



Diagnosi di uso/abuso pregresso e attuale di alcool

Luca Morini

Dipartimento di Medicina Legale, Scienze Forensi e Farmaco-Tossicologiche,
Università degli Studi di Pavia



Abuso alcolico: definizione

- L'abuso di alcool è una sindrome patologica determinata dal consumo acuto o cronico di eccessive quantità di bevande alcoliche:
 - **Abuso acuto:** assunzione di una dose di alcool tale da alterare l'attività psicosomatica dell'individuo
 - **Abuso cronico:** assunzione ripetuta di una dose eccessiva di alcool, unita alla manifestazione di tolleranza e sindrome d'astinenza
 - **Binge drinking:** assunzione compulsiva di sostanze alcoliche con lo scopo di alterare le proprie capacità motorie e percettive



Strumenti diagnostici



Attualità d'uso: etilometro





Attualità d'uso: etilometro

- 1) Assorbimento delle radiazioni infrarosse;
- 2) Ossidazione Chimica (colorimetria);
- 3) Sensore elettrochimico;
- 4) Semiconduttori;
- 5) Metodi basati sulla gascromatografia e sulla gascromatografia-spettrometria di massa.



Attualità d'uso: etilometro

Problemi legati alla determinazione dell'alcol nell'aria espirata

Analisi eseguita da personale non competente (calibrazione, esecuzione) ed in situazioni non sempre ideali (temperatura, umidità, pressione atmosferica)

Determinazione non specifica (false positività da parte di altre sostanze: metanolo, isopropanolo, etere etilico, xilene, toluene)

Condizioni patologiche (ipotermia, ipertermia, gravi patologie polmonari, diabete, **reflusso gastro-esofageo**)

Scarsa collaborazione da parte del soggetto (soprattutto quando in stato di ebbrezza o di ubriachezza)

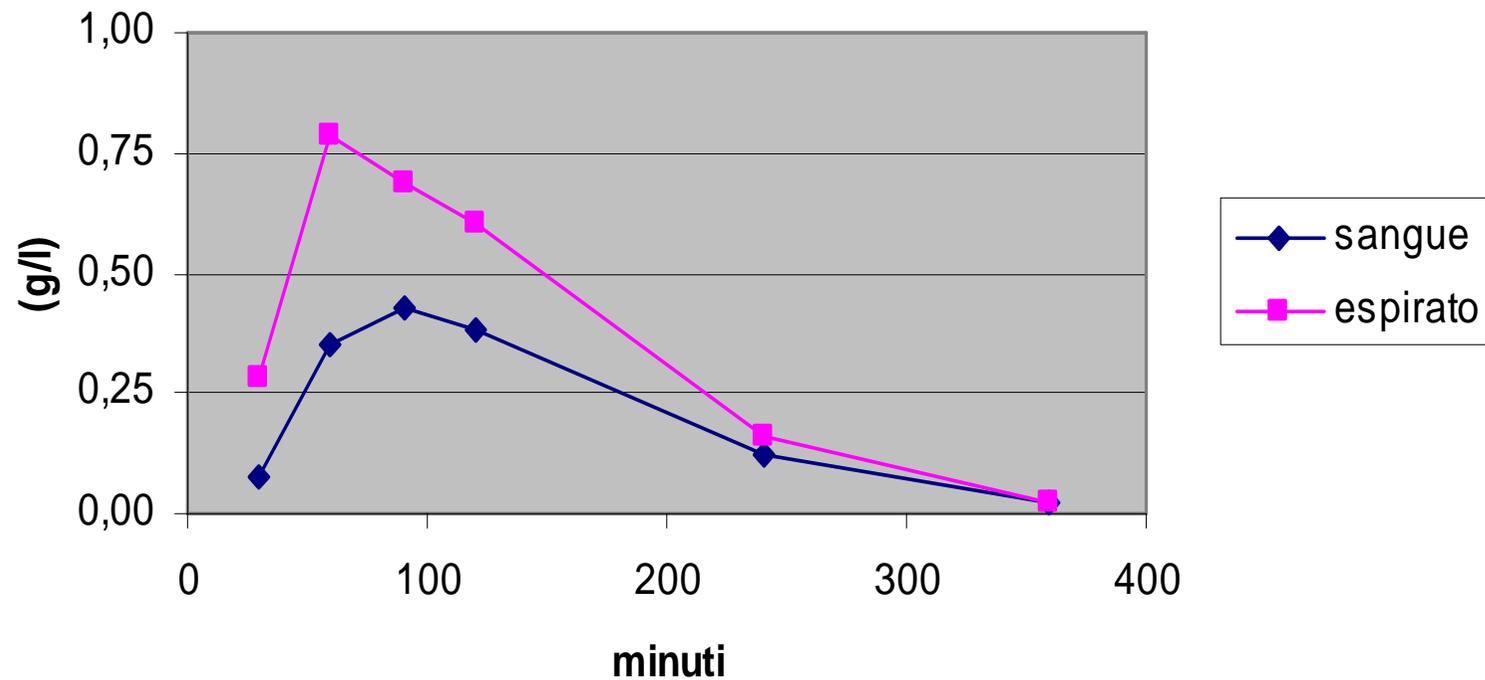
Contaminazione orale (soggetto fermato subito dopo l'uscita dal bar)

