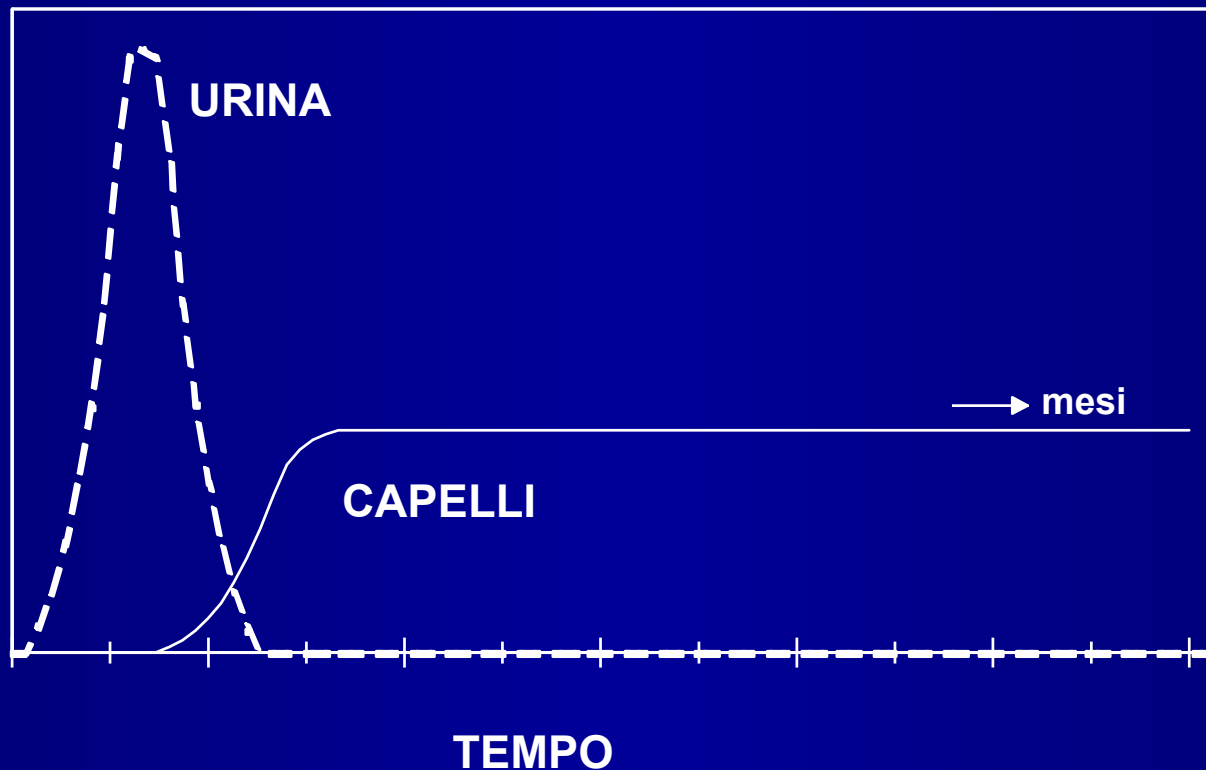
6 birre

EtG: < LOD

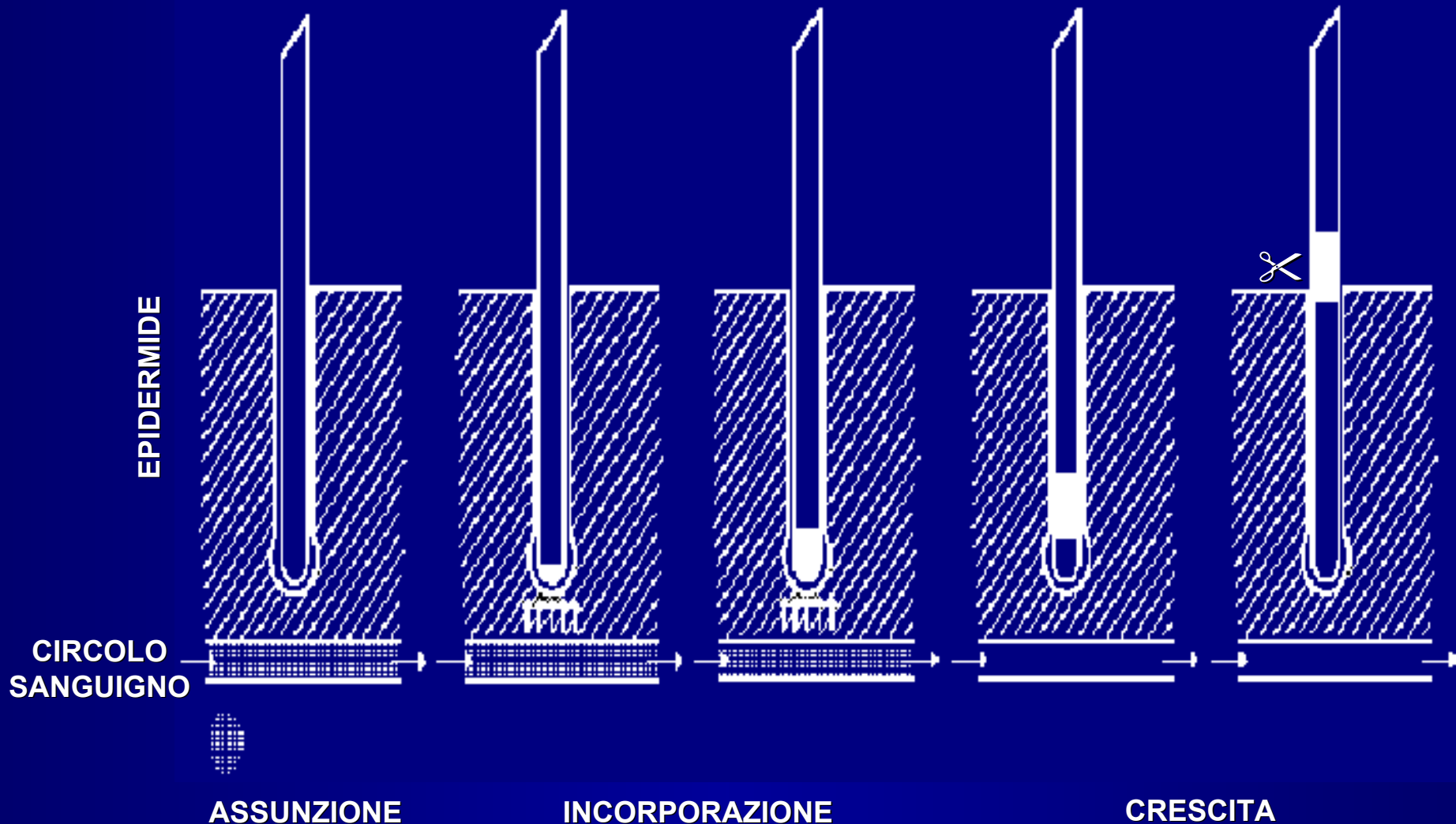
EtS: < LOD

Analisi del capello: perchè?

Finestra di sorveglianza molto più ampia



Analisi del capello: incorporazione



Vantaggi pratici dei capelli

- prelievo di facile esecuzione
- non invasivo
- non produce inestetismi
- nessuna violazione della privacy
- matrice biologica relativamente stabile
- trasporto e conservazione semplici e di costo contenuto

