

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Nuovi e vecchi marcatori di abuso alcolico

Dr Delfino Tavanti

Laboratorio Analisi ASL8 Arezzo
Tossicologia

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Obiettivo di questo intervento è:

Illustrare e confrontare le caratteristiche
di vecchi e nuovi marcatori di abuso
alcolico, con particolare riferimento a
CDT e ETG

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Marcatore = indicatore

Sostanza la cui concentrazione o presenza indica un particolare stato dell'organismo (una patologia o una esposizione a certe sostanze)

Il marcatore ideale dovrebbe essere semplice da dosare, stabile, ben correlato con l'esposizione o la patologia, positivo solo nei casi per cui è chiesto e negativo in tutti gli altri.

I marcatori sono caratterizzati da due grandezze statistiche Sensibilità e Specificità

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

SENSIBILITÀ :

percentuale di soggetti che hanno una data patologia o sono esposti alla sostanza risultanti positivi al marcatore

POPOLAZIONE = ALCOLISTI

MARKER = γ GT

OSSERVAZIONE = il 60% degli alcolisti hanno la γ GT alterata

SENSIBILITÀ % = 60%

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

SPECIFICITÀ:

Percentuale di soggetti, tra quelli con marker positivo, che hanno quella data patologia o sono esposti alla sostanza

POPOLAZIONE = persone con γ GT positiva

OSSERVAZIONE = il 40% delle persone con γ GT positiva sono alcolisti

SPECIFICITÀ = 40%

Nessun marcatore è sensibile o specifico al 100 %

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



L'alcolismo è una patologia grave, tanto che il 20-30% dell'intera spesa sanitaria è riconducibile all'assunzione di alcol.

L'alcol fa aumentare considerevolmente il rischio di tumori epatici

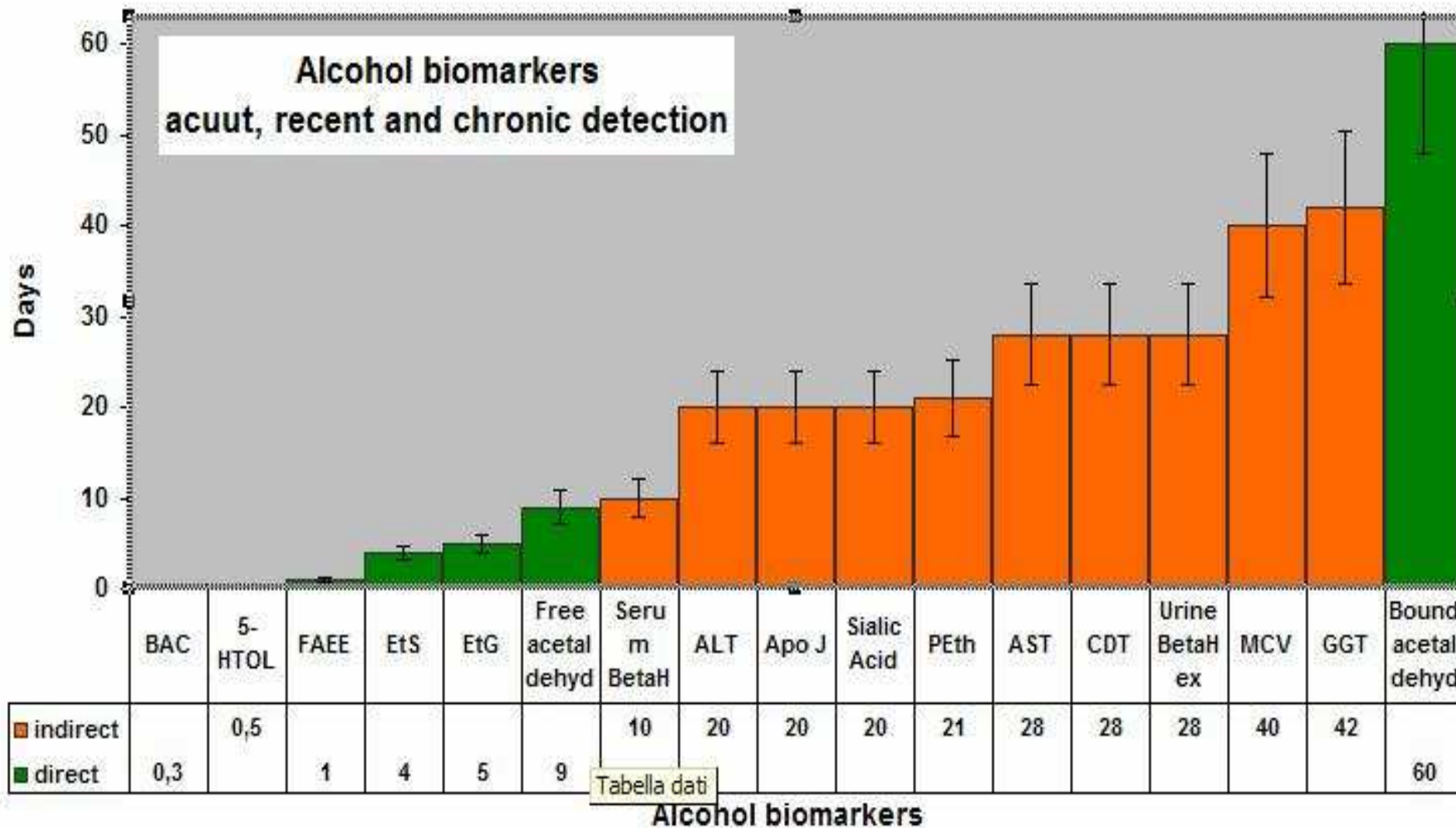
L'abuso di alcol si sta diffondendo tra i giovani; sono tendenzialmente astemi ma diventano forti bevitori il fine settimana.

La massima quantità di alcol assumibile senza rischi è zero g/die

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

DIRETTI Sostanze legate alla eliminazione/metabolismo alcool	INDIRETTI Sostanze modificate dall'abuso recente o cronico dell'alcool
Alcool (sangue-urine-espurato)	GammaGT
Acetaldeide	Transaminasi (AST/ALT)
Esteri Etilici Acidi grassi (FAEE)	Volume Corpuscolare Medio (MCV)
Fosfatidil Etanolo (PEth)	Trasferrina Carboidrato Carente (CDT)
Etilglucuronide (EtG)	Apolipoproteina J
Etilsolfato (EtS)	5-Idrossitriptofolo (5-HTOL)

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Ma quelli più usati sono i seguenti, forse perché di semplice esecuzione:

CONSUMO RECENTE: ETANOLO SU SIERO
ETANOLO SU URINE,
ETIL GLUCORONIDE-u

ETILISMO CRONICO: γ GT, ALT-GPT, MCV, CDT

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Divisione della popolazione vs alcol

NON BEVITORI: assumono alcol solo in poche occasioni e ogni volta non più di 15g

BEVITORI MODERATI: assumono, se uomini meno di 210 g/settimana di alcol, se donne meno di 140 g/settimana

FORTI BEVITORI: assumono, se uomini più di 210 g/settimana di alcol, se donne più di 140 g/settimana

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Per calcolare i g di alcol assunti a settimana si può usare questa formula:

$$\frac{\text{n. drink/d} \times \text{volume} \times \text{grado alcolico} \times 0,8 \times 7}{100}$$

n. drink/d = bicchieri al giorno

volume = volume di ogni drink

grado alcolico della bevanda in V/ V

0,8 = densità dell'etanolo anidro

7 = giorni della settimana

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Se una persona beve 4 bicchieri di vino di 12° al
giorno (80 mL ciascuno)

$$\frac{4 \times 80 \times 12 \times 0,8 \times 7}{100} = 215 \text{ g di alcol}$$

uomini < 210 g/s

donne < 140 g/s

**Secondo questa classificazione è facile essere
considerati forti bevitori**

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



In occidente l'assunzione di alcol fa parte delle
consuetudini sociali

In alcuni paesi: bere alcol è proibito, ma fumare
hashish è tollerato

L'etanolo si distribuisce equamente in tutti i
tessuti acquosi

È un depressante del SNC

E' assorbito velocemente ma il cibo ne rallenta
l'assorbimento

Ha emivita breve 2 – 14 ore

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

ELIMINAZIONE DELL'ETANOLO

Il 10 – 20 % è eliminato con urine e respiro

Il 80 – 90 % è metabolizzato a CO_2 e H_2O

Etanolo $\xrightarrow{\text{ADH}}$ aldeide acetica $\xrightarrow{\text{AldDH}}$ acido acetico
(tossica)