Variabilità del fattore di conversione aria espirata/sangue



Attualità d'uso: etilometro

Confronto tra alcol nel sangue ed alcol nell'espirsto





Attualità d'uso: alcolemia

Metodi per la determinazione dei livelli di etanolo presenti nel sangue:

Metodi immunoenzimatici: dotati di elevata specificità ma di scarsa sensibilità. Il dato semiquantitativo si è dimostrato del tutto sovrapponibile al dato quantitativo riscontrato con metodiche di conferma. I risultati immunoenzimatici non hanno validità medico-legale

Metodi in HS-GC-FID o HS-GC-MS: metodi di conferma dotati di elevatissime specificità e sensibilità analitiche. Il referto ha valenza medico-legale e/o amministrativa.



Consumo recente: alcoluria

Metodi per la determinazione dei livelli di etanolo presenti nell'urina:

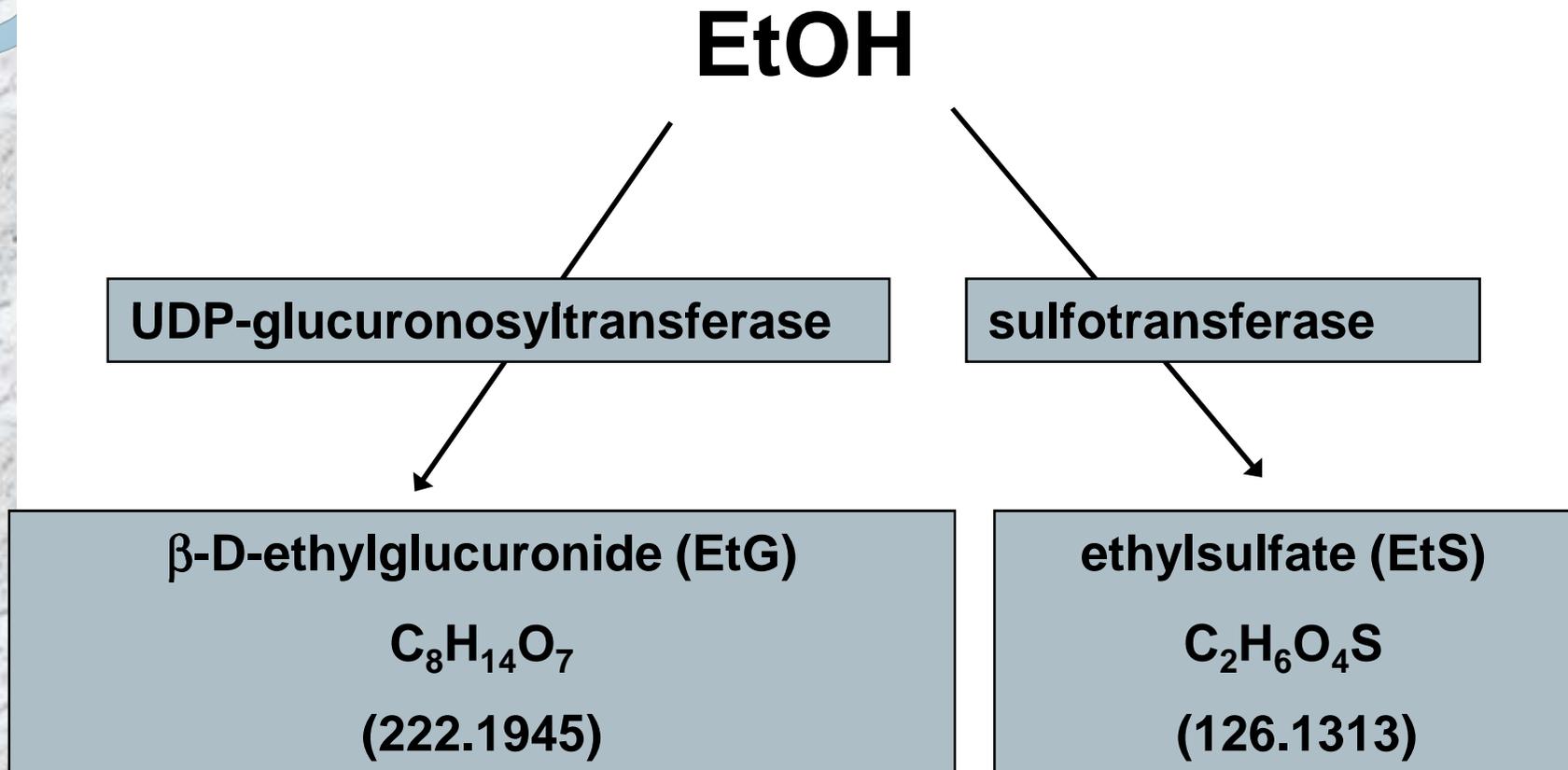
