



Titolo: Identificazione precoce dell'abuso di alcol: utilizzo dei biomarcatori emergenti in differenti matrici biologiche

Autori: Bianchi V.*, Arfini C.;¹

Tipo: Research Reviews

Keywords: abuso alcolico, transferrina carboidrato carente, etilglucuronide, fosfatidiletanolo, esteri etilici degli acidi grassi;

Abstract

Scopo: Questa rassegna illustra alcuni biomarcatori emergenti misurabili in diverse matrici biologiche che possono permettere l'individuazione precoce dell'abuso alcolico;

Metodologia: vengono considerati i biomarcatori più attuali transferrina carboidrato carente (CDT), etilglucuronide (EtG), fosfatidiletanolo (PEth) e gli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE) e la loro determinazione nelle diverse matrici biologiche così come è riportato nella più recente letteratura;

Risultati: sono descritte alcune situazioni reali ed è suggerita l'interpretazione dei risultati.

Conclusioni: la rassegna fornisce suggerimenti e indicazioni per il corretto uso dei biomarcatori descritti alla luce delle conoscenze e delle applicazioni cliniche e forensi.

¹ S.C. LABORATORIO ANALISI
Laboratorio di Riferimento Regionale di Tossicologia
A.O. "SS Antonio e Biagio e C Arrigo"
Tel +39.0131.206214
E-mail vbianchi@ospedale.al.it
* Autore per la corrispondenza



Title: Early detection of alcohol abuse: the use of emerging biomarkers in different biological materials.

Authors: Bianchi V. *, Arfini C.;²

Type: Research Reviews

Key words: alcohol abuse, carbohydrate.-deficient transferrin, ethylglucuronide, phosphatidyl ethanol, fatty acids ethyl esters

Abstract

Aim: This review presents how some emerging biomarkers may allow the early detection of alcohol abuse when detected in different biological materials;

Methodology: carbohydrate-deficient transferrin (CDT), ethylglucuronide (EtG), phosphatidyl ethanol (PEth) and fatty acids ethyl esters (FAEE) are shown as more recent literature suggests;

Results: some real situations are reported as well as the correct interpretation;

Conclusion: this review provides advice on the proper use of these emerging biomarkers according to the knowledge and clinical and forensic applications.

² S.C. LABORATORIO ANALISI
Laboratorio di Riferimento Regionale di Tossicologia
Hospital "SS Antonio e Biagio e C Arrigo"
Tel +39.0131.206214
E-mail vbianchi@ospedale.al.it
* Corresponding author



1. Introduzione

Il consumo di alcol, di cui i paesi europei hanno il triste primato, sta aumentando fortemente e con esso tutte le problematiche sanitarie a esso correlato (Room et al. 2005). Circa un quarto della spesa per le cure ai cittadini e in particolare per l'ospedalizzazione è in qualche modo legato all'eccessivo consumo alcolico (Bianchi et al. 2008).

Nonostante l'elevato tenore di vita dei paesi europei, l'eccessivo consumo di alcol potrebbe portare a un abbassamento delle attese di vita (Bianchi et al. 2006).

Il documento "Alcohol in Europe: a public health perspective" (WHO, 2011) riporta che il consumo medio procapite di un europeo sono 11 litri/anno, contro i 7 litri degli Americani. I paesi in cui si osserva un maggior consumo di alcol (>17 L/anno) sono quelli dell'Europa orientale (Ungheria, Romania, Repubblica Ceca). Sempre più giovani sono dediti all'alcol, ragazzi di 11 anni dichiarano di bere, mediamente a 14 anni si sperimenta la prima ubriacatura. La ricerca di Eurobarometer 2003 evidenzia che se è pur vero che gli uomini bevono più delle donne, la percentuale di donne che bevono è in crescita e anche durante la gravidanza 25-50% dichiarano di non smettere. I non bevitori o comunque quelli classificabili come astemi sono in via di diminuzione. Si calcola che in Europa ci siano 23 milioni di Europei alcol dipendenti. Per quel che riguarda la tipologia di bevande, la birra rappresenta il 44% delle bevande alcoliche, il vino 34% e i superalcolici il 23%. La birra è utilizzata principalmente nel Nord Europa, mentre il vino è tipico del Sud Europa.

Sebbene non ci sia una soglia chiara per definire un forte bevitore, dati epidemiologici indicano che dosi superiori a 300 g/settimana per l'uomo e 200 g/settimana per la donna sono significativamente rischiose per la salute. Clinicamente l'assunzione "a rischio" si differenzia dall'abuso alcolico poiché in questo ultimo caso oltre ad essere a rischio la salute, il soggetto evidenzia disagi sociali e relazionali. L'alcolismo infatti è un insieme di problemi molto severi che coinvolgono la dipendenza, l'aumento della tolleranza e l'astinenza quando non si beve.

Il consumo eccessivo di alcol è causa di morte prematura, ma l'uso eccessivo è anche implicato nell'attività criminale, nella violenza personale e nel danno verso la proprietà (Leon et al. 2006).

La riduzione del problema può verificarsi solo se si svilupperanno strategie efficaci per prevenire, diagnosticare e curare l'abuso alcolico. Per quel che riguarda la diagnosi, è necessario individuare modalità che possano evidenziarne precocemente l'uso e

conseguentemente annullare o minimizzare il danno. Da anni sono disponibili questionari (CAGE, MUST o AUDIT) (Allen et al. 2003; Alling et al. 2005) che vengono auto compilati e come tali le risposte non sempre sono rispondenti alla realtà. Il vero aiuto potrebbe derivare dai test di laboratorio che rappresentino un'evidenza oggettiva del problema alcol.

Esistono numerosi marcatori biochimici di abuso alcolico, alcuni diretti, altri indiretti, alcuni tradizionali, altri emergenti di cui però non sempre è nota, o a volte contraddittoria, la sensibilità e specificità. Ancora, l'uso di diverse matrici biologiche come sangue, urina, capello, meconio, potrebbe aprire nuovi orizzonti.

