



XXIII Congresso Nazionale Società Italiana di Alcolologia

*Alcolologia oggi dalla scienza
alla clinica dalla persona alla
società
Roma, 18 settembre 2013*

INNOVAZIONE DIAGNOSTICA IN ALCOLOGIA

V. Pirro, A. Salomone, B. Sciutteri



Identificazione di biomarcatori
appropriati per la diagnosi



Supporto oggettivo, sufficienti
prestazioni in termini di accuratezza



Molteplici parametri sono influenzati dal consumo di alcol e rappresentano
potenziali biomarcatori di abuso alcolico. Quali usare? E come?



MARCATORI DIRETTI

Criteri appropriati per
indagini di screening e/o
conferma



MARCATORI INDIRETTI

costi vs. benefici
sensibilità e specificità
popolazione in esame



Di quali soggetti stiamo parlando?

- Lavoratori a basso rischio (per sé e per terzi)
- Lavoratori ad alto rischio
(autisti, piloti, agenti di sicurezza)
- Soggetti a cui è stata ritirata la patente di guida
- Pazienti in cura presso i SerT

“SCREENING”: mondo del lavoro

- **Commisurare gli strumenti accertativi ai rischi che la mansione comporta per i terzi (maestro vs. autista di scuolabus) in relazione al rapporto costi/benefici e all'incidenza percentuale del rischio**
- **Accettare il conseguente rischio di non riuscire a riconoscere tutti i consumatori problematici di alcol e/o di sostanze stupefacenti**

“CONFERMA”: (presunta colpa)

- Allontanamento da mansione lavorativa
- Sospensione della patente di guida
- Concessione del porto d'armi

- Utilizzare **SEMPRE** gli strumenti accertativi più efficaci a riconoscere inequivocabilmente il consumo di sostanze stupefacenti e/o il consumo problematico di alcol
- **NON** accettare il rischio di non riconoscere tutti i consumatori problematici di alcol



Biomarcatori indiretti

AST, ALT, γ -GT, MCV, CDT



forte variabilità inter-
e intra-individuale

età
sesso
BMI
etnia

Danno epatico a seguito
del consumo di alcol



patologie epatiche, uso / abuso di
farmaci e droghe illecite



Indagine retrospettiva a breve-medio termine

Determinazione semplice, veloce
economica, automatizzata



colorimetric assays
optical measurement
HPLC-UV, immunoassays



Protocolli standard condivisi: **NO** ; valori di cut-off: **NO**

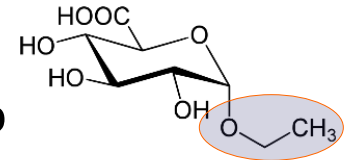
Sensibilità e specificità diverse, ma individualmente sono considerati poco
sensibili e poco specifici

Biomarcatori diretti

Ethyl glucuronide



metabolita diretto dell'etanolo per
coniugazione con l'acido glucuronico



FAEEs

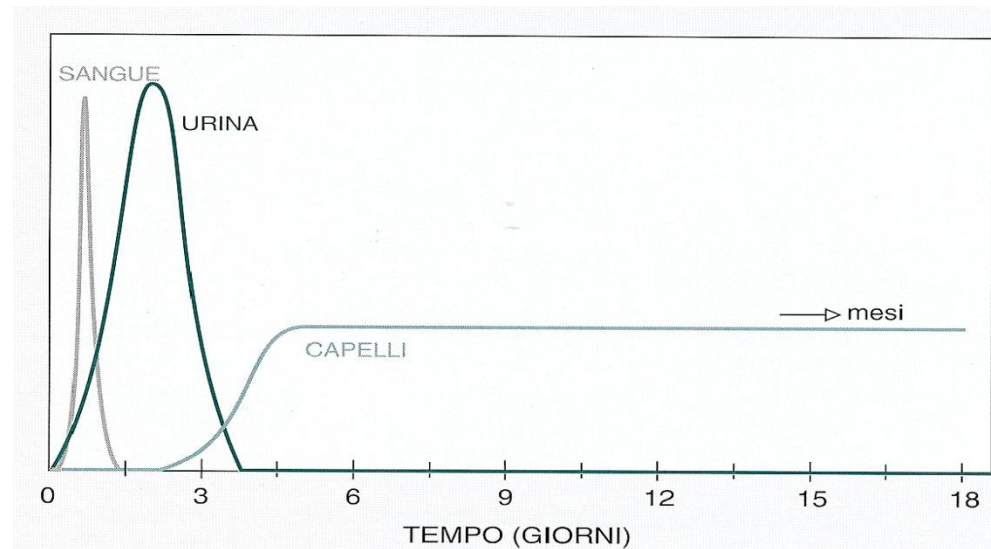


metaboliti diretti dell'etanolo per reazione con
acidi grassi liberi

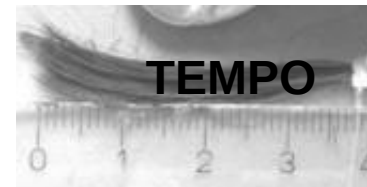
Correlazione diretta con la quantità
di alcol assunta