Metodi immunoenzimatici: dotati di elevata specificità ma di scarsa sensibilità. Il dato semiquantitativo si è dimostrato del tutto sovrapponibile al dato quantitativo riscontrato con metodiche di conferma. I risultati immunoenzimatici non hanno validità medico-legale

Metodi in HS-GC-FID o HS-GC-MS: metodi di conferma dotati di elevatissime specificità e sensibilità analitiche. Il referto ha valenza medico-legale e/o amministrativa.

Le concentrazioni di etanolo ritrovate nell'urina sono in grado di diagnosticare un consumo recente di alcool ma non sono utili per determinare l'attualità d'uso



Etil glucuronide and etil solfato





Etil glucuronide (EtG) ed Etil solfato (EtS)

Markers diretti: elevata specificità diagnostica;

Indicatori di uso/abuso alcolico nel breve (sangue/siero), medio (urina) e lungo (capelli) periodo;

Possibilità di diagnosi da esposizione intrauterina ad etanolo attraverso la loro identificazione nel meconio.



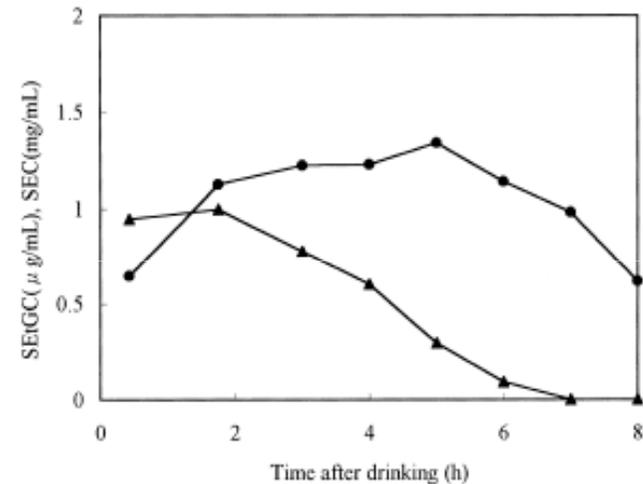
Consumo recente di alcool

EtG/EtS nel sangue/siero: perché?