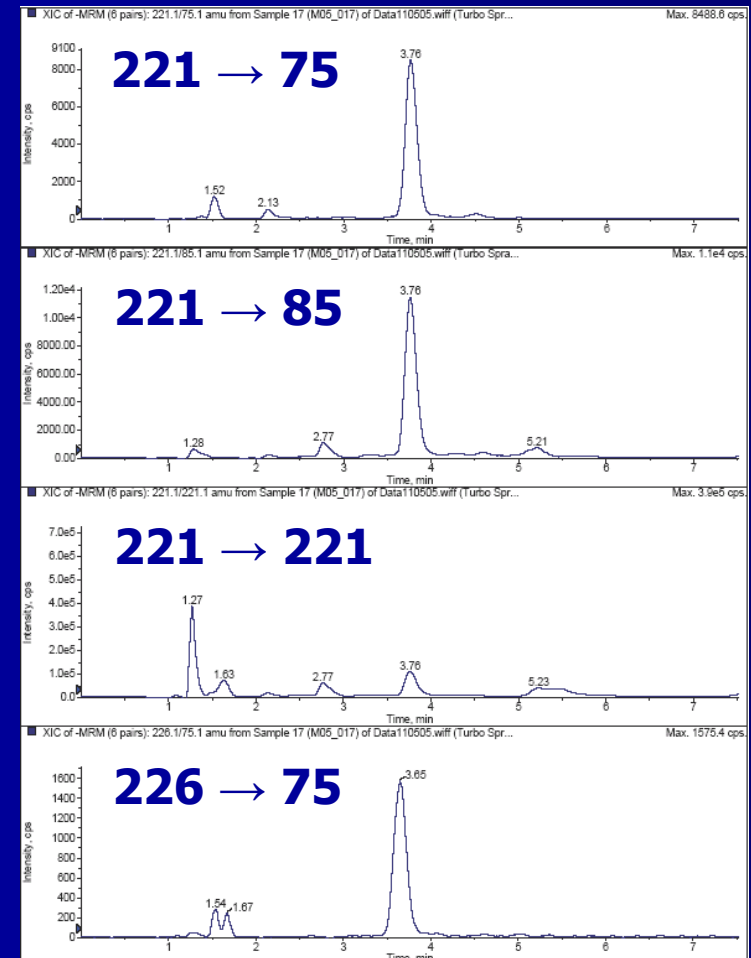
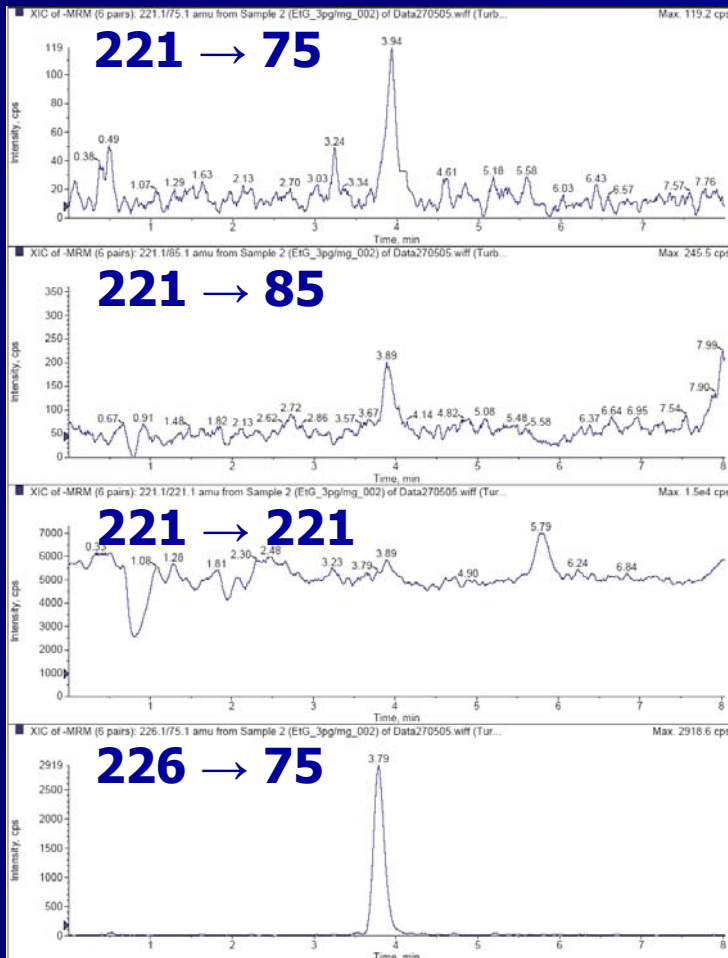
EtG: determinazione nei capelli