- sangue
- urina
- matrice cheratinica



Determinazione in matrice cheratinica per
indagini retrospettive a lungo termine



≈ 1 cm/mese



Elevate sensibilità, specificità e accuratezza diagnostica



rispondono direttamente alla quantità di alcol assunta

Procedure analitiche complesse in GC-MS(/MS) o (U)HPLC – MS/MS



Determinazione su matrici biologiche non-convenzionali. Studio dei possibili fattori di bias



matrici cheratiniche
alternative al capello
variabilità individuale
trattamenti cosmetici
contaminazione e dilavamento



Protocolli standard
e valori di cut-off
condivisi



*“The cut-off for **EtG in hair** strongly suggesting chronic excessive alcohol consumption is proposed at **30 pg/mg** scalp hair, measured in 0-3 cm (up 0-6 cm) proximal segment”*

*“The cut-off for the sum of the four **fatty acid esters in hair** to strongly support chronic excessive alcohol consumption is proposed at **0.5 ng/mg** scalp hair, measured in 0-3 cm proximal segment. If the 0-6 cm proximal segment is used the proposed cut-off is 1.0 ng/mg scalp hair”*

*“**EtG** should be the first choice in abstinence assessment. A **concentration ≤ 7 pg/mg** EtG in the 0-3 up to 0-6 cm proximal scalp hair segment is not in contradiction to the self-reported abstinence of a person during the corresponding time period before sampling”*



Studi sperimentali

Diagnosi di abuso alcolico cronico

“Chemometric evaluation of nine alcohol biomarkers in a large population of clinically-classified subjects: pre-eminence of ethyl glucuronide concentration in hair for confirmatory classification”

*Pirro V, Valente V, Oliveri P, De Bernardis A, Salomone A, Vincenti M.
Analytical Bioanalytical Chemistry 2011 Oct;401(7):2153-64.*

“A study of distribution of ethyl glucuronide in different keratin matrices”

*Pirro V, Di Corcia D, Pellegrino S, Vincenti M, Sciutтери B, Salomone A.
Forensic Science International 2011 Jul 15;210(1-3):271-7.*

“Multivariate strategies for screening evaluation of harmful drinking”

*Pirro V, Oliveri P, Sciutтери B, Salvo R, Salomone A, Lanteri S, Vincenti M.
Bioanalysis 2013 Mar;5(6):687-99.*

Accertamento dell'astinenza dal consumo di alcolici

“Determination of basic ethyl glucuronide levels in hair for the assessment of alcohol abstinence”

*Pirro V, Di Corcia D, Seganti F, Salomone A, Vincenti M.
Forensic Science International 10.1016/j.forsciint.2013.07.024*

1° studio

CAD + ASL TO4 +
ASL TO2

Studio sperimentale:

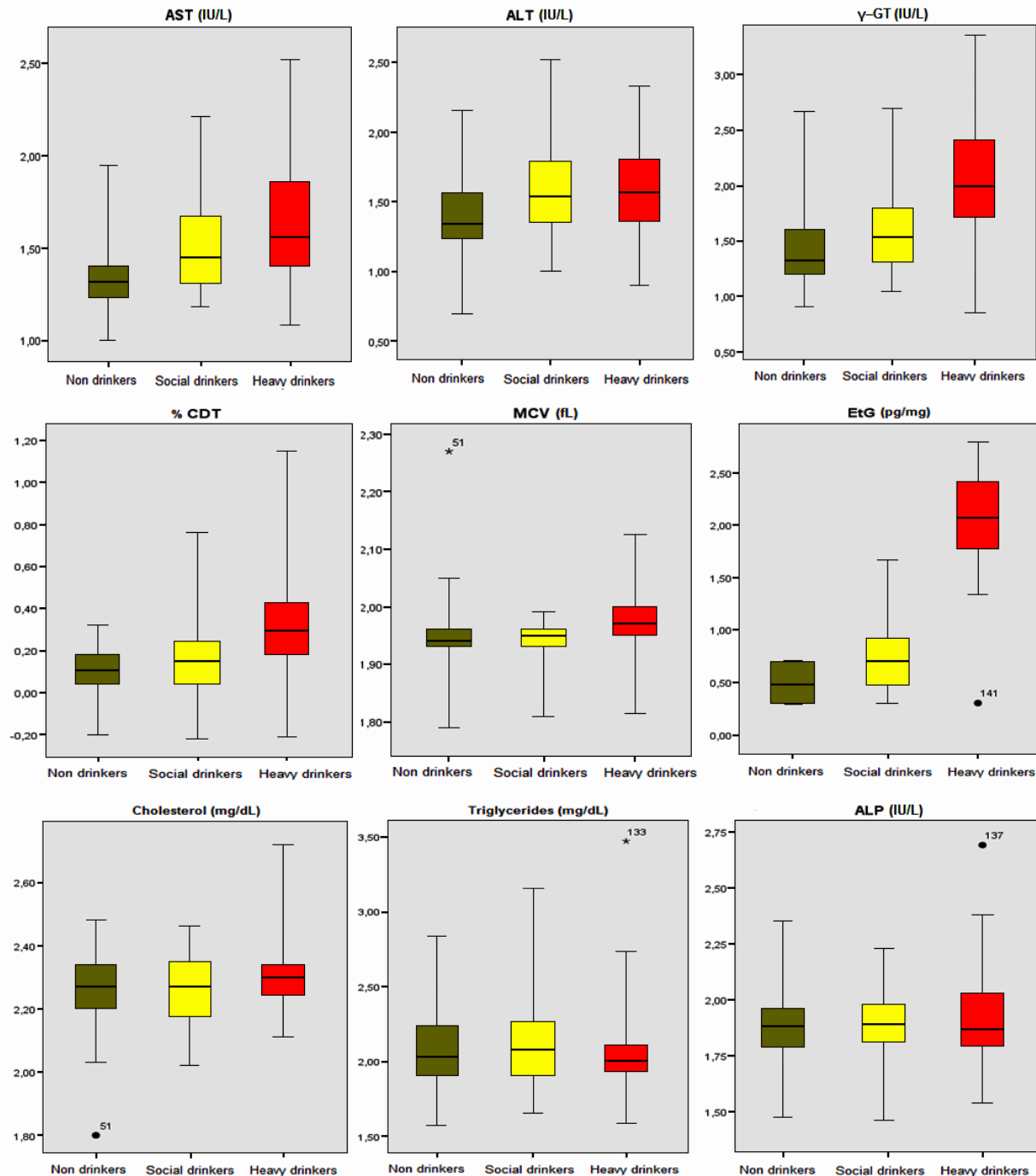
- **175** soggetti
- **9** biomarcatori

● Astinenti (6 mesi)

● Bevitori occasionali

● Abusatori cronici

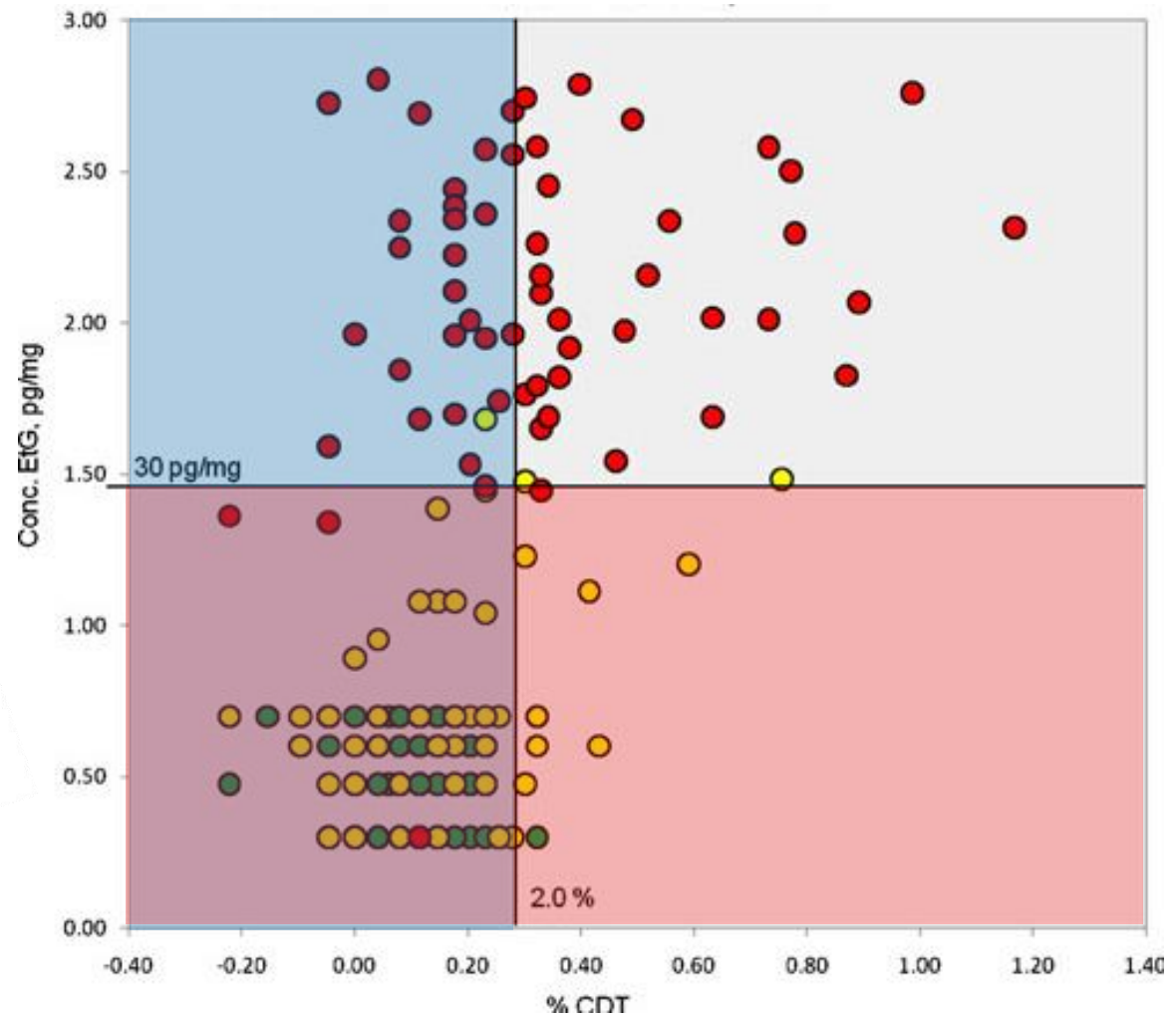
Pirro et al. (2011)
Analytical Bioanalytical
Chemistry 401:2153-2164