E' altresì importante interpretare correttamente i risultati ottenuti alla luce di diversi ambiti applicativi - clinici e amministrativo forensi- per inquadrare correttamente ogni singolo caso e garantire la salute e la sicurezza dell'individuo e della collettività.

2. Biomarcatore, sensibilità, specificità, valori predittivi positivo e negativo

Un marcatore biochimico è una sostanza presente nei fluidi biologici, in grado di evidenziare la presenza o il progredire di una condizione patologica. Un biomarcatore ideale per l'abuso alcolico dovrebbe dare risultati attendibili e riproducibili, essere capace di differenziare le diverse quantità di alcol assunto, anche nell'unità di tempo, essere di facile utilizzo, ripetibile, disponibile in tempi brevi in tutti i laboratori ed economico.

Da un punto di vista diagnostico deve essere sensibile, cioè capace di identificare correttamente le persone che hanno assunto alcol, e specifico, cioè capace di identificare correttamente le persone che invece non hanno assunto alcol. Inoltre il biomarcatore ideale dovrebbe essere misurabile per un tempo sufficientemente lungo anche dopo assunzioni di piccole quantità di alcol.

Se molto sensibile esso non dà risultati falsamente negativi, se molto specifico non dà risultati falsamente positivi. Pertanto in linea teorica il biomarcatore ideale dovrebbe essere caratterizzato da sensibilità e specificità pari al 100%, ma questa è una situazione puramente ideale. Nella realtà va considerato che esiste una variabilità biologica intra- e interindividuale per cui sia lo stesso individuo che individui diversi metabolizzano l'alcol in tempi e modi diversi.

A causa di questa variabilità, quando si studiano i biomarcatori in una popolazione "normale" e in una dedita all'alcol, le curve di distribuzione si sovrappongono parzialmente e la zona grigia rappresentata da questa sovrapposizione è di difficile interpretazione. Poiché il corredo enzimatico interessato nel metabolismo dell'alcol è differente per attività, persone diverse che



bevono la stessa quantità di alcol possono presentare concentrazioni di biomarcatore diverse. Ci sono individui che bevono eccessivamente senza avere risultati anormali (la sensibilità in questi soggetti è bassa), altre persone che pur non presentando problemi alcol correlati possono evidenziare concentrazioni di biomarcatore oltre la norma (la specificità in questi soggetti è bassa).

Un altro aspetto importante è il calcolo degli intervalli di riferimento o, meglio della soglia di positività. Se si assume che nella popolazione sana di controllo (popolazione che beve moderatamente) la distribuzione del biomarcatore da studiare in esame è gaussiana, ipotesi questa per la maggior parte dei casi errata, l'intervallo di riferimento è calcolato come $\text{media} \pm 2 \text{ DS}$ dei risultati ottenuti. Questo porta a una specificità inferiore al 100% poiché il 5% dei valori di controllo si dispone fuori del più basso e del più alto limite di riferimento.

Quando si definisce la soglia di positività per i marcatori di abuso alcolico, occorre considerare che la limitazione di questi studi sta nel fatto che sensibilità e specificità vengono valutate in relazione a questionari auto-compilati come se questo fosse il gold standard per il consumo alcolico. In realtà molti pazienti non riferiscono la storia accurata della loro vera assunzione e questo crea problemi di validità.

Inoltre il modello di consumo alcolico e le consuetudini del bere 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 Characteristics (ROC), dove viene valutata la sensibilità e la specificità a differenti cut-off nella popolazione normale e in quella dei bevitori, è diventato uno strumento utilizzato per paragonare le performance dei biomarcatori e selezionare i valori-soglia.

La possibilità di ottenere una corretta classificazione (valore predittivo) con un marcatore biologico per l'alcol è fortemente legata alla prevalenza dell'uso/abuso di alcol nella popolazione da studiare. Il valore predittivo positivo fornisce la proporzione di risultati dei test veramente positivi tra tutti i risultati positivi (somma di veri e falsi positivi) mentre il valore predittivo negativo rappresenta la proporzione di risultati dei test veramente negativi tra tutti i risultati negativi (somma di veri e falsi negativi).

Ancora, quando si usa un marcatore con sensibilità e specificità abbastanza alte, il rischio di un'errata classificazione può essere piuttosto alto se la patologia che si studia è poco frequente nella popolazione studiata. Di conseguenza marcatori usati per individuare l'eccessivo consumo di alcol funzionano meglio, cioè hanno un valore predittivo positivo più



alto, negli studi su popolazioni selezionate per alto rischio, ad esempio guidatori ubriachi, che in quelli sulla popolazione in generale.

Sensibilità, specificità e valori predittivi sono influenzati dalla soglia di positività, cioè dal limite decisionale scelto per distinguere tra un valore normale e uno patologico. E' possibile aumentare la sensibilità del test variando il valore decisionale, ma questo inevitabilmente porterà a una perdita di specificità. Altrettanto avviene se si voglia aumentare la specificità: si perderà in sensibilità.

Un marcatore da usare come screening generale per individuare il livello di potenziale pericolosità di un individuo o per valutare precocemente se si è verificata una ricaduta durante la riabilitazione deve essere molto sensibile. Al contrario se un marcatore deve dare evidenze certe in ambito amministrativo-legale, con possibili sanzioni, allora deve essere molto specifico per evitare la possibilità che si verifichino falsi positivi.

3. Biomarcatori di abuso alcolico

Ritrovare l'alcol etilico nei fluidi biologici o nell'aria espirata è la più tradizionale e oggettiva prova che esso sia stato assunto, tuttavia la misura dell'alcol, a causa del veloce metabolismo, è limitata dal tempo intercorso tra assunzione e determinazione (scarsa sensibilità diagnostica).

Inoltre ritrovare in un soggetto una considerevole quantità di alcol nel sangue non è indicativo né dell'abitudine al bere né di problematiche socio-sanitarie.