EtG: picco plasmatico 2-3.5 ore dopo EtOH. EtG: rilevabile nel siero per almeno 8 ore dopo l'eliminazione di EtOH



Analisi ritardata nel tempo (es: pirata della strada)



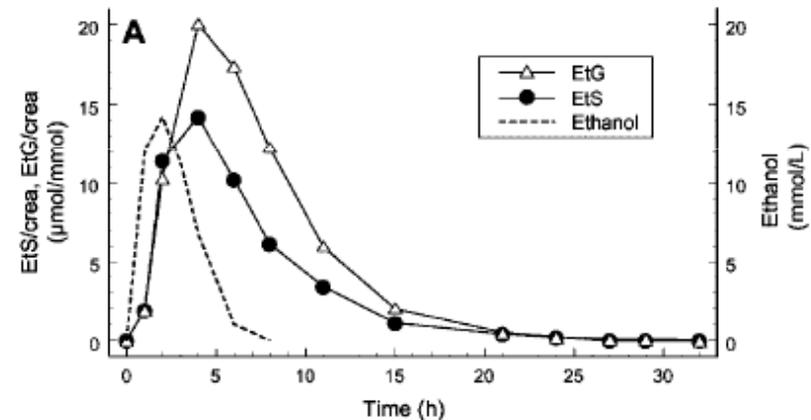
Nishikawa *et al.*, *J Chromatogr B*, 1999



Consumo recente di alcool

EtG/EtS nell'urina: perché?

EtG: ritrovato nell'urina fino a 80
ore dall'assunzione
EtS: fino a 30 ore



Helander e Beck, *Clin Chem*, 2004

- Monitoraggio di pazienti in trattamento
- Campionamento tardivo
- Discriminazione di produzione *in vitro* di EtOH
- Discriminazione di contaminazione (es. disinfettante)



EtG ed EtS nelle urine

- Attualmente non ci sono *cutoff* riconosciuti internazionalmente e soprattutto giuridicamente:
- Ogni laboratorio, a sua discrezione, ma soprattutto a sua esperienza fissa il cutoff che ritiene più adeguato.
- Cutoff maggiormente utilizzati per EtG nelle urine:
 - 100 ng/ml con metodica immunoenzimatica
 - 100 ng/ml con metodica di conferma (LC/GC-MS/MS)
 - 500 ng/ml con metodica di conferma (LC/GC-MS/MS)
 - 1000 ng/ml con metodica di conferma (LC/GC-MS/MS)



EtG ed EtS nelle urine

- Esistono in letteratura evidenze scientifiche di false positività dovute a:
 - Utilizzo di colluttori e disinfettanti del cavo orale (esempio Listerine)
 - Utilizzo di disinfettanti a base alcolica delle mani (esempio Amuchina)
 - Infezioni delle vie urinarie



Abuso cronico: *markers* tradizionali

- Vari parametri biochimici ed ematologici sono influenzati dall'eccessivo uso di EtOH:
- Enzimi epatici:
 - gamma glutamiltrasferasi (GGT)
 - aspartato aminotrasferasi (AST)
 - alanina aminotrasferasi (ALT)
- Volume corpuscolare medio (MCV)



Abuso cronico: *markers* tradizionali

GGT: gamma glutamiltrasferasi

- Misura clinica della funzionalità o del danno epatico
 - Presente anche in reni, cervello, milza, pancreas, cuore
 - Aumenta in risposta all'esposizione a farmaci
 - Influenzato da età e BMI
- non specifico per l'eccessivo consumo di EtOH (solo il 30-50% degli alcolisti ha un livello di GGT elevato)



Abuso cronico: *markers* tradizionali

AST (SGOT) e ALT (SGPT)

- Enzimi degli epatociti coinvolti nel metabolismo degli aminoacidi
 - Indicatori sensibili del danno alle cellule epatiche
- Indicatori non del consumo, ma del danno epatico da EtOH (influenzati da età, farmaci, variabilità genetica e ambientale, caffè)