EtG vs. CDT

**CDT
FALSE
NEGATIVE
RESULTS**

**EtG
FALSE
NEGATIVE
RESULTS**



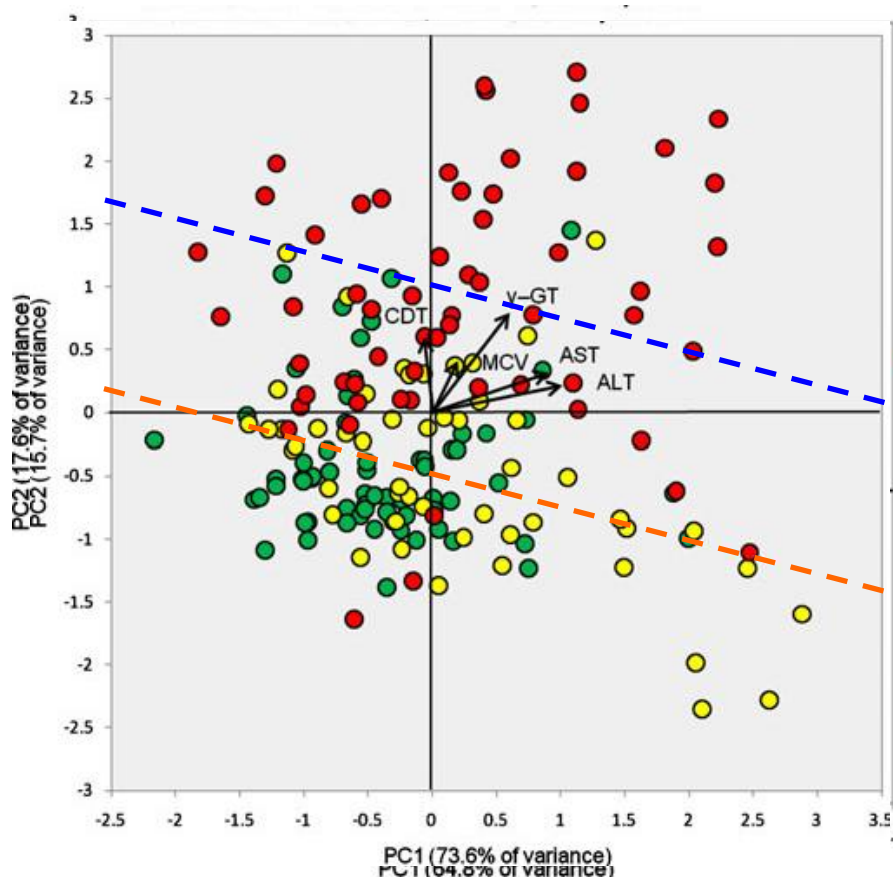
Pirro et al. (2011) Anal. Bioanal. Chem. 401:2153-2164



PCA: analisi esplorativa

175 soggetti × 5-9 marcatori

● Non-drinkers ● Social drinkers ● Heavy drinkers



- **EtG: marcatore molto sensibile e specifico**
Quando l'EtG è rimosso, la separazione tra consumatori cronici e non cronici diminuisce drasticamente
- **CDT & MCV: marcatori specifici, ma non sensibili (CDT > MCV)**
- **γ-GT, AST & ALT: scarsa sensibilità e specificità (γ-GT > AST, ALT)**



2° studio

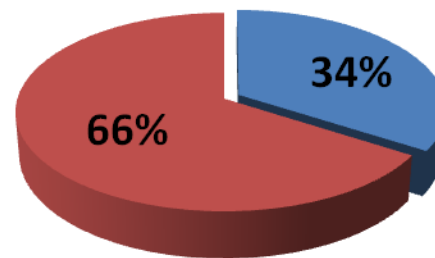
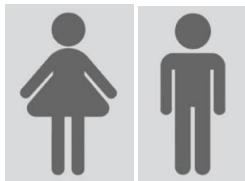
Accertamento dell'astinenza dal consumo di alcolici mediante analisi dell'EtG nel capello

- concentrazioni HEtG < LOD (unita' di pg/mg)
- cut-off attuale proposto: 7 pg/mg