D'altro canto l'aumento delle attività enzimatiche di AST, ALT, GGT o del volume corpuscolare medio (MCV) suggerisce la presenza di danno epatico, non solo alcol correlato, e comunque quando la malattia è già in fase avanzata (scarsa specificità diagnostica).

Per queste ragioni la letteratura scientifica propone marcatori più specificatamente legati all'uso/abuso alcolico, misurabili nell'organismo anche dopo molto tempo dall'assunzione. Inoltre la tecnologia analitica sempre più sofisticata ha permesso di rilevare piccole quantità per cui oggi è possibile anche l'utilizzo di materiale biologico alternativo come quello cheratinico (capelli, unghie) e meconio.

4. Transferrina carboidrato carente (CDT) o transferrina desialata

La transferrina è la glicoproteina che veicola e trasporta il ferro nel sangue. Dal punto di vista strutturale possiede da 0 a 2 catene ramificate di carboidrati, ognuna delle quali può terminare



con un numero di residui differente di acido sialico (Bianchi et al. 2006). La glicoforina più comune contiene 4 residui di acido sialico (80% della transferrina totale).

Il consumo di alcol inibisce la sializzazione della transferrina per cui le forme con due residui di acido sialico o addirittura prive aumentano (Bianchi et al. 2006) in caso di pesante consumo di bevande alcoliche.

L'insieme di queste glicoforine, povere di acido sialico, note con il nome di transferrina carboidrato-carente (CDT) costituisce un ottimo biomarcatore per individuare i forti bevitori. La CDT è studiata puntualmente da oltre 30 anni, e, a differenza di altri marcatori molto promettenti, ma indagati in modo limitato da poco tempo, è ormai consolidata l'evidenza delle sue performance in ambito alcolico.

Per quel che riguarda il dosaggio della CDT negli anni, sono stati proposti metodi e tecniche differenti.

Il metodo considerato a oggi candidato a essere di riferimento effettua la separazione delle glicoforine in HPLC e la rilevazione del complesso ferro-transferrina a 470 nm (Helander et al. 2003), dopo saturazione del campione di siero con un sale di ferro.

La separazione delle glicoforine può essere effettuata anche in elettroforesi capillare (CZE) con lettura a 210 nm (Crivellente et al. 2000).

Queste metodiche sono di difficile applicazione nei laboratori clinici di routine, dove il numero di campioni da analizzare è notevole. La richiesta di semplicità e velocità ha spinto il mercato della diagnostica a sviluppare metodi commerciali in HPLC e CZE sotto forma di kit semplificati su strumentazione dedicata che permettono di poter effettuare in tempi ridotti un carico di lavoro notevole. In commercio esiste anche un kit immunometrico diretto che non necessita alcun pretrattamento del campione (Bianchi et al. 2008a).

La presenza di metodi diversi per il dosaggio della CDT è stata un limite per l'utilizzo di questo biomarcatore, infatti differenti metodi danno risultati diversi per lo stesso campione, da qui la necessità di soglie di positività differenti metodo dipendenti. Si osservano così cut off che variano da 1.3-1.6% (CZE dedicati), 1.8-2.0 (HPLC) e 2.5 % (metodo immunometrico). Per ovviare a questa criticità è stato costituito un gruppo di lavoro internazionale per la standardizzazione della misura della CDT che avrà lo scopo, tra l'altro, di validare il materiale di riferimento che permetta di allineare tutti i metodi (Helander et al. 2010) al fine di raggiungere un traguardo di tutto rispetto: ottenere lo stesso risultato per lo stesso campione in qualsiasi laboratorio.



Questo è importante per tutti gli esami di laboratorio ma in particolar modo per quegli analiti dal cui risultato possono scaturire provvedimenti limitativi per la libertà personale. E' per questo motivo che nei casi in cui la CDT è eseguita per scopi amministrativo-legali (rilascio di patente di guida, porto d'armi, affidamento di minori ecc) è assolutamente necessario che i risultati "non-negativi" ottenuti con kit diretti o con strumentazione dedicata vengano confermati con tecniche di elevata gerarchia analitica (HPLC e CZE), tipica di molti laboratori specializzati a cui è possibile inviare i campioni.

L'emivita della CDT è di circa 14 giorni per cui generalmente dopo 2-3 settimane di astinenza ritorna entro l'intervallo di normalità.

La CDT aumenta nelle persone che bevono regolarmente elevate quantità di bevande alcoliche, un apporto giornaliero medio di almeno 40 grammi di etanolo (due lattine di birra ad alta gradazione alcolica, mezza bottiglia di vino o 120 ml liquore) per qualche settimana sono sufficienti a fare aumentare questo analita oltre la soglia di positività (cut-off).

La CDT è un marcatore molto specifico, a differenza degli enzimi epatici (es. GGT), il suo aumento è legato solo all'abuso alcolico, se misurato con metodi appropriati.

Le malattie metaboliche con difetti della glicosazione (CDG), che vengono però diagnosticate nei primi anni di vita poiché normalmente sono legate a ritardi mentali, rappresentano nell'uomo forse l'unico caso in cui si ha una CDT alterata anche senza uso di alcol.

Ci sono poi situazioni che rendono più complessa la determinazione della CDT come nel caso di varianti genetiche (<1% nella popolazione) e in qualche rara situazione di sofferenza epatica. Questa difficoltà è legata all'aspetto analitico poiché in questi sono casi non si riesce a separare perfettamente la disialotransferrina, la molecola target della CDT, dalle altre glicofornie della transferrina. Nella stragrande maggioranza dei casi l'HPLC e qualche CZE separano tutte le forme, anche la maggior parte delle varianti. Il laboratorio deve conoscere i limiti del proprio metodo e come tale refertare in modo chiaro tale da non generare dubbi al Medico che deve risolvere un quesito clinico e legale.

Se la CDT viene correttamente espressa come percentuale della transferrina totale, non esistono differenze statisticamente significative di concentrazione tra uomo e donna.