Autore (anno)	Preparazione	Metodo (ion/trans)	LLOQ (pg/mg)	Validazione
Alt (2000)	sonic/evap/ deriv	GC-MS (3)	n.r.	No
Skopp (2000)	incub/sonic/ evap/deriv	GC-MS (4)	5000	Parziale
Jurado (2004)	sonic/incub/ evap/deriv	GC-MS (3)	50	Parziale
Yegles (2004)	sonic/SPE/ evap/deriv	GC-MS (2)	4	Parziale
Janda (2002)	sonic/SPE/ evap	LC-MS-MS (1)	102	Parziale
Morini (2006)	incub/sonic	LC-MS-MS (3)	3	Completa

EtG: campioni reali di capello

Spike: 3 pg/mg (LLOQ)

EtG: 434 pg/mg



EtG nel capello: risultati

- A. 22 alcolisti all'inizio della terapia in reparto ospedaliero
- B. 21 volontari (uso di alcol dichiarato: 4-60 g/die)
- C. 7 astemi (di cui 2 bambini)
- D. Utilizzatori abituali di cocaina:
 - positivi (n=26)
 - negativi (n=17)per **cocaetilene** nei capelli (GC-MS, LLOQ=100 pg/mg, *cutoff*: 200 pg/mg)

Gruppo A: alcolisti cronici

- 21 campioni positivi per EtG su 22

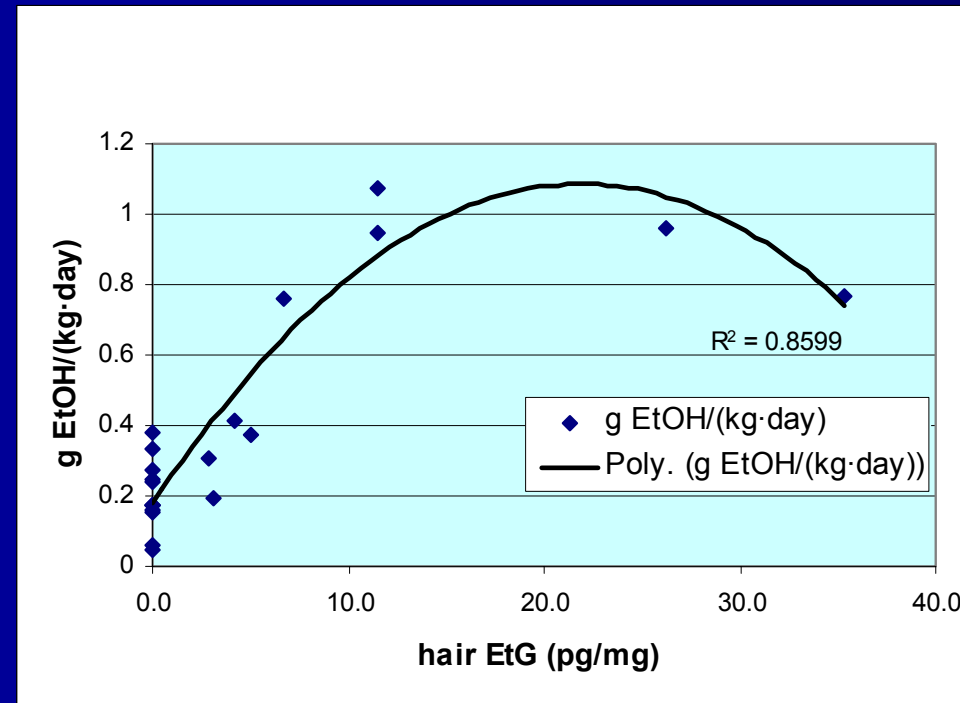
EtG range: 4.0-434.7 pg/mg

mediana: 39.3 pg/mg

- 1 campione negativo per EtG (6 settimane di astinenza prima dell'ospedalizzazione)