16-32 g alcol/giorno [?] EtG
capello < 7 pg/mg

44 astemi e astinenti



■ < LOD 0.5 pg/mg
■ ≥ LOD 1 pg/mg



0-3 cm

93% dei campioni: HEtG < 1 pg/mg

Media HEtG 0.8 ± 0.4 pg/mg

Intensity
cps

226/85

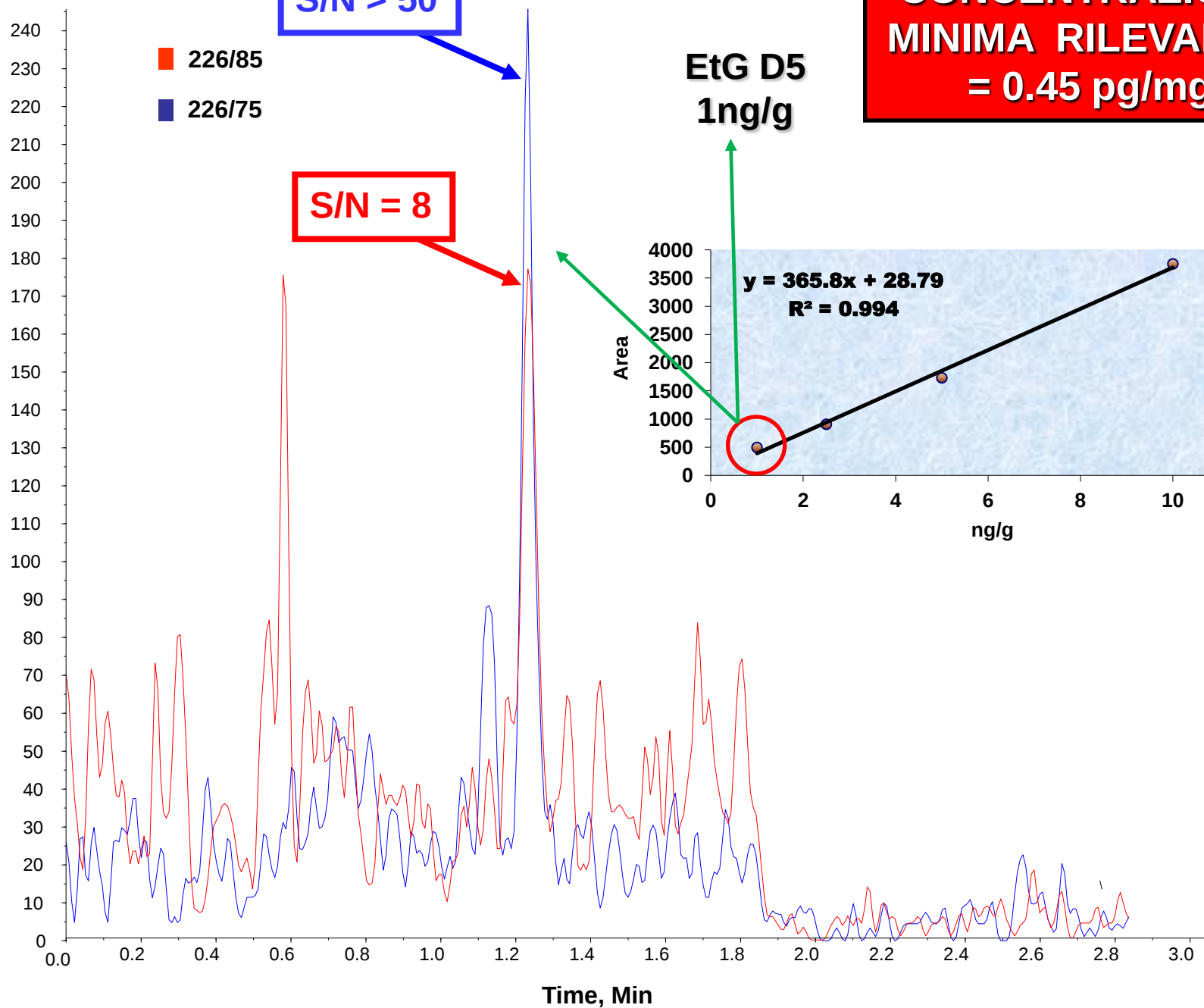
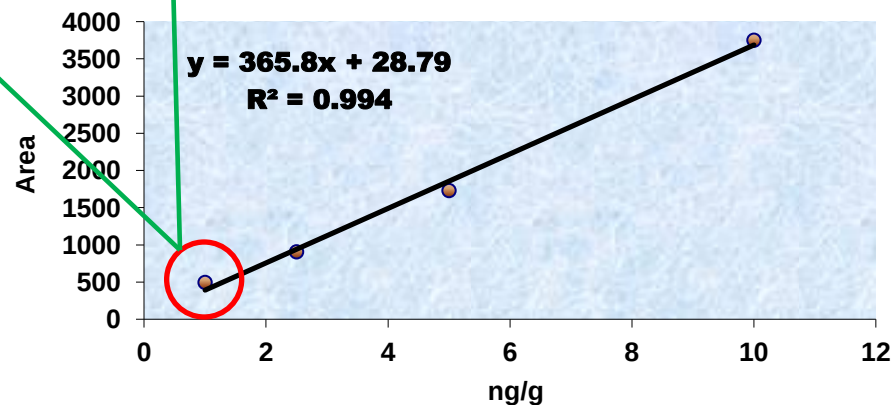
226/75