Acido acetico $\rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$

L'aldeide acetica é responsabile degli effetti
tossici dell'etanolo

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

La carenza o la bassa attività dell'Ald-DH determina l'intolleranza all'etanolo di alcune persone

Sono geneticamente carenti di Ald-DH:

- Le donne rispetto all'uomo
- Gli afro-orientali rispetto ai caucasici

Molti astemi sono metabolizzatori lenti di Ald-DH

La tolleranza all'alcol è fattore predisponente all'etilismo

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Azienda
USL 8
Arezzo

Servizio Sanitario della Toscana

mL ALCOL ASSUNTI	ALCOLEMIA g/L	STATO EBBREZZA
30 – 40	0.5 – 1.0	Stato di euforia e disinibizione A 1.0 g/L la probabilità di incidenti è 17 volte più grande che a 0.0 g/L
40 – 60	1.0 – 2.0	Loquacità, sonnolenza, deambulazione incerta, discorsi incoerenti, lingua legata
60 – 150	2.0 – 3.0	Nausea, vomito, vertigini, salivazione e sudorazione, stato confusionale, riflessi e movimenti lenti.
150 – 250	4.0 – 5.0	Coma profondo, complicazioni metaboliche, insufficienza respiratoria e circolatoria.
	> 4.20	Concentrazioni trovate in casi di morte

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Servizio Sanitario della Toscana

UTENTI	LIMITI
AUTISTI DI PROFESSIONE pat, C D E	0.00 g/L
NEOPATENTATI pat. B e fino 21 ANNI	0.00 g/L
PATENTE B Ritiro di patente 3-6 MESI	0,51 – 0,80 g/L
PATENTE B Ritiro di patente 6-12 MESI Arresto fino a 6 mesi	0,81 – 1,50 g/L
PATENTE B Ritiro di patente 1-2 ANNI Arresto fino a 2 anni	Più di 1,50 g/L
Pene in caso di incidente	raddoppio
Pene in caso di incidente con morti	ulteriore aggravio
Pene in caso di recidiva	ulteriore aggravio

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

**Quanto si può bere senza
superare i limiti di legge?**

1 BICCHIERE DI VINO A 12°
E' CIRCA 80 -100 mL

(12° = 12% V/V) E

CONTIENE CIRCA 10 g DI
ETANOLO

Con tre bicchieri e sei fuori



CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Metodi di misura dell'etanolemia

Etilometro

È l'unico strumento omologato che può essere usato in strada.

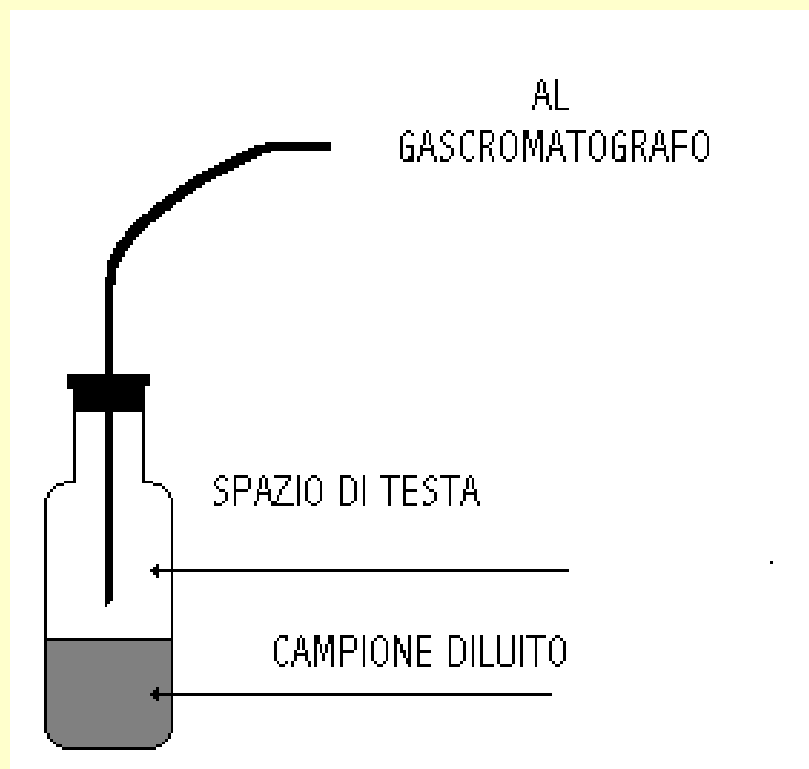
Il metodo non è invasivo. Si misura l'alcol nell'espirsto. Lo strumento moltiplica questa misura per un fattore di trasformazione.

Il valore visualizzato e stampato è la concentrazione (calcolata) nel sangue.

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Metodi di misura dell'etanolemia in laboratorio

- **Gas Cromatografo** con spazio di testa e rivelatore FID o MS, unico metodo ammesso per scopi legali

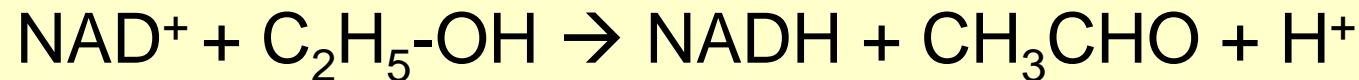


CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Metodi di misura dell'etanolemia in laboratorio

Metodi enzimatici

ADH



Il NADH assorbe a 340 nm il NAD⁺ no

Metodo non specifico

Metanolo < 0.1 %

n-propanolo 10.7 %

n-butanolo 1.7 %

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



L'alcolemia è il miglior parametro per valutare lo stato di ebbrezza.

Il prelievo va fatto subito perché in poche ore l'etanolemia scende a zero

L'alcoluria non serve a valutare lo stato di ebbrezza; l'etanolo può essere presente in vescica e assente nel sangue

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

ETILGLUCORONIDE ETG

Lo 0.02% dell'etanolo escreto con le urine è glucuronato

La produzione di ETG dipende dall'attività glucuronidasica dell'individuo che varia molto da persona a persona

L'ETG, nelle urine, rimane più al lungo dell'etanolo

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

ETG: è assente negli astemi

Il picco della concentrazione nel sangue si ha dopo circa 5 ore dalla ingestione di etanolo

Dopo una bevuta l'ETG si ritrova

- nel sangue fino a 14 ore
- nelle urine fino a 40 – 80 ore (2-3 giorni)

(Dipende dalla quantità di etanolo assunta)

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

I cibi cotti nel vino sono fonti di ETG

L'escherichia coli, che contiene glucoronidasi, idrolizza l'ETG eventualmente presente

In campioni di urina sterile l'ETG è molto stabile ma, se si suppone contaminazione batterica è meglio congelarle o aggiungere un conservante.

L'ETG è stato ritrovato in un cadavere riesumato dopo da 20 anni

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

- L'ETG-u può essere dosato con metodi tipo LC-MS
- Lo stesso metodo può essere usato per dosare l' ETG nel sangue e altri liquidi biologici
- L'ETG è dosabile anche nei capelli

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Per le urine si può usare anche un metodo immunochimico semplice e sensibile.