Abuso cronico: *markers* tradizionali

Enzimi epatici (GGT, AST, ALT)

- Complicazioni dell'eccessivo consumo di EtOH
- Diverse condizioni influenzate dall'EtOH
- Monitoraggio dei cambiamenti durante la dismissione
- Buon *feedback* del paziente
- Poco costosi, diffusa automazione dell'analisi
- SE (sensibilità) e SP (specificità) limitate



Abuso cronico: *markers* tradizionali

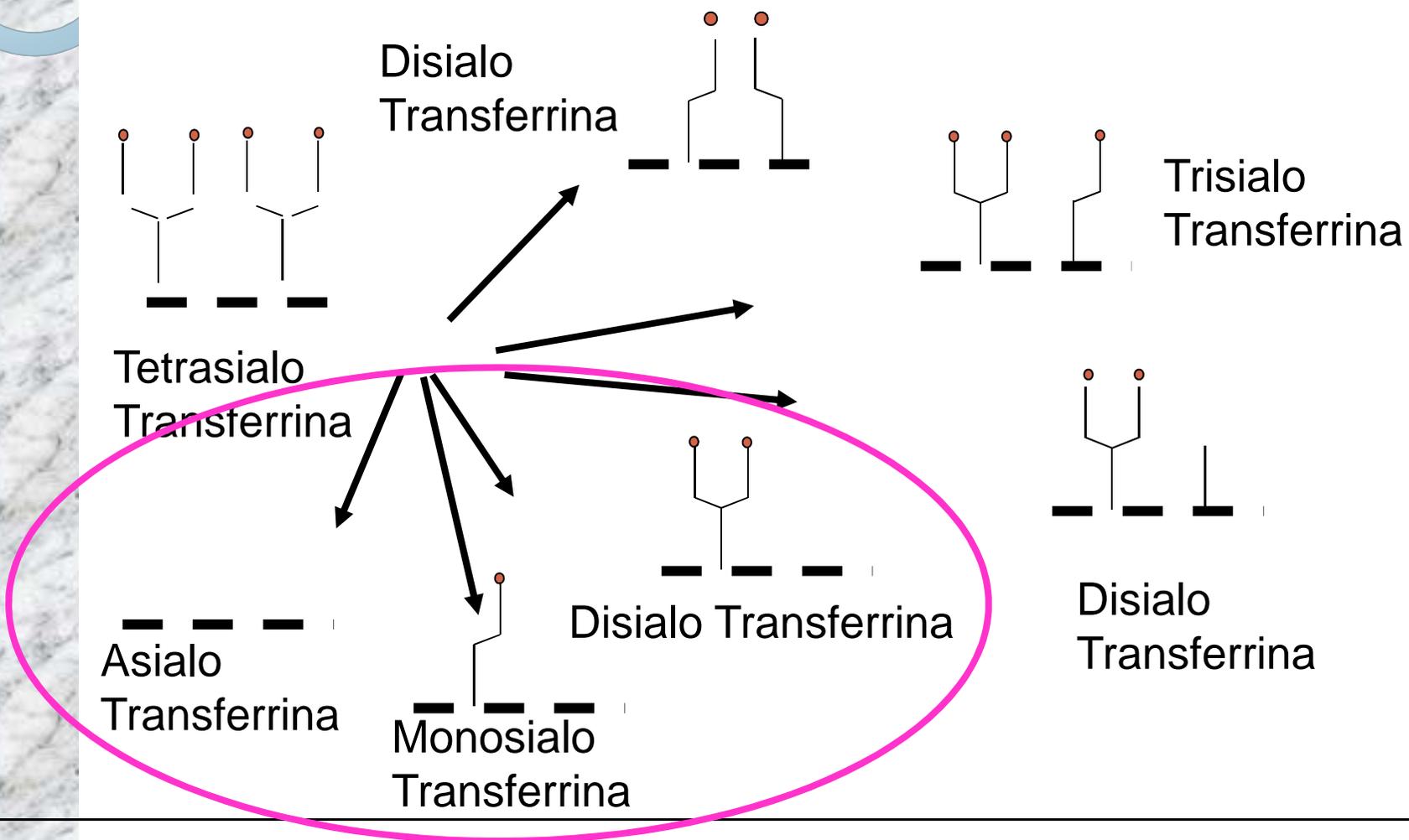
MCV: volume corpuscolare medio

- Volume medio dei globuli rossi
- Aumenta con l'uso eccessivo di EtOH
- MCV aumenta nel danno epatico
- Uso eccessivo continuo di EtOH
- Aumento sensibile dopo mesi (120 gg di vita)
- Può aumentare dopo la dismissione