In caso di gravidanza si è osservato un aumento graduale della concentrazione di disialotransferrina con il progredire della gestazione, in alcuni casi alla fine del terzo trimestre si possono osservare valori appena sopra la soglia di positività (Bianchi et al. 2011). Ciò è dovuto al fatto che probabilmente le forme a più basso contenuto di acido sialico sono quelle più sature di ferro utile alla sintesi dell'emoglobina che porta ossigeno al feto. E' stata

studiata anche la distribuzione della disialotransferrina e delle altre glicofornie a più alto contenuto di acido sialico nei bambini e adolescenti (Bianchi et al. 2012).

Per migliorare le performance della CDT è stato introdotto un algoritmo che tiene conto anche della GGT, la cosiddetta Gamma- CDT (Niemelä et al.2007). Se la CDT viene dosata con il metodo di riferimento tale algoritmo a volte può essere un elemento confondente, specialmente nella medicina del traffico (Bianchi et al. 2010).

5. Etilglucuronide (EtG) ed Etilsolfato (EtS)

Sono metaboliti diretti del metabolismo non ossidativo dell'alcol, rappresentano circa 0,1 % dell'alcol assunto. Sono rilevabili nelle urine entro 1 ora dall'assunzione, il glucuronide in quantità notevolmente più elevata rispetto al solfato (Helander et al. 2004). Entrambi i metaboliti vengono eliminati meno velocemente dell'etanolo e quindi il tempo di rilevabilità è funzione della quantità di alcol assunta (Helander et al. 2009) e comunque sono misurabili anche quando l'alcol non è più determinabile. Per il loro dosaggio viene utilizzata una tecnica molto sofisticata, la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS o LA-MS/MS) che permette la loro quantificazione simultanea; recentemente è stato introdotto sul mercato un metodo immunoenzimatico che permette la quantificazione dell'EtG nelle urine sulle più comuni piattaforme analitiche in uso nei laboratori clinici (Bianchi et al. 2009).

Nelle urine l'EtG e l'EtS sono marcatori specifici e sensibili per rilevare il consumo di alcol anche quando l'etanolo non può più essere misurato, perché la sua cinetica è tale che viene eliminato dopo poche ore.

Il dosaggio urinario di questi marcatori trova la sua più importante applicazione nel valutare la sobrietà di chi, in un programma di riabilitazione, si è impegnato ad astenersi dall'assumere bevande alcoliche. EtG ed EtS sono rilevabili da qualche ora a 2-3 giorni dopo assunzione di piccole quantità di alcol come quello contenuto in una birra leggera (Bianchi et al. 2009), sono inoltre caratterizzati da una grande variabilità biologica per cui dopo somministrazioni di quantità uguali di alcol e a parità di alcolemia persone diverse hanno diversi livelli di EtG ed EtS nelle urine.

Per questo, solo sulla base di una determinazione di EtG ed EtS, è difficile stimare la quantità di etanolo assunto e quando l'assunzione è avvenuta. Per evitare che colluttori o disinfettanti a base alcolica possano influenzare la misura si è soliti considerare come soglia positiva il valore di 0.5 mg/L per l'EtG e 0.1 mg/L per l'EtS. La diluizione sia in vivo (assunzione di



grandi quantità di liquido che in vitro aggiunta di acqua all'urina dopo la minzione) diminuiscono la concentrazione di EtG ed EtS, per minimizzare questo rischio di alterazione è consuetudine esprimere il risultato come rapporto tra EtG o EtS e creatinina urinaria, così come si fa anche per il dosaggio delle sostanze d'abuso urinarie (Helander et al. 2007).

Studi svedesi hanno evidenziato che nelle infezioni urinarie, l'idrolisi batterica che potrebbe verificarsi in campioni di urina contaminati con E. Coli, può portare a risultati falsamente negativi di EtG. Viceversa in pazienti diabetici può verificarsi la fermentazione di glucosio a etanolo con conseguente neoformazione di EtG che porta inevitabilmente a risultati falsamente positivi. Questo non si verifica per l'EtS (Martins Ferreira et al. 2012).

L'EtG e l'EtS possono essere misurati anche nel sangue, ma tali analiti sono presenti per un tempo inferiore rispetto all'urina.

L'EtG (e non l'EtS a causa dei numerosi ponti disolfuro presenti nella matrice cheratinica) viene misurato anche nel capello specialmente nel contesto forense con un certo successo nonostante le problematiche legate all'uso di cosmetici ancora aperte (Martins Ferreira et al. 2012).

Non è consigliabile l'utilizzo del solo EtG nel capello per evidenziare l'abuso alcolico, infatti al momento non si hanno ancora consolidati studi di popolazione che dimostrino inequivocabilmente la misura della variabilità interindividuale (Pragst 2012; Tagliaro et al. 2010) e pertanto ci potrebbe essere elevato rischio di contenzioso. Per l'interpretazione dei valori dell'EtG nei capelli la Society of Hair Testing (SoTH) ha prodotto un documento di consenso (Society of Hair Testing, 2011) dove viene proposto come soglia di positività per l'abuso alcolico il valore di 30 pg/mg di capelli nei 3 cm più vicini alla radice. La soglia di 4 pg/mg di capello potrebbe discriminare l'astemio dal bevitore moderato. E' assolutamente da evitare l'analisi di campioni più corti di 3 cm.

6. Esteri etilici degli acidi grassi (FAEE)

Gli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE), i più importanti dei quali sono etilsteurato, etilpalmitato, etiloleato ed etilmiristato, sono prodotti dal metabolismo non ossidativo dell'etanolo con gli acidi grassi derivati dal catabolismo dei trigliceridi (Hannuksela et al. 2003; Diczfalusy et al. 2001), per opera della FAEE sintetasi o dell'acilcoenzima A:etanolo-O-aciltransferasi (Diczfalusy et al. 2001), attraverso una reazione non ancora conosciuta nei dettagli.



I FAEE si formano nel duodeno e nel circolo in presenza di etanolo. Nel sangue sono veicolati all'albumina o alle lipoproteine e possono essere trasferiti tra i diversi compartimenti lipidici. L'albumina causa una rapida secrezione di FAEE dalle cellule di epatoblastoma HpG2 in cultura, mentre le lipoproteine attivano sia la sintesi sia la liberazione di FAEE (Hasaba et al. 2001).