Gruppo B: volontari (4-60 g EtOH/*die*)

- 7 positivi per EtG
- 14 negativi per EtG
- Buona correlazione EtG vs EtOH/(Kg·*die*)
- > 30 g EtOH/*die*
EtG range:
4.2-35.4 pg/mg
mediana: 11.5 pg/mg



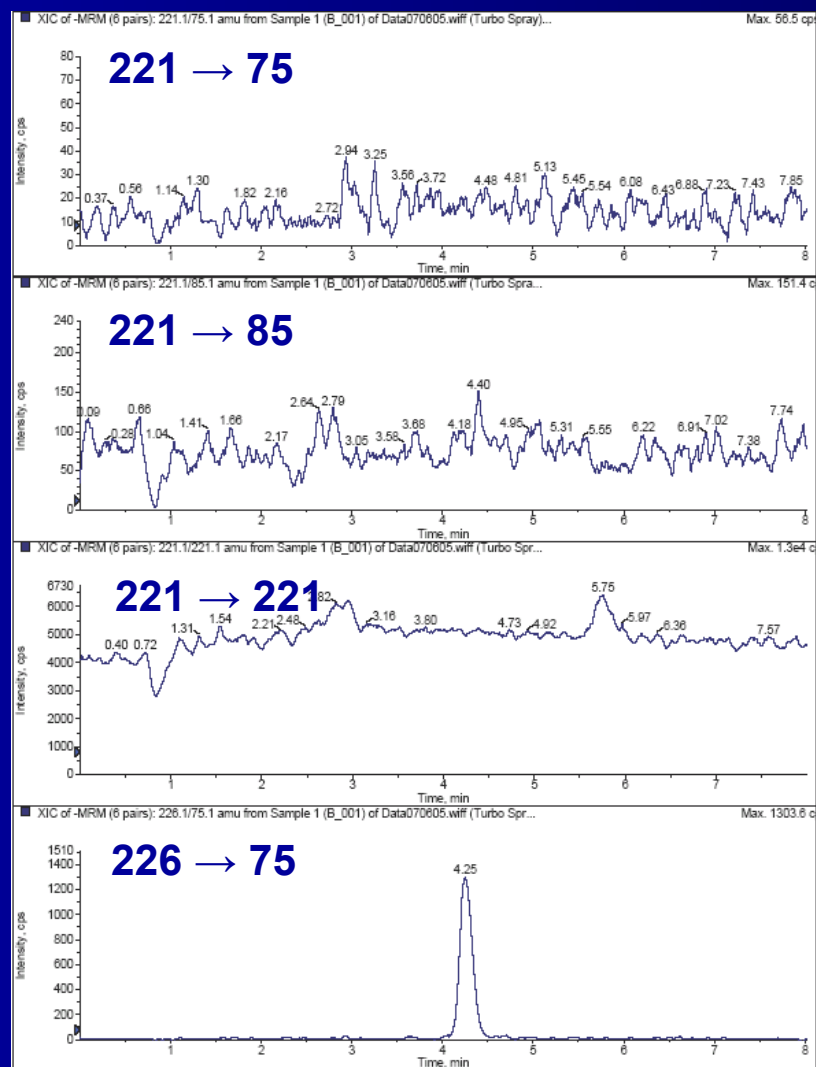
EtG quale *marker* di uso “non moderato” di EtOH

- EtG cutoff: 4 pg/mg

	EtOH > 30 g/die	EtOH ≤ 30 g/die
EtG +	6	1
EtG -	0	14
Total	6	15

Gruppo C: astemi

- Tutti negativi per EtG



Confronto

Gruppo	No. soggetti	Range (pg/mg)	Mediana (pg/mg)
Alcolisti	22	4.0 - 434.7	39.3
Volontari > 30 g/die	6	4.2 - 35.4	11.5
Volontari ≤ 30 g/die	15	<LOD - 5.1*	-
Astemi	7	<LOD	-