Abuso cronico: *markers* tradizionali

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT)





Abuso cronico: *markers* tradizionali

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT)

- CDT aumenta con consumo di EtOH > 60 g/die per 7–10 giorni
- Emivita di eliminazione dei livelli elevati di CDT dal sangue: 14–17 giorni
- CDT approvato dalla FDA come test diagnostico per la determinazione di elevato consumo di alcol



Abuso cronico: *markers* tradizionali

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT)

- Isoelettrofocusing gel
- LC a immunoaffinità accoppiata con ESI-MS
- HPLC a scambio ionico
- Elettroforesi capillare
- Cromatografia a scambio anionico accoppiata con radioimmunoassay (CDTect kit)
- Cromatografia a scambio anionico accoppiata con immunoassay enzimatico (%CDT kit)
- Immunonefelometria (N Latex)
- Tecniche diverse si correlano molto bene (CDT espressa come percentuale della transferrina totale)



Abuso cronico: markers tradizionali

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT)

- Non interferiscono con CDT:
 - ipertensione
 - asma/bronchite
 - diabete mellito
 - adiposi/disordini del metabolismo dei lipidi
 - angina pectoris
 - depressione
 - disordini del tratto digestivo



Abuso cronico: markers tradizionali

TRANSFERRINA CARBOIDRATO CARENTE (CDT)

- 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



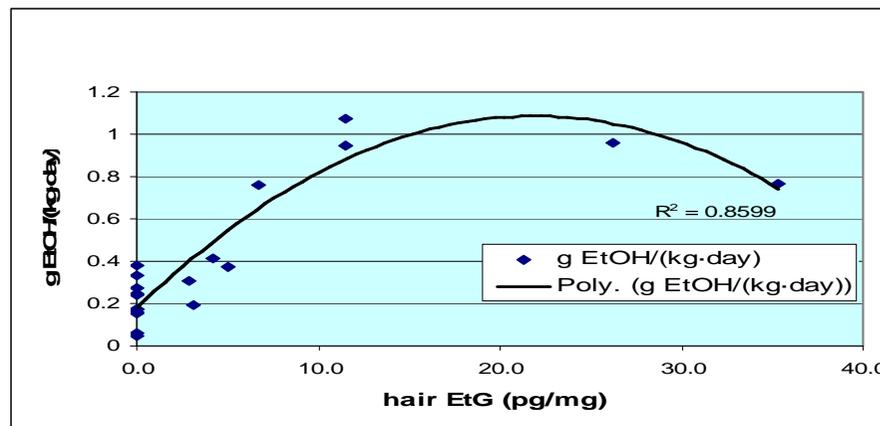
Abuso cronico: EtG nel capello

Campioni di capelli analizzati:

- A.22 alcolisti all'inizio della terapia in reparto ospedaliero;
- B.21 bevitori moderati (uso di alcool giornaliero dichiarato – EDI – <60 g/die);
- C.7 astemi.

Risultati:

- 21 campioni positivi per HEtG nel gruppo A (l'unico negativo dichiarava 6 settimane di astinenza prima del ricovero);
- 7 campioni positivi e 14 negativi nel gruppo B;
- Buona correlazione osservata tra HEtG ed EtOH/(Kg*die);
- Tutti risultati negativi i capelli degli astemi.



Politi L, Morini L, Leone F, Poletti A.
[Ethyl glucuronide in hair: Is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption?](#)
Addiction. 2006 Oct;101(10):1408-12.