La loro misura richiede una strumentazione molto complessa (GC-MS o LC-MS) (Pragst et al. 2001), grande esperienza in campo cromatografico, patrimonio questo di laboratori specializzati.

Sono misurabili nel sangue, nei capelli e in diversi organi quali fegato, pancreas, cuore ed encefalo e questo ha suggerito l'ipotesi che essi possano giocare un ruolo diretto nell'effetto tossico dell'alcol sugli organi (Bird et al. 1996; Laposata et al. 1996; Laposata et al. 1998; Vanlaufen et al. 2007; Doyle et al. 1996; Borucki et al. 2007). La curva di eliminazione è simile a quella dell'etanolo, con tempi di eliminazione più prolungati. Livelli ematici di FAEE sono rilevabili nel siero anche 24 ore dopo l'assunzione di alcol (Sodeberg et al. 2003) e nel caso di abuso cronico anche dopo 4 giorni. Sono stati proposti anche per individuare bevitori occasionali di quantità smodate di alcol (binge drinking) (Wurst et al. 2004).

Una limitazione potrebbe essere rappresentata dal fatto che non è ancora noto quanto alcol e quali modalità di assunzione sono necessarie per la loro formazione.

Nella diagnosi di abuso alcolico cronico, così come nel monitoraggio dell'astinenza, i FAEE sono marcatori promettenti se determinati nel capello, infatti le curve ROC nel capello possono distinguere gli astemi, dai bevitori occasionali e i forti bevitori dagli alcolisti (Laposata et al. 1996, Yegles et al. 2004; Wurst et al. 2008).

Essi possono essere determinati anche dopo due mesi di astinenza (Wurst et al. 2008a), per cui questa pratica potrebbe essere utile nel monitorare le donne in gravidanza (Morini et al. 2008) e gli eventuali autori di reati sotto l'influenza dell'alcol (Bakdash et al. 2010).

L'uso di prodotti per la cura dei capelli influenza il dosaggio dei FAEE nel senso che sono probabili risultati falsamente positivi, mentre l'incorporazione non dipende dal colore del capello.

La SoTH ha proposto la soglia di 0,5 ng/mg di capelli nei 3 cm più vicini alla radice come somma dei seguenti quattro esteri: etilmiristato, etilpalmitato, etiloleato ed etilstearato (sensibilità 90%, specificità 90%) (Society of Hair Testing, 2011), anche se nel capello ne sono stati isolati almeno quindici.



La determinazione dei FAEE è stata recentemente eseguita anche nel meconio al fine di monitorare un'eventuale esposizione del feto all'alcol (Bakdash et al. 2010).

7. Fosfatidiletanolo (PEth)

Questo nome è un termine generico per indicare un gruppo di fosfolipidi che si formano dalla fosfatidilcolina in presenza di etanolo (Gustavsson et al. 1987; Aradottir et al. 2006). Normalmente la fosfatidilcolina si trasforma in diversi acidi fosfatidici per opera dell'enzima fosfolipasi D, ma in presenza di etanolo le membrane cellulari alterate portano alla formazione di PEth che può quindi essere utilizzato come marcatore specifico di uso di alcol (Gunnarsson et al. 1998).

Da un punto di vista chimico la molecola di PEth è costituita da un gruppo di fosfoetanololo cui sono legati due acidi grassi a lunga catena. Questi possono essere diversi per cui si hanno PEth diversi, la forma quantitativamente più importante è il PEth16:0/18:1 che contiene un residuo di acido oleico (16 atomi di carbonio) e uno di acido palmitico (18 atomi di carbonio); il numero 0 e il numero 1 indicano rispettivamente che l'acido oleico non ha doppi legami nella sua catena, mentre l'acido palmitico ne ha 1.

La prima tecnica utilizzata per il dosaggio del PEth – l'HPLC con rivelatore evaporative light scattering (ESLD) - misurava il PEth totale (Aradottir et al. 2005; Helander et al. 2009a).

Per la determinazione delle diverse specie chimiche del PEth recentemente sono stati messi a punto metodi in LC-MS e LC-MS/MS su sangue intero dopo estrazione dalle membrane cellulari (Nalesso et al. 2011; Zheng et al. 2011).

La complessità dell'analisi e della strumentazione non lo rende di facile esecuzione nei laboratori di routine, anche se alcune semplificazioni sono state proposte (Helander 2011).

La famiglia del PEth comprende molte specie diverse che probabilmente variano anche in funzione dell'alimentazione, tuttavia è stato dimostrato che la somma delle forme PEth 16:0/18:1 e PEth 16:0/18:2 correla meglio con il PEth totale piuttosto che le singole forme prese singolarmente, questo potrebbe significare che le due forme insieme rappresentano la maggior parte del PEth presente nel sangue (Nalesso et al. 2011; Zheng et al. 2011).

L'emivita del PEth è di circa 4 giorni nel sangue e riflette il consumo delle ultime settimane. La sua concentrazione è dose dipendente ma con molta variabilità interindividuale (Nalesso et al. 2011) assunzioni occasionali di alcol non portano a concentrazioni di PEth misurabile in HPLC, mentre l'uso della LC-MS, tecnica analitica molto sensibile, ha permesso di rilevare la positività del PEth in almeno un terzo dei donatori (Helander 2011). Sulla base di questi



risultati, per indicare il consumo di alcol è stata calcolata come soglia di positività una concentrazione di PEth 16:0/18:1 pari a 0,2 $\mu\text{mol/L}$ e un PEth totale di 0,7 $\mu\text{mol/L}$ (Nalesso et al. 2011).

Poiché la fosfolipasi D è attiva anche in vitro, non è da escludere la neoformazione di PEth dopo l'effettuazione del prelievo in soggetti che bevono molto e quindi con etanolo presente. Per questo il campione deve essere immediatamente congelato a -20°C , temperatura alla quale la fosfolipasi D è inattiva. La neoformazione di PEth non è stata osservata se il campione non contiene etanolo anche quando conservato a temperatura ambiente per qualche giorno (Nalesso et al. 2011).