* 12 su 15 < LOD, 1 tra LOD e LLOQ, 1 tra LLOQ e *cutoff*, 1 > *cutoff*

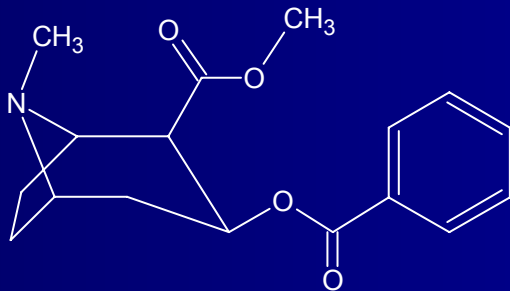
Gruppo D: utilizzatori di cocaina



+



carbossilesterasi



COCAETILENE (CE)

17% circa della
cocaina assunta

EtG vs CE come *marker* di abuso

- EtG cutoff: 4 pg/mg
- CE cutoff: 200 pg/mg

	CE +	CE -
EtG +	24	5*
EtG -	2	12
Totale	26	17

* Uso non concomitante di cocaina e EtOH?

Confronto EtG vs. CDT

Studio in collaborazione con l'ASL della Provincia di Pavia (Dr. San Bartolomeo, Dr. Perotti) e con l'Unità di Riabilitazione Alcolologica della Fondazione Maugeri (Dr. Vittadini)

Confronto effettuato su un gruppo di volontari sani (n=10) e su un gruppo di alcolisti all'inizio di un trattamento *in-patient* o *out-patient* di detossificazione (n= 14).

Tutti i partecipanti hanno fornito il loro consenso informato

Confronto EtG vs. CDT

Prelievo di capelli (n=22, 3-cm prossimali)

Prelievo di siero (n=17)

Somministrazione di un questionario anonimo (n=22) volto a stimare il consumo giornaliero di alcol (EDI) nelle 2 settimane e nei 3 mesi precedenti il prelievo.

Calcolo della Sensibilità (SE, proporzione di veri positivi) e della Specificità (SP, proporzione di veri negativi) nella **diagnosi di consumo elevato (>60 g/die)**

Confronto EtG vs. CDT

Confronto CDT (2.5%) e EDI
negli **ultimi 3 mesi (o due settimane)**

	EDI<60g	EDI>60g
CDT +	0	3
CDT -	8	4
Totale	8	7

SE= 0,42 (TP 3/7)

SP= 1,00 (TN 8/8)

Confronto EtG vs. CDT

Confronto CDT (2.0%) e EDI
negli **ultimi 3 mesi (o due settimane)**

	EDI<60g	EDI>60g
CDT +	2	4
CDT -	6	3
Totale	8	7

SE= 0,57 (TP 4/7)

SP= 0,75 (TN 6/8)

Confronto EtG vs. CDT

Confronto EtG (30 pg/mg) e EDI
negli **ultimi 3 mesi**

	EDI<60g	EDI>60g
EtG +	0	9
EtG -	9	2
Totale	9	11

SE= 0,82 (TP 9/11)

SP= 1,00 (TN 9/9)

Confronto EtG vs. CDT

Confronto EtG (30 pg/mg) e EDI
nelle **ultime 2 settimane**

	EDI<60g	EDI>60g
EtG +	1	8
EtG -	10	1
Totale	11	9

SE= 0,89 (TP 8/9)