Le specifiche di questo metodo sono

- Minima quantità dosabile 0,1 mg/L
- CUT-OFF = 0,5 mg/L

Il reattivo è particolarmente stabile e affidabile
Non sono stati trovati casi di falsi positivi

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

L' ETG-u serve a controllare il consumo recente di alcol

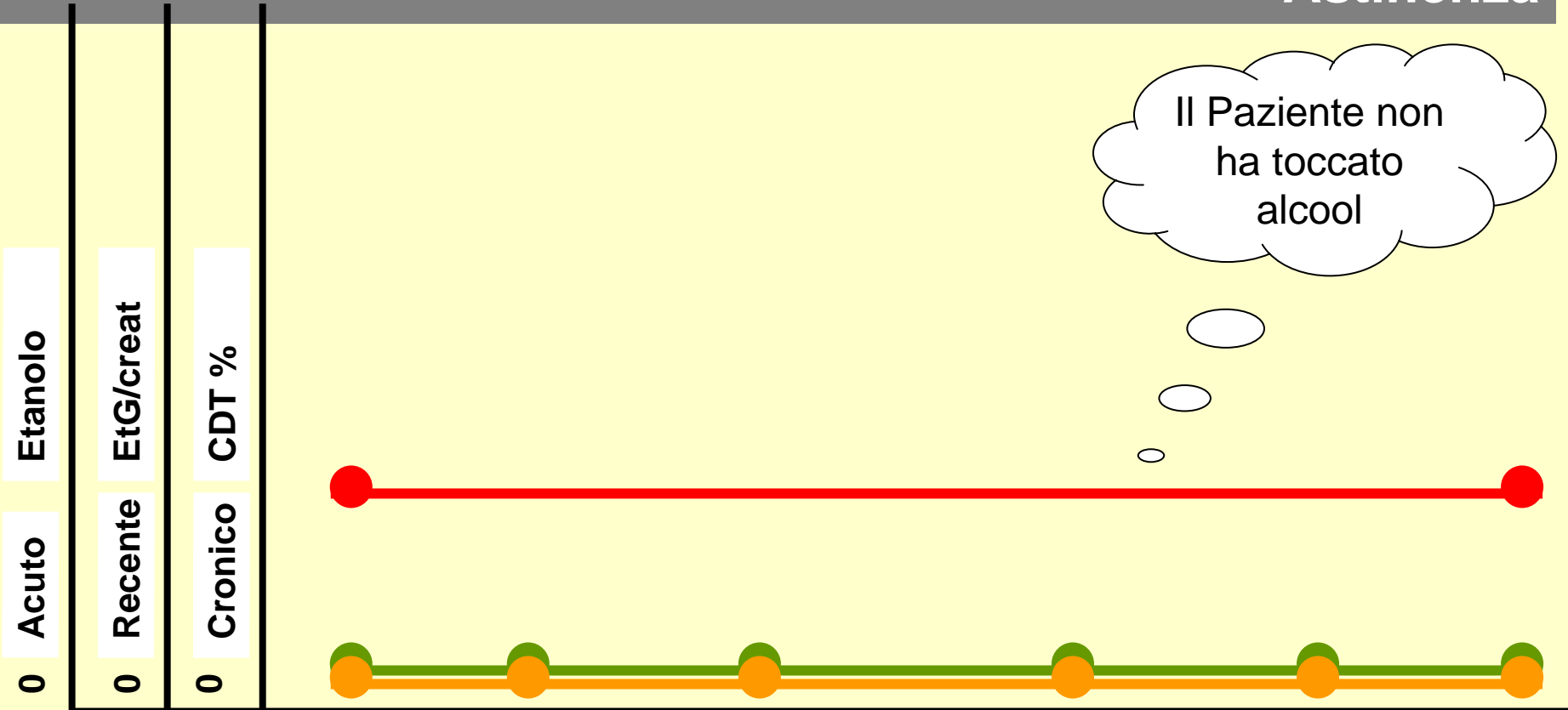
Il valore di ETG-u da anche alcune indicazioni di quanto beve una persona

Per minimizzare le variazioni di tono dei campioni l'ETG-u dovrebbe essere espresso per grammo di creatinina

I dati ottenuti dosando l'ETG sono affidabili solo se si controlla bene la minzione

Astinenza

Il Paziente non ha toccato alcool

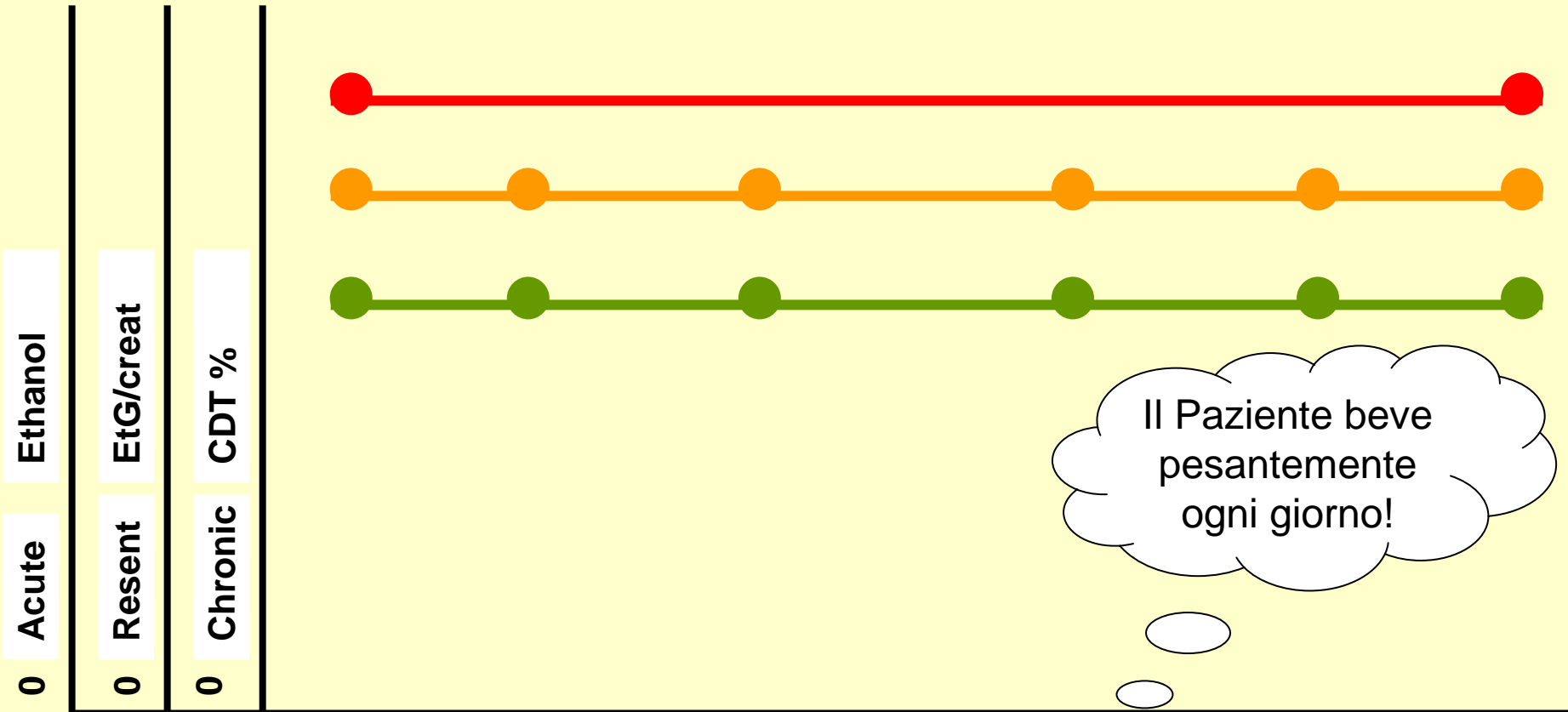


Test su sangue	CDT												CDT
Giorni settimana	L	M	M	G	V	S	D	L	M	M	G	V	
Test su urine	EtG		EtG		EtG		EtG		EtG		EtG		EtG
08 10 2010	Alc		Alc		Alc		Alc		Alc		Alc		Alc
Test su urine	Alc		Alc		Alc		Alc		Alc		Alc		Alc

Market use alcolico

30

Abuso cronico di Alcool

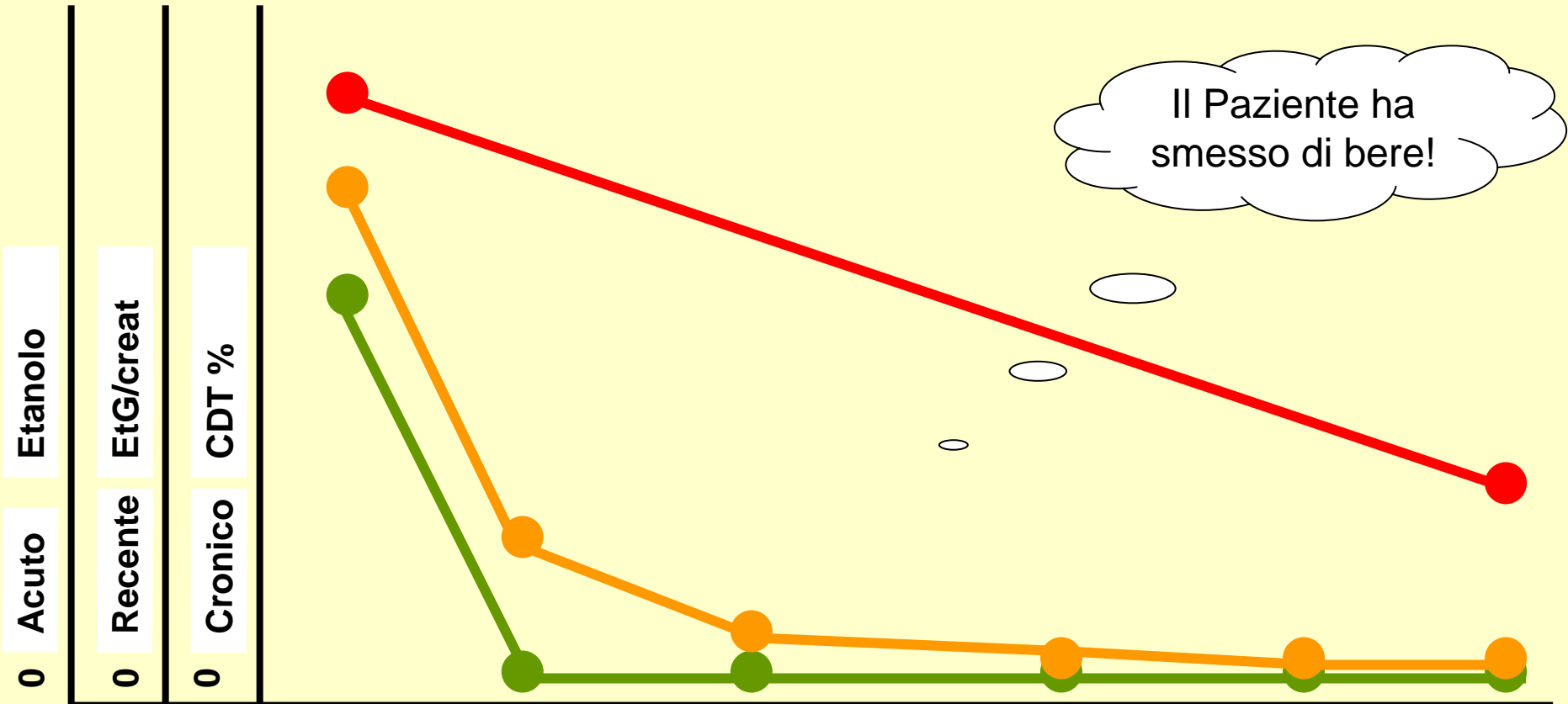


Il Paziente beve pesantemente ogni giorno!

Test su sangue	CDT													CDT
Giorni settimana	L	M	M	G	V	S	D	L	M	M	G	V		
Test su urine	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	
Urine Testing Test su urine	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	

Marker di abuso alcolico

Dissuefazione dall'Alcool

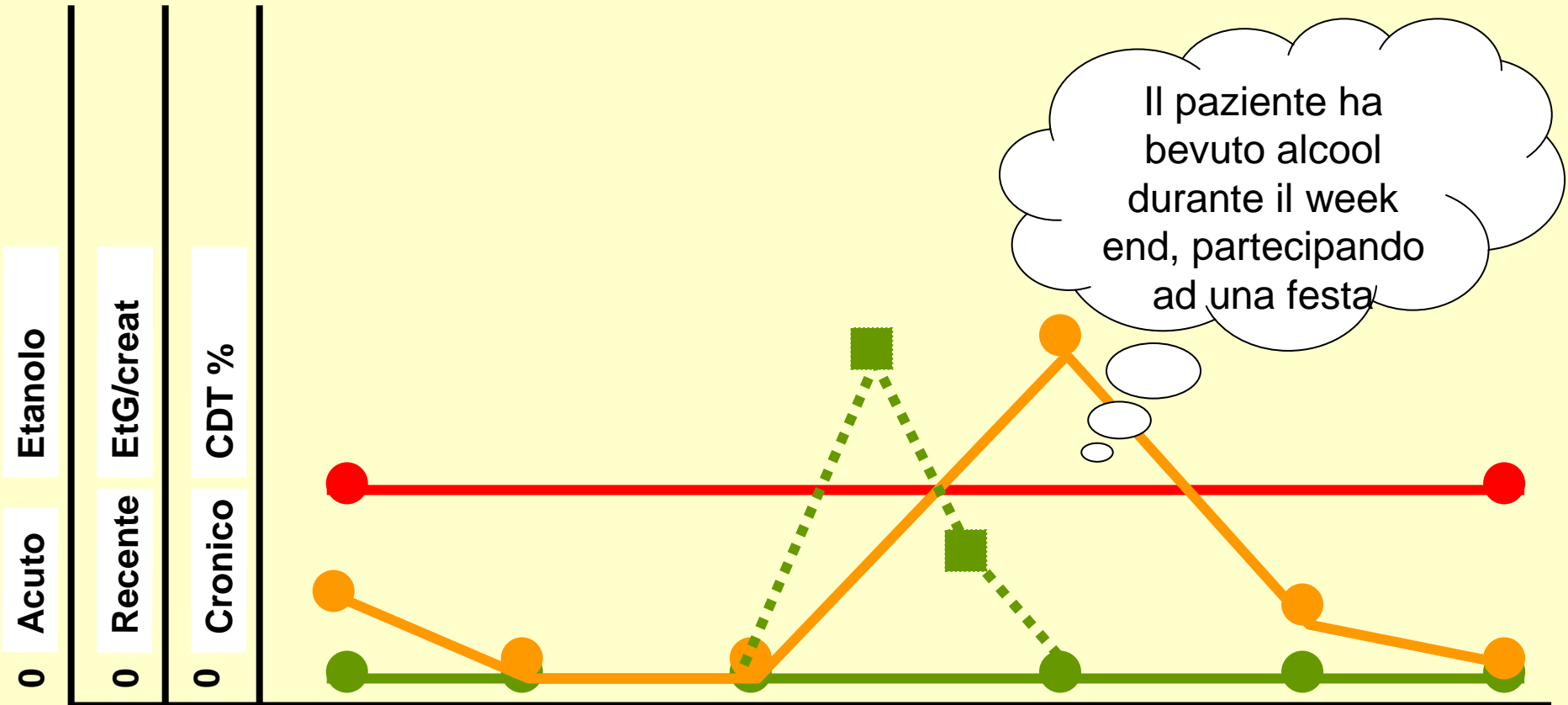


Il Paziente ha smesso di bere!

Test su sangue	CDT											CDT
Giorni settimana	L	M	M	G	V	S	D	L	M	M	G	V
Test su urine	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG	EtG
08 10 2010	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc
Test su urine	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc	Alc

Market use alcoholic

Alcohol use / social drinker/bevitore occasionale



Test su sangue	CDT												CDT
Giorni settimana	L	M	M	G	V	S	D	L	M	M	G	V	
Test su urine	EtG	EtG		EtG			EtG	EtG	EtG			EtG	
08 10 2010	Alc	Alc		Alc			Alc	Alc	Alc			Alc	
Test su urine													

Market use alcoholic

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



VECCHI MARCATORI ETILISMO CRONICO

γ GT: aumenta in molte affezioni epatiche ma anche in caso di abuso alcolico; in assenza di danno epatico ritorna ai livelli normali con l'astinenza.

ALT-GPT: enzima principalmente epatico che aumenta in tutte le affezioni del fegato

MCV: aumenta nell'alcolismo cronico soprattutto se associato a stati di malnutrizione

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Di questi parametri il più affidabile è sicuramente la γ GT.

SENSIBILITA' % = 65 % \pm 10

SPECIFICITA' % = 40 % \pm 7

Entrambi i parametri dipendono dal sesso e dalle concomitanti patologie e relative terapie.

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

CDT

NUOVO MARCATORE ABUSO CRONICO

Trasferrina carboidrato carente

Trasferrina carboidrato deficiente

La transferrina è una β 1-glicoproteina ;

Trasporta il ferro +3, due atomi per molecola

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

È accreditata di notevole **eterogeneità**

- Di catena proteica
- Di catena glucidica
- Numero molecole di acido sialico terminali attaccati alla catena glucidica
- Varanti genetiche

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

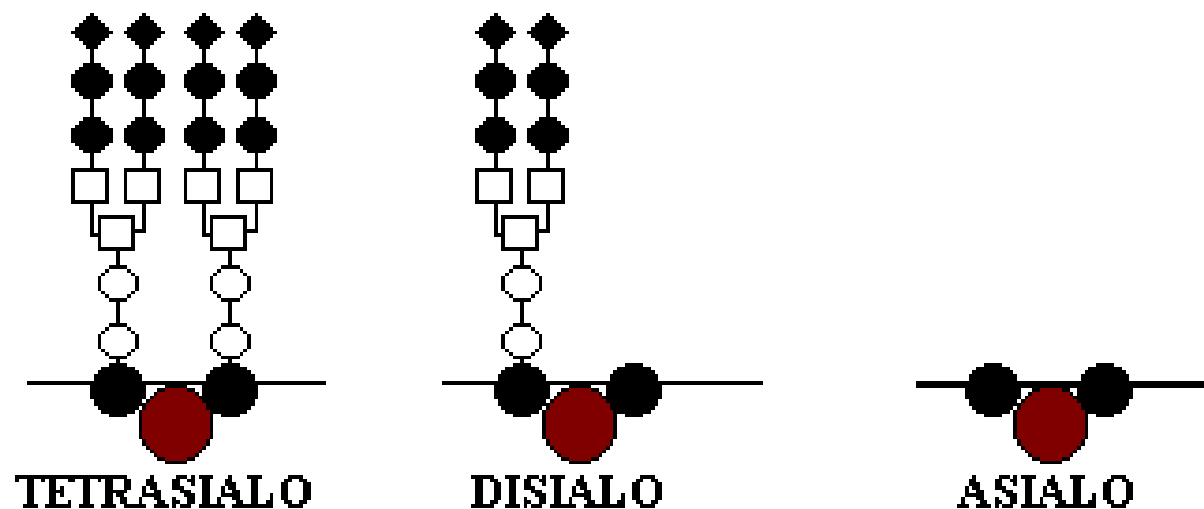
Le forme sialiche vanno dalla asialo alla octasialo

Negli anni 70 Helena Stibler evidenziò che la forma disalo aumenta nel LIQUOR dei forti bevitori

Stessa cosa avviene con la disialotrasferrina sierica

I livelli di disialotresferrina tornano normali, se si riesce a restare sobri, in poco tempo 15 – 30 giorni

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



- ◆ **Acido sialico**
- **N acetilglucosamina**
- **Aminoacido**
- **Mannoso**
- **Galattoso**
- **Ferro**

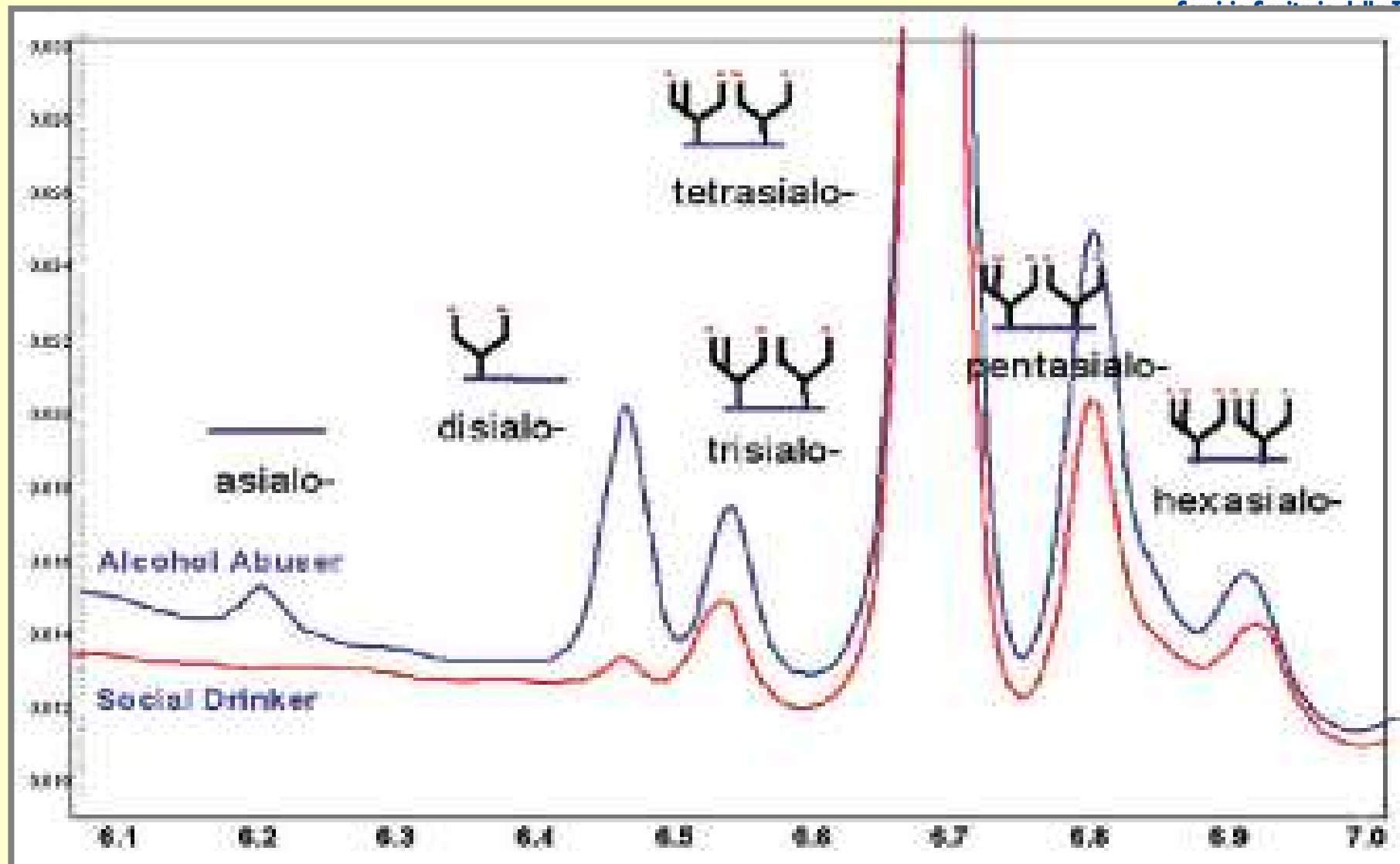
CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

- Sono possibili le seguenti forme
- Asialotrasferrina di norma assente
- Monosialotrasferrina di norma assente
- Disialotrasferrina < 2 %
- Trisialotrasferrina 4.5 - 9 %
- Tetrasialotrasferrina 64 - 80%
- Pentasialotrasferrina 12 - 18%
- Esiasialotrasferrina 1 - 3%
- Eptasialotrasferrina 1 - 1,5 %
- Octasialotrasferrina di norma assente

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Azienda
USL 8
Arezzo



08 10 2010

Marker di abuso alcolico

41

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



Non è chiaro il motivo dell'aumento della disialotrasferrina quando si assume alcol.

La disialotrasferrina aumenta se l'individuo beve più di 50-80 g di etanolo al giorno per almeno 2 settimane

La asialotrasferrina è molto rara da trovare ma è altamente specifica e sensibile per l'abuso alcolico > 92%. E' presente nei fortissimi bevitori

Le forme monosialo e trisialo non hanno significato diagnostico

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



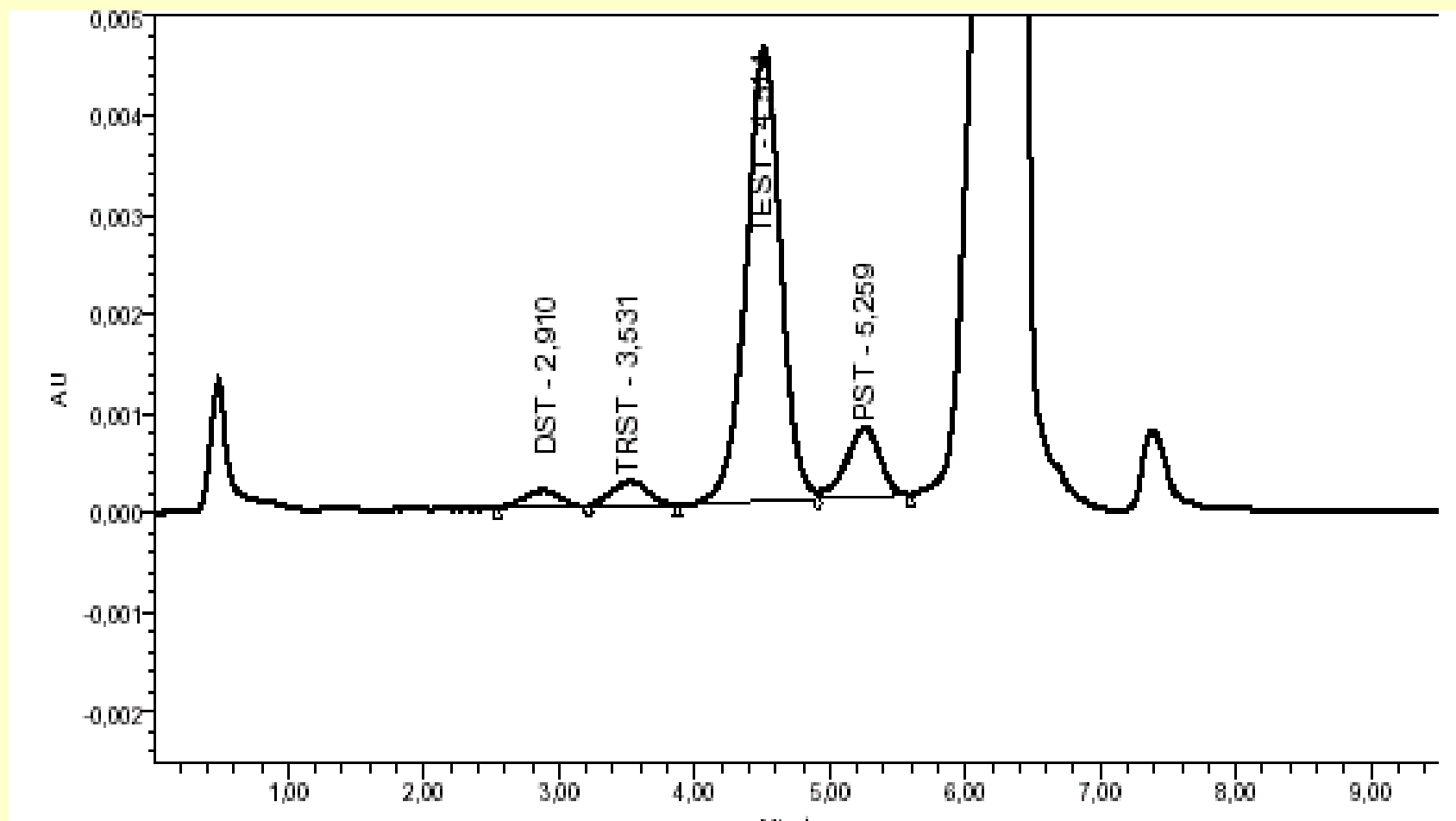
Per l'analisi si deve procedere prima alla saturazione della transferrina con Fe^{+3} e poi alla precipitazione delle lipoproteine.

Per la separazione cromatografica si usa una colonna a scambio ionico (SAX) e un gradiente salino binario o ternario, con lettura in UV-VIS a 470 nm

Nei materiali di riferimento in commercio non sono presenti la asialo e la monosialo e questo rende difficile la loro identificazione.

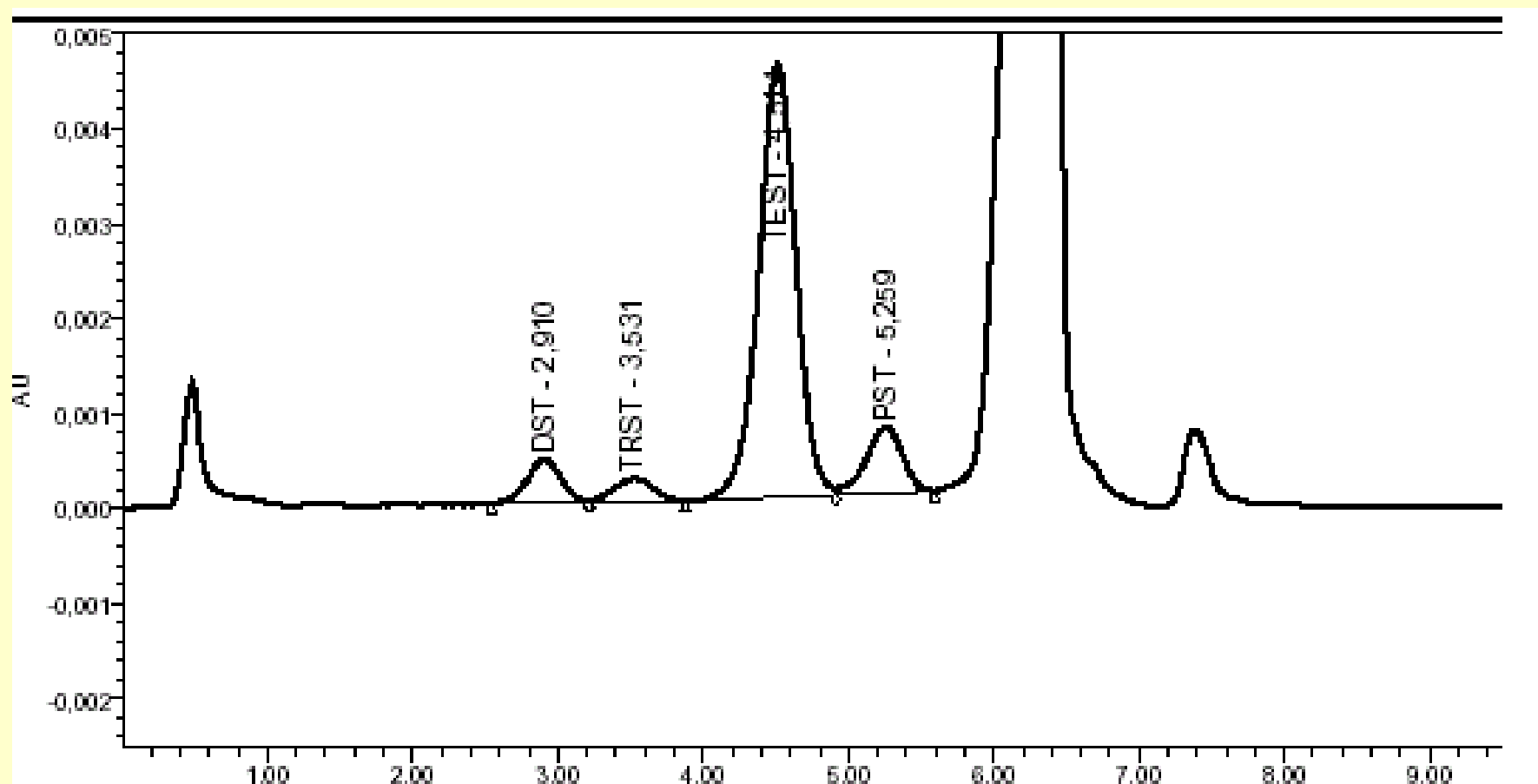
CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Disialotrasferrina normale



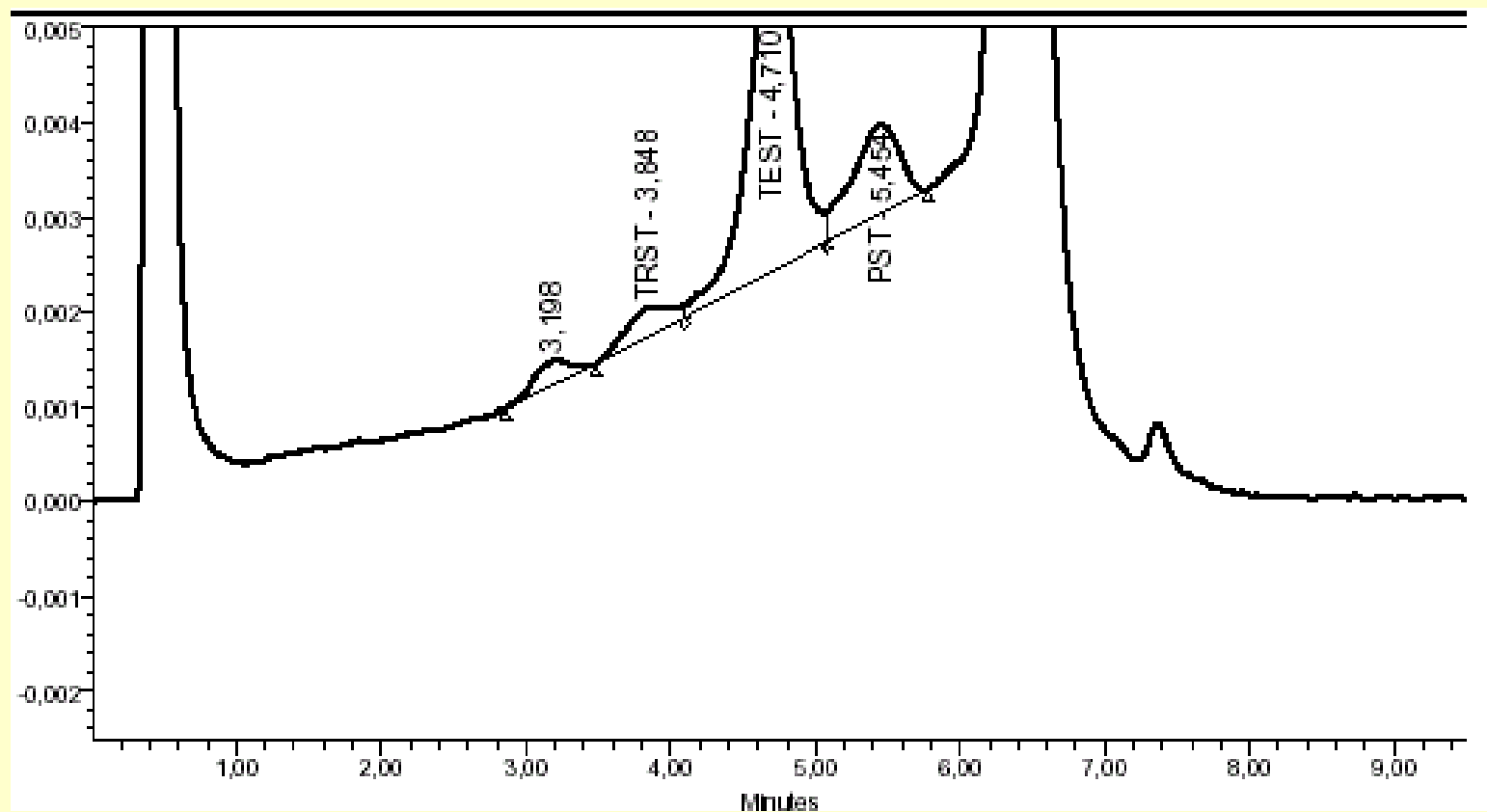
CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Disialotrasferrina positiva



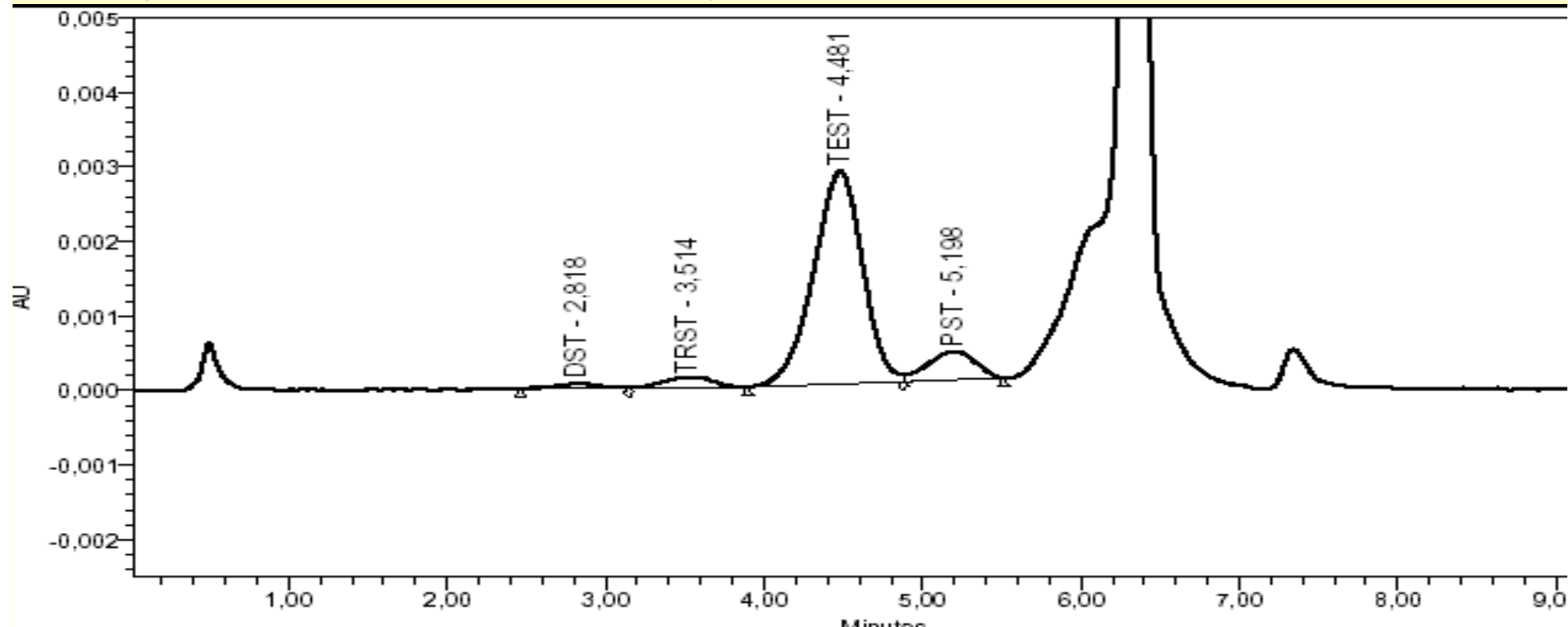
CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Sieri emolisati o itterici o lipemici interferiscono irrimediabilmente con l'analisi.



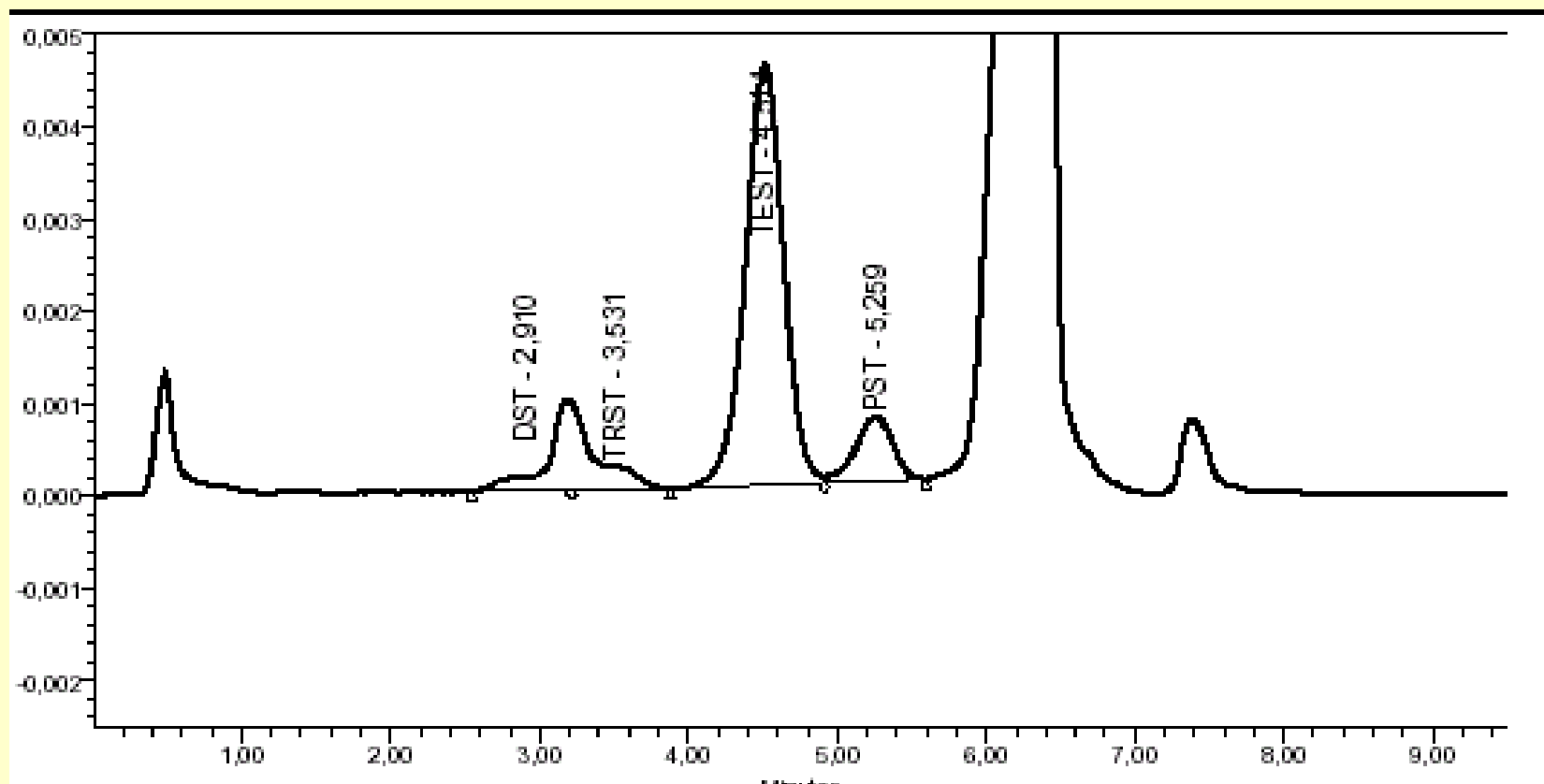
CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Con trasferrina totale molto bassa la CDT è meno significativa perché si pongono problemi di sensibilità (è bassa anche la CDT).



CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Occorre prestare attenzione alle varianti genetiche perché possono essere confuse per disialotrasferrina.



CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Il valore della CDT è espressa come percentuale vs la transferrina totale

$$\text{CDT\%} = \frac{(\text{AST} + \text{MST} + \text{DST}) \times 100}{\text{TASFERRINA TOTALE}}$$

E' stato proposto anche

$$\text{DST\%} = \frac{\text{DST} \times 100}{\text{TASFERRINA TOTALE}}$$

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Calcolo della CDT

	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	AST	1,377			
2	MST	1,583			
3	DST	2,910	7323	6,99	451
4	TRST	3,531	4498	4,29	240
5	TEST	4,514	80960	77,28	4565
6	FST	5,259	11979	11,43	691

$$\begin{aligned} &6,99 + \\ &4,49 + \\ &77,28 + \\ &\underline{11,43} = \\ &100,19 \end{aligned}$$

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

La CDT aumenta anche in casi di una di rare malattie congenite con difetto di glicosazione

Malattie epatiche sembrano non interferire con la produzione di CDT

Alcune varianti genetiche della transferrina producono forme che possono essere confuse col la CDT

I limiti decisionali della CDT variano con il metodo analitico utilizzato per cui ogni laboratorio dovrebbe elaborare i propri

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

I metodi analitici per dosare la CDT sono tre

- **HPLC** cromatografia ad alte prestazioni
- **EC** elettroforesi capillare
- Metodo immunometrico diretto

I primi due dosano tutte le isoforme e rivelano anche quelle anomale

Il terzo dosa solo la disialo. È necessario anche dosare la transferrina totale per poter calcolare la CDT%. Le forme anomale sfuggono. Il metodo è usato dai i laboratori con grossi numeri.

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

Valori attesi di CDT

Non bevitori: media = 1,14%

Bevitori moderati: media = 1,34%

Forti bevitori: media = 2,25%

Cut- off per metodi separativi → 1,8 – 2,0 %

Cut- off per metodo immunochimico → 2,5 %

Il cut-off è legato al metodo e allo strumento

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA

SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA

	CDT %	γ GT %
Uomo con danno epatico	83,6	31,6
Uomo senza danno epatico.	94.2	24.1
Donna con danno epatico	96,4	36,6
Donna senza danno epatico	91,9	50,0

CORSO DI AGGIORNAMENTO IN TOSSICOLOGIA



CONCLUSIONI

I marcatori di abuso alcolico sono tanti ma solo pochi sono entrati nella routine del Laboratorio e dei Centri Antialcolismo dei SerT.

La CDT è un marcatore interessante ma agli utilizzatori ultimi non ne sono tanto soddisfatti, anche se è più specifica e sensibile dei vecchi marcatori. Si può abbassare il cut-off ma così aumentano i falsi positivi.

Il dosaggio dell'ETG è molto più discriminante ma deve essere dosato almeno due volte a settimana.