Abuso cronico: EtG nel capello

Valutazione del *cut-off* – protocollo

98 volontari: astemi, bevitori moderati e alcolisti all'inizio della terapia riabilitativa;

Somministrazione di un questionario anonimo per stimare l'EDI e registrare dati (es. età, sesso, BMI, colore e trattamenti igienici/cosmetici dei capelli) potenzialmente correlati con l'HEtG;

Analisi dell' HEtG nei 3 cm prossimali.

Morini L, Politi L, Poletti A.

[Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking.](#)

Addiction. 2009 Jun;104(6):915-20. Epub 2009 Apr 9.



Abuso cronico: EtG nel capello

Valutazione del *cut-off* – risultati

EDI stimato	Media EtG pg/mg	Dev.St	n	Mediana
0-59	9.6	20.7	23	0
60-119	124.8	176.0	25	64.1
120-179	198.7	181.4	18	179.2
≥180	254.5	345.3	32	123.8

Morini L, Politi L, Poletti A.

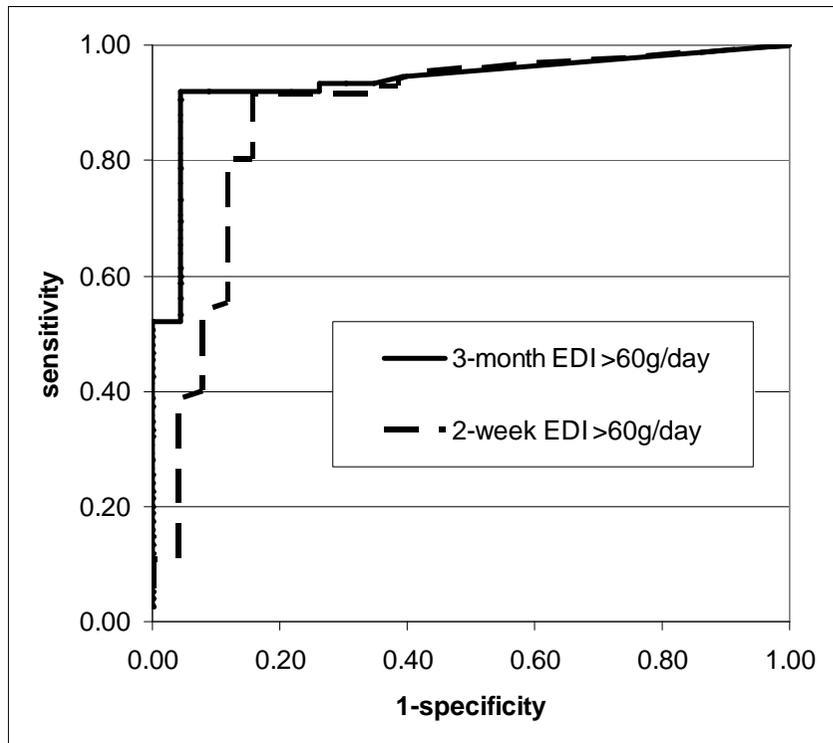
[Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking.](#)

Addiction. 2009 Jun;104(6):915-20. Epub 2009 Apr 9.



Abuso cronico: EtG nel capello

Valutazione del *cut-off* – risultati



Curva ROC per la valutazione del *cut-off* dell'HEtG (miglior risultato ottenuto alla conc. di 27 pg/mg (SE=0.92, SP=0.96).

Morini L, Politi L, Poletti A.

[Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking.](#)

Addiction. 2009 Jun;104(6):915-20. Epub 2009 Apr 9.



Abuso cronico: EtG nel capello

HEtG e CDT a confronto: protocollo

- 86 volontari tra cui astemi (n=5), bevitori moderati (n=16) e alcolisti (n=65);
- Somministrazione di un questionario anonimo per stimare l'EDI e registrare dati (es. età, sesso, BMI, colore e trattamenti igienici/cosmetici dei capelli) potenzialmente correlati con l'HEtG;
- Analisi dell'HEtG nei 3 cm prossimali;
- Analisi della CDT mediante:
 - Metodo immunonefelometrico N-Latex (Dade-Behring) (n=30);
 - Metodo HPLC (n=56).