$S/N > 50$

$S/N = 8$

EtG D5
1ng/g

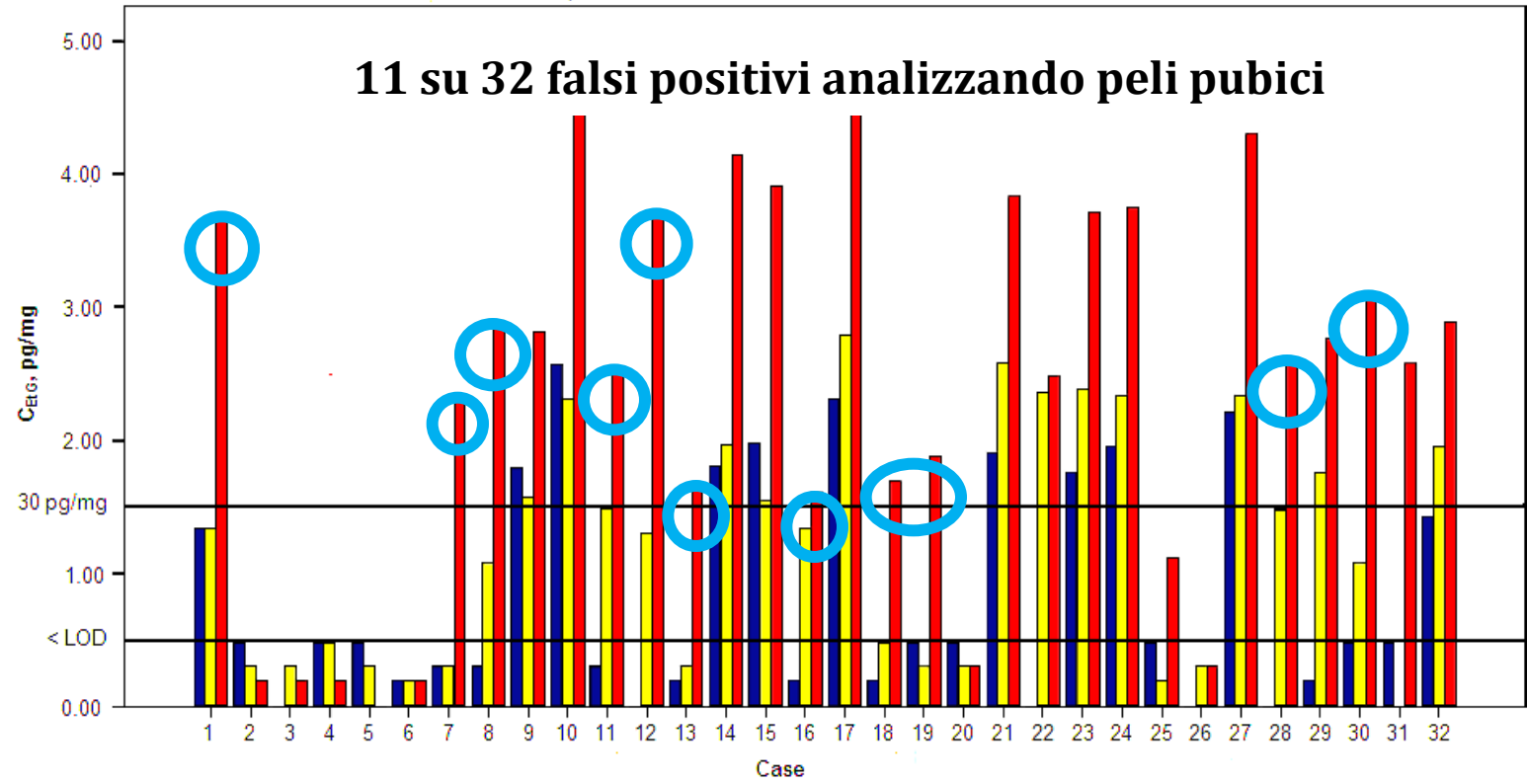
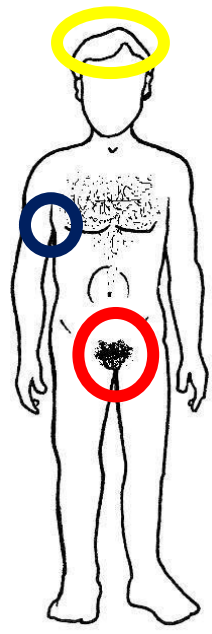
**CONCENTRAZIONE
MINIMA RILEVABILE
= 0.45 pg/mg**