8. Casi clinici

Ciascun risultato riguardante i biomarcatori di abuso alcolico deve essere sempre inquadrato tenendo conto delle soglie di positività fornite dal laboratorio, che dovrebbero essere state calcolate su una popolazione rappresentativa del potus normale, tenuto conto della variabilità analitica e di quella biologica. Poiché la forma della distribuzione delle concentrazioni di questi marcatori di norma non è gaussiana, il calcolo delle soglie di positività deve essere calcolato sulla base dei percentili e non dalla media e deviazione standard.

Ancora, durante il trattamento e il follow up i risultati dei dosaggi dei marcatori di abuso alcolico vanno sempre inquadrati non in modo assoluto ma rapportati ai precedenti risultati riscontrati nel paziente per valutare se ci sia stato il rischio di ricadute.

Poiché ogni marcatore e ogni matrice hanno un loro caratteristico significato, è sempre bene accoppiare marcatori e matrici che possano monitorare sia il breve che il lungo termine, d'altra parte occorre tenere conto del fatto che tali indagini analitiche devono essere facilmente disponibili a prezzi vantaggiosi per non gravare troppo sul Servizio Sanitario Nazionale.

Là dove questa strategia è stata seguita nel tempo si hanno avuto i migliori successi.

Poiché in Italia l'uso del PEth e dei FAEE non è ancora entrato nella routine dei Laboratori, si potrebbe proporre di seguire il paziente per due settimane, ad esempio partendo dal lunedì, in questo modo: al 1°-7° -15° giorno si effettua il prelievo per il dosaggio della CDT nel sangue, mentre il 1°-3°-5°-8°-10°-12°-15° giorno si raccoglie "a vista" l'urina, per evitare adulterazione e sostituzione del campione, per il dosaggio dell'EtG.

Si riportano qui di seguito cinque casi pratici, osservati nel nostro laboratorio.



Caso 1

Un soggetto di sesso maschile, da anni a lungo assente dal lavoro, è giunto alla nostra osservazione poiché il medico competente sospettava che ci fossero problemi legati all'abuso di alcol. Il dosaggio della CDT all'inizio dell'osservazione era alto (3.1%), anche se il soggetto negava assunzioni di bevande alcoliche. Tutte le urine contenevano EtG oltre la soglia di positività (1.5 mg/L) e l'ultimo dosaggio di CDT (3.6%), eseguito a distanza di 15 giorni dal primo, era più alto di quello eseguito all'inizio del monitoraggio.

Verosimilmente questo è il caso in cui l'individuo non riesce a trattenersi dal bere anche durante il periodo di "sorveglianza".

Il soggetto, solo alla fine di un lungo ricovero in ospedale dove veniva seguito attentamente, vedeva normalizzarsi la sua CDT (1.2 %).

Caso 2

Un lavoratore con un passato caratterizzato da problemi familiari e relazionali, non voleva sottoporsi al test con etilometro sul luogo di lavoro richiesto dal medico competente in seguito alla segnalazione dei colleghi che avevano osservato un comportamento insolitamente aggressivo. Il soggetto sosteneva che bere un bicchiere di vino ai pasti, ma null'altro. Il primo dosaggio della CDT era elevato (3.5%), così come l'EtG (2.8 mg/L). Durante il periodo di osservazione l'EtG era basso, ad eccezione dell'ottavo giorno dove l'EtG ritornava alto. Alla fine del periodo, il CDT era ancora alto (2.1%) ma decisamente più basso di quello misurato alla prima osservazione.

Verosimilmente il soggetto, che all'inizio beveva, durante il periodo di osservazione ha "normalizzato" le sue assunzioni di alcol, ad eccezione della domenica. Probabilmente se si fosse astenuto totalmente forse la CDT alla fine si sarebbe abbassata al di sotto del cut-off (<1.8%).

Caso 3

A un lavoratore sospettato di avere problemi alcol correlati era stato richiesto di sottoporsi a un dosaggio di CDT. Il lavoratore si presentava per il prelievo una settimana dopo la richiesta del medico competente asserendo di avere avuto importanti impegni di lavoro. La CDT era più alta della soglia di positività (2.5 %), così come l'EtG (2.8 mg/L). Tutti i campioni di urina risultavano poi negativi per EtG (≤ 0.5 mg/L), tranne uno in concomitanza di una



festività (1.0 mg/L). Verso la fine dell'osservazione l'EtG era nuovamente alto (0.7 mg/L). L'ultima CDT era appena positiva CDT (1.9%) e l'EtG decisamente positivo (1.1 mg/L). Verosimilmente l'individuo ha ritardato il prelievo appositamente e contemporaneamente ha diminuito la quantità di alcol assunta, infatti durante la prima settimana i risultati di EtG si abbassano fino a negativizzarsi. L'individuo ha poi avuto una ricaduta importante e comunque durante il monitoraggio il soggetto non ha mai smesso di bere. L'astinenza totale avrebbe verosimilmente negativizzato il CDT.

Caso 4

Un paziente, in cura presso una struttura apposita, era sospettato di non attenersi al protocollo concordato. Veniva pertanto effettuato un prelievo di sangue e la CDT risultava leggermente più alta della soglia di positività (2.1%), mentre il paziente negava assolutamente di bere, opinione sostenuta anche dalle persone che lo seguivano nella struttura. Il valore di EtG di tutti i campioni urinari risultarono negativi.

Alla fine del periodo di osservazione la CDT presentava un valore simile a quello iniziale (2.0%).

Da questi dati si può ritenere che verosimilmente l'individuo si attiene al protocollo disintossicante. Il valore di CDT border-line può essere spiegato sulla base del fatto che il cut off viene calcolato su base statistica ed epidemiologica.

Questi casi sono da valutare singolarmente dal medico competente o dai medici delle commissioni patenti e qui, più che negli altri casi descritti, la visita e un'attenta anamnesi sono da raccomandare.