Morini L, Politi L, Acito S, Groppi A, Polettini A.

[Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption.](#) Forensic Sci Int. 2009 Jul 1;188(1-3):140-3. Epub 2009 May 1.



Abuso cronico: EtG nel capello

HEtG e CDT a confronto: risultati

Sensibilità (SE) e specificità (SP) indicate come proporzione di veri positivi (VP) e veri negativi (VN);

<i>Marker</i>	<i>Cut-off</i> (EDI60 g/die)	EDI 2-settimane	EDI 2-settimane	EDI 3-mesi	EDI 3-mesi
		SE	SP	SE	SP
HEtG	27 pg/mg	1.00	0.93	1.00	1.00
CDT*	2,5%	0.44	0.93	0.47	1.00
CDT*	2.2%	0.50	0.86	0.53	0.92

* CDT determinata con metodo immunonefelometrico.

Morini L, Politi L, Acito S, Groppi A, Poletti A.

[Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption.](#) Forensic Sci Int. 2009 Jul 1;188(1-3):140-3. Epub 2009 May 1.



Abuso cronico: EtG nel capello

HEtG e CDT a confronto: risultati

Sensibilità (SE) e specificità (SP) indicate come proporzione di veri positivi (VP) e veri negativi (VN);

<i>Marker</i>	<i>Cut-off</i> (EDI60 g/die)	EDI 2-settimane	EDI 2-settimane	EDI 3-mesi	EDI 3-mesi
		SE	SP	SE	SP
HEtG	27 pg/mg	1.00	0.93	1.00	1.00
CDT*	2,5%	0.44	0.93	0.47	1.00
CDT*	2.2%	0.50	0.86	0.53	0.92

* CDT determinata con metodo HPLC.

Morini L, Politi L, Acito S, Groppi A, Poletti A.

[Comparison of ethyl glucuronide in hair with carbohydrate-deficient transferrin in serum as markers of chronic high levels of alcohol consumption.](#) Forensic Sci Int. 2009 Jul 1;188(1-3):140-3. Epub 2009 May 1.



Abuso cronico: FAEEs nel capello

Esteri etilici degli acidi grassi (FAEEs)

- Prodotti di esterificazione di acidi grassi liberi endogeni ed etanolo o di acidi grassi coniugati con l'Ac/CoA.
- Quattro FAEEs vengono determinati nel capello per la diagnosi di abuso cronico di alcool
- Hanno mostrato buona sensibilità e specificità diagnostica
- Presenza di falsi positivi in un campione di soggetti astemi



Abuso cronico: dati

- Attualmente il Laboratorio di Tossicologia Forense dell'Università di Pavia svolge circa 1000 determinazioni di EtG nel capello l'anno.
- Le analisi a carattere clinico e forense sono tutte corredate del quadro ematico unitamente al valore della CDT.
- Vengono dati due diversi *cut-off* interpretativi.



Abuso cronico: dati

- Se l'EtG è inferiore a 4 pg/mg il soggetto è considerato astinente o bevitore occasionale di alcool
- Se l'EtG è compreso tra 4 e 30 pg/mg il soggetto è considerato bevitore moderato o sociale
- Se l'EtG è maggiore di 30 pg/mg il soggetto è considerato a rischio abuso cronico di alcool



Abuso cronico: HEtG e HFAEEs

- Nel 2009 in occasione del meeting internazionale della Society of Hair Testing svoltosi a Roma si è redatto un consensus per l'utilizzo dei FAEEs e dell'EtG nei capelli quali marcatori dell'abuso cronico di alcool. In occasione del meeting di Chamonix del 2011 è stato confermato lo stesso *cut-off*.
- Una concentrazione di EtG pari a 30 pg/mg è stata stabilita quale *cut-off* discriminante un consumo sociale di alcool da un abuso cronico.
- Una concentrazione totale dei 4 FAEEs ricercati nei capelli pari a 0.5 ng/mg è stata stabilita quale *cut-off* discriminante un consumo sociale di alcool da un abuso cronico.



Grazie dell'attenzione!!!