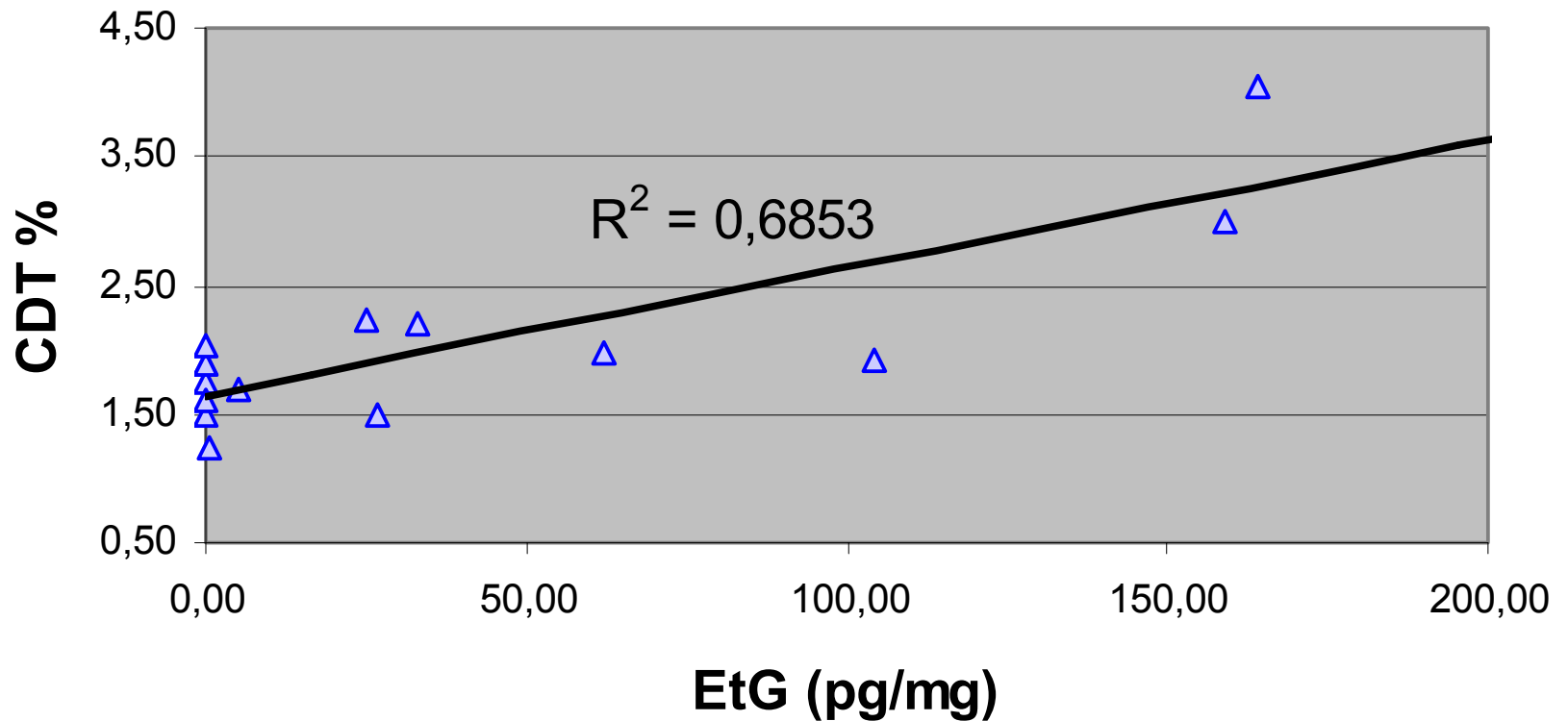
SP= 0,91 (TN 10/11)

Confronto EtG vs. CDT

L'EtG nei capelli ha confermato
tutti i casi CDT positivi (2,5%)

Confronto EtG vs. CDT

ETG vs. CDT



EtG e Bias Razziale

La concentrazione di EtG nei capelli non è correlata con il contenuto di melanina

(BMP Appenzeller et al., SOHT Meeting, 2006)

Conclusioni (1)

- Nel capello:
 - correlazione consumo EtOH/EtG nel capello
 - discriminazione di consumo superiore a 60 *g/die*
 - Elevata specificità di diagnosi
 - Sensibilità >> CDT
 - buona correlazione con cocaetilene in utilizzatori di cocaina

Conclusioni (2)

- Nell'urina: evidenza del consumo di EtOH fino a 80 ore dall'assunzione
- Nel siero: rilievo dell'assunzione di EtOH anche con prelievo ritardato