Caso 5

Un giovane di 15 anni, ottimo studente con voti eccellenti e una storia di steatosi epatica dall'età di 10 anni, viene selezionato per l'iscrizione a un'importante scuola militare. All'arrivo, previo consenso, viene dosata la CDT che è "alta" e il ragazzo viene dichiarato inidoneo.

Tuttavia la famiglia richiede di ripetere il dosaggio presso una struttura pubblica di riferimento, la CDT risulta 5.1% mentre la AST 78 UI, la bilirubina totale 1.02 mg/dL, AST, GGT, MCV nella norma. Tutti i campioni raccolti ogni giorno per un mese risultavano negativi al test per l'EtG.



Il ragazzo è stato riammesso, tuttavia da un punto di vista biochimico e clinico il caso è ancora aperto.

In letteratura viene riportata la steatosi epatica come fattore confondente nell'utilizzare la CDT come marcatore dell'abuso alcolico, si ipotizza anche un'interferenza da un difetto congenito della glicosazione (CDG), ma nessun dato certo è stato ritrovato. Forse lo studio della famiglia e l'utilizzo di altri marcatori potranno chiarire questo caso di difficile interpretazione.

9. CONCLUSIONE

Per prevenire l'uso smodato di alcol, che può trasformarsi in abuso e dipendenza con effetti negativi personali e sociali, è importante avere a disposizione strumenti oggettivi che permettano una diagnosi precoce.

Esistono marcatori biochimici sensibili e specifici in grado di dare indicazioni quantitative sul livello di consumo alcolico (CDT, EtG, PEth, FAEE etc).

L'utilizzo di diverse matrici e l'intervallo di campionamento possono essere strumenti utili per la formulazione corretta della diagnosi.

La CDT è a oggi il marcatore di abuso alcolico più utilizzato e più studiato, in letteratura è reperibile un numero elevato di lavori scientifici che ne descrivono dettagliatamente il comportamento, anche in relazione ad alcune importanti patologie. E' il marcatore che a oggi evidenzia, più di ogni altro, se il paziente beve tanto e con regolarità.

L'EtG nelle urine trova la sua migliore applicazione nel valutare l'eventuale uso di alcol nei due /tre giorni antecedenti la minzione. E' utilissimo nel monitoraggio di pazienti che devono attenersi a un programma di riabilitazione. L'EtS nelle urine non risente di contaminazioni batteriche e dell'interferenza dovuta alla presenza di glicosuria.

Marcatori come i FAEE e il PEth, il cui dosaggio è limitato ancora a pochi laboratori di ricerca, necessitano di ulteriori validazioni in ambito epidemiologico, anche se il PEth nel sangue sembra essere un marcatore promettente.

L'utilizzo dei FAEE è raccomandabile nel capello, per un'appropriata diagnosi è bene tenere presente le raccomandazioni della SOTH.

Per la diagnosi di abuso alcolico in ambito forense, ad esempio per il rilascio di patenti di guida in soggetti riconosciuti essere a rischio, viene impiegata la CDT ed eventualmente l'EtG nel capello, mentre l'impiego del solo EtG va utilizzato con molta cautela.



Si può allora concludere che l'utilizzo di più marcatori associati e un'anamnesi appropriata sono indispensabili per l'interpretazione dei singoli casi e per la corretta formulazione della diagnosi nei diversi aspetti dell'abuso alcolico.

BIBLIOGRAFIA

Allen JP, Litten RZ. (2003) Recommendations in use of biomarkers in alcoholism treatment trials. *Alcohol Clin Exp Res* 27: 1667-70

Alling C, Chick JD, Anton R, et al. (2005) Revealing alcohol abuse: to ask or to test. *Alcohol Clin Exp Res* 29:1257-63.

Aradottir S, Olsson BL. (2005) Methodologic modifications on quantification of phosphatidylethanol in blood from humans abusing alcohol, using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering. *BMC Biochem* 6: 18.

Aradottir S, Asanovska G, Gjerss S, et al. (2006) Phosphatidylethanol (PEth) concentrations in blood are correlated to reported alcohol intake in alcohol-dependent patients. *Alcohol Alcohol* 41: 431-37.

Bianchi V (2006). *Transferrina carboidrato carente: nuovo marcatore di abuso alcolico*. 1rd ed. Turin: Ananke.

Bianchi V, Raspagni A, Arfini A.(2008) *Vecchi e nuovi marcatori di abuso alcolico nelle matrici biologiche*. 1rd ed. Turin: Ananke

Bianchi V, Arfini C, Helander A. (2008a) Determination of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) in Italy, *Clin Chem Lab Med* 46: 2759-62.

Bianchi V, Piccinini S, Raspagni A, et al. (2009) Test immunoenzimatico per il dosaggio in fase omogenea per il dosaggio dell'etilglucuronide nelle urina *Minerva Med Leg* 129: 177-82.

Bianchi V, Ivaldi A, Raspagni A, Arfini C, Vidali. M. (2010) Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) alone and combined with GGT (γ -CDT) in traffic medicine *Alcohol Alcohol* 3: 306-11

Bianchi V, Ivaldi A, Raspagni A, et al. (2011) Pregnancy and variations of carbohydrate-deficient transferrin levels measured by the candidate reference HPLC method. *Alcohol Alcohol* 46: 123 –7.