4° studio

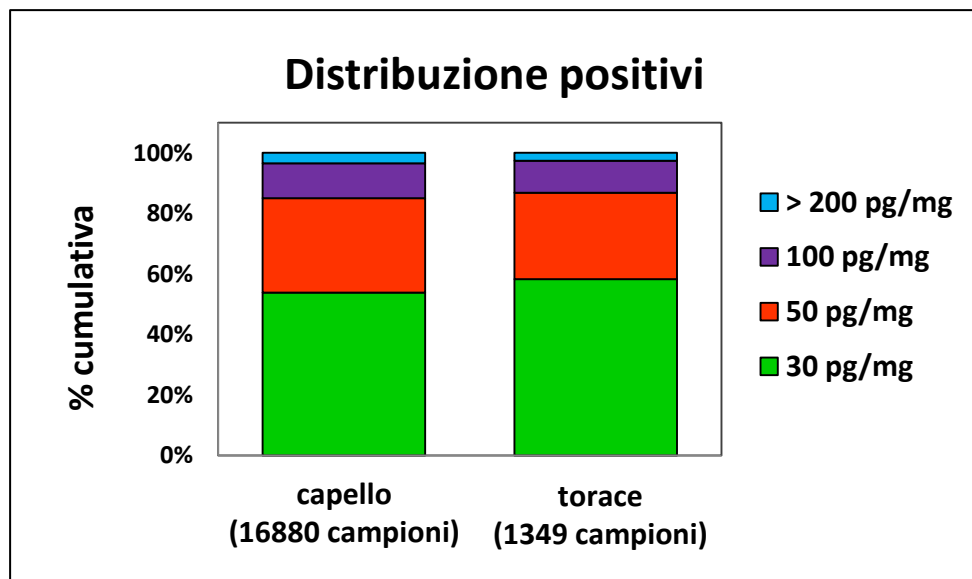
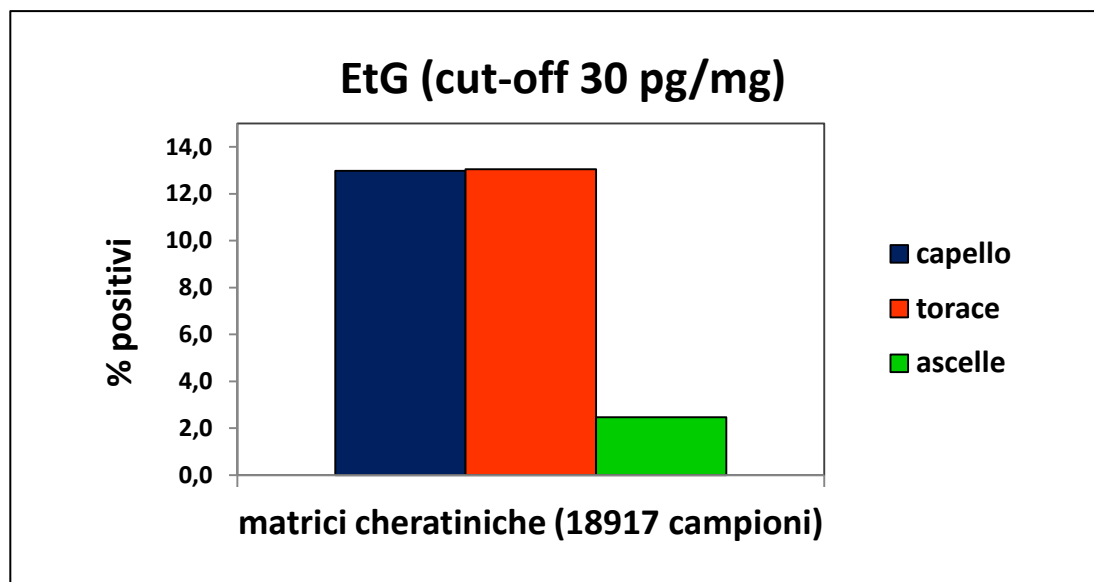
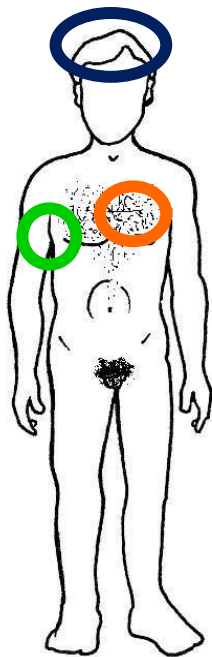
Possibili fattori di bias: matrice cheratinica

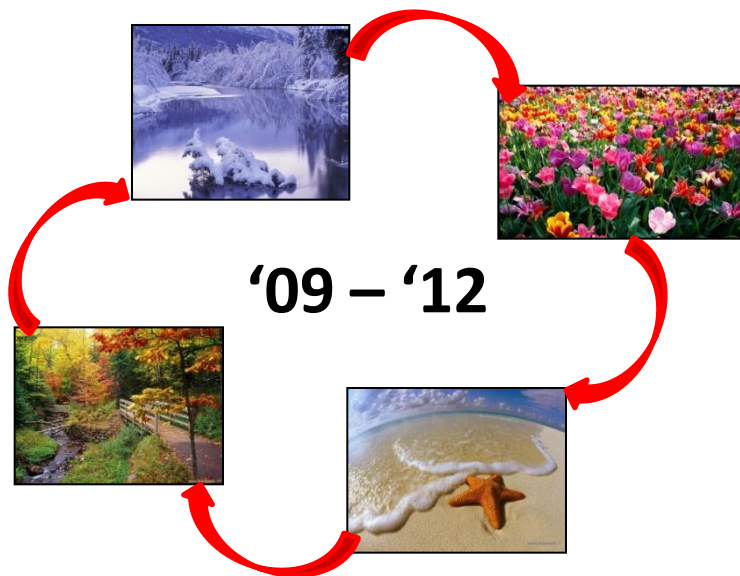


EtG: peli pubici > capello > peli ascellari



5° studio: risultati EtG nel capello su 18917 campioni





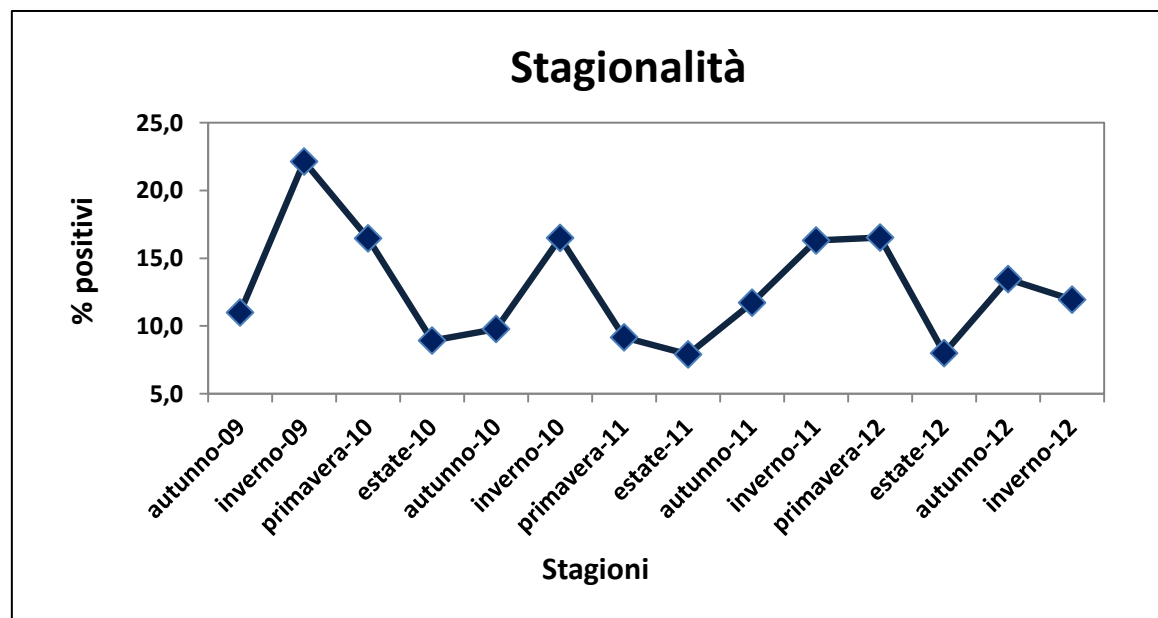
**Stagione di
crescita del
capello**

	media % positivi
Inverno	16.7
Primavera	14.1
Estate	8.3
Autunno	11.7

*Come per i peli ascellari,
l'abbondante
sudorazione estiva*

SFAVORISCE

*l'accumulo di EtG nella
matrice cheratinica*





5° studio: risultati EtG nel capello su 18917 campioni

*Studio di altri possibili fattori di bias:
fattori biologici e personali*

- *Età*
- *Indice di massa corporea*
- *Sesso M/F*
- *Trattamenti cosmetici forti*

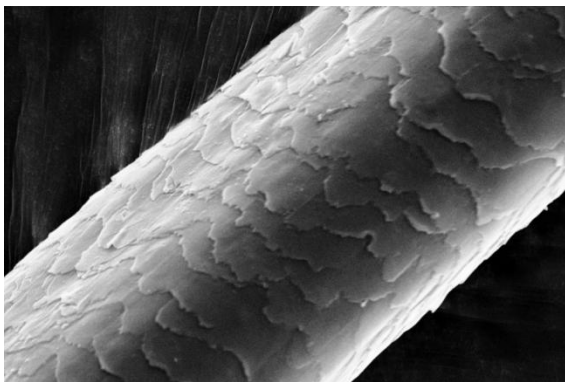
- *Età (intersezione con fattori sociologici)*
- *Indice di massa corporea (non c'è dipendenza)*
- *Sesso M/F (non c'è dipendenza)*
- *Trattamenti cosmetici forti e/o ripetuti*