- Bianchi V, Ivaldi A, Raspagni A, et al. (2012) High-performance liquid chromatography evaluation of serum carbohydrate-deficient transferrin and more sialylated transferrin glycoforms in children. *Scand J Clin Lab Invest* 72: 274-8.
- Bakdash A, Burger P, Goecke TW, et al. (2010) [Quantification of fatty acid ethyl esters \(FAEE\) and ethyl glucuronide \(EtG\) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study](#). *Anal Bioanal Chem* 396: 2469-77.
- Bird DA, Laposata M, Hamilton JA. (1996) Binding of ethyl oleate to low density lipoprotein, phospholipid vesicles and albumin: a ¹³C NMR study. *J Lipid Res* 37: 1449-58.
- Borucki K, Dierkers J, Warteberg J, et al. (2007) In heavy drinkers, fatty acid ethyl esters remain elevated for up to 99 hours. *Alcohol Clin Exp Res* 31: 423-7.
- Crivellente F, Fracasso G, Valentini R, et al. (2000) Improved method for carbohydrate-deficient transferrin determination in human serum by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr B* 739: 81-93.
- Diczfalusy MA, Bjorkhem I, Einarsson C, et al. (2001) Characterization of enzymes involved in formation of ethyl esters of long-chain fatty acids in humans. *J Lipid Res* 42: 1025-32.
- Doyle KM, Cluette-Brown JE, Dube DM, et al. (1996) Fatty Acid ethyl esters in the blood as markers for ethanol intake. *JAMA* 276: 1152-6.
- Gunnarsson T, Karlsson A, Hansson P, et al. (1998) Determination of phosphatidylethanol in blood from alcoholic males using high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering or electrospray mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Biomed Sci App* 705: 243-9.
- Gustavsson L, Allig C. (1987) Blood phosphatidylethanol in rat brain by phospholipidase D. *Bioch Biophys Res Comm* 142: 958-63.
- Hannuksela ML, Liisanantii MK, Savolainen MJ. (2003) Effect of alcohol on lipids and lipoproteins in relation to atherosclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 39: 225-83.
- Hasaba A, Laposata M. (2001) The synthesis and secretion of fatty acid ethyl esters from HepG2 cells are stimulated by lipoproteins and albumin. *Alcohol Clin Exp Res* 25: 338-43.
- Helander A, Husa A, Jeppsson JO. (2003) Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clin Chem* 9: 1881-90.
- Helander A, Beck O. (2004) Mass spectrometric identification of ethyl sulphate as an ethanol metabolite in humans. *Clin Chem* 50: 936-7.
- Helander A, Olsson I, Dahl H. (2007) Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem* 53: 1-3.



- Helander A, Böttcher M, Fehr C, et al. (2009) Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol Alcohol* 44: 55-61.
- Helander A, Zheng Y. (2009a) Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin Chem* 55:1395-405
- Helander A, Wienders JP, Jeppsson JO, et al. (2010). Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: II. Performance of a laboratory network running the HPLC candidate reference measurement procedure and evaluation of a candidate reference material. *Clin Chem Lab Med* 48: 1585-92.
- Helander A. Biomarkör kan fånga tidigt riskbruk av alcohol. *Läkartidningen* 2011; 108: 2291-5
- Laposata EA, Lange LG. (1986) Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science*; 31:497-9.
- Laposata M. (1998) Fatty Acid ethyl esters: ethanol metabolites which mediate ethanol-induced organ damage and serve as markers of ethanol intake. *Prog Lipid Res* 37: 307-16.
- Leon DA, Mc Cambridge J. (2006) Liver cirrhosis mortality rates in Britain from 1950 to 2001: an analysis of routine data. *Lancet* 367: 52-6.
- Martins Ferreira L, Binz T, Yegles M. (2012) The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair. *Forensic Sci Int.* 218: 123-5.
- Morini L, Marchei E, Pellegrini M, et al. (2008) [Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for the measurement of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium: new biomarkers of gestational ethanol exposure?](#) *Ther Drug Monit.* 30: 725-32.
- Nalesso A, Viel G, Cecchetto G, et al. (2011) Quantitative profiling of phosphatidyl molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr. A* 1218; 8423-31.
- Niemelä O. (2007) Biomarker in alcoholism. *Clin Chim Acta* 377: 239-49.
- Pragst F, Auwaerter V, Sporkert F, et al. (2001) Analysis of fatty acid ethyl esters of long chain in hair as possible markers of chronically elevated alcohol consumption by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Forensic Sci Int* 121: 76-88.
- Pragst F. (2012) [Interpretation problems in a forensic case of abstinence determination using alcohol markers in hair.](#) *Forensic Sci Int.* 217: e4-7.
- Room R, Babor T, Rehm J. (2005) Alcohol and public health *Lancet*; 365: 519-30.



- Society of Hair Testing (SoTH) (2011) Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption. www.soth.org
- Soderberg BL, Salem RO, Best CA. (2003) Fatty acid ethyl esters. Ethanol metabolites that reflect ethanol intake. *Am J Clin Pathol.* 119: S94-9.
- Tagliaro F, Bortolotti F, Viel G, Ferrara SD (2010) Caveats against an improper use of hair testing to support the diagnosis of chronic excessive alcohol consumption, following the "Consensus" of the Society of Hair Testing 2009. *Forensic Sci Int* 207: e69-e70.
- Vonlaufen A, Wilson JS, Pirola RC, et al. (2007) Role of alcohol metabolism in chronic pancreatitis, *Alcohol Research Health* 30: 48-54.
- WHO (2011) Global status report on alcohol and health. Available from http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/msbgsruprofiles.pdf
- Wurst FM, Alexson S, Wolfersdorf M, et al. (2004) Concentration of fatty ethyl esters in hair of alcoholics: comparison to other biological state markers and self reported ethanol intake. *Alcohol Alcohol* 39: 33-8
- Wurst FM, Kelso E, Weinmann W, et al. (2008) Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than found with the AUDIT- a pilot study in a population-based sample of Swedish women. *Am J Obstet Gynecol* 407 : e1-e5.
- Wurst FM, Yegles M, Alling C, et al. (2008a) Measurement of direct ethanol metabolites in a case of a former driving under the influence (DUI) of alcohol offender, now claiming abstinence. *Int J Leg Med*; 122 :235-9.
- Yegles M, Labarthe M, Auwarter, et al. (2004) Comparison of ethylglucuronide and fatty acid ethyl esters concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Forensic Sci Int.* 145: 167-73.
- Zheng Y, Beck O, Helander A. (2011) Method development for routine liquid chromatography-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood. *Clin Chim Acta* 412: 1428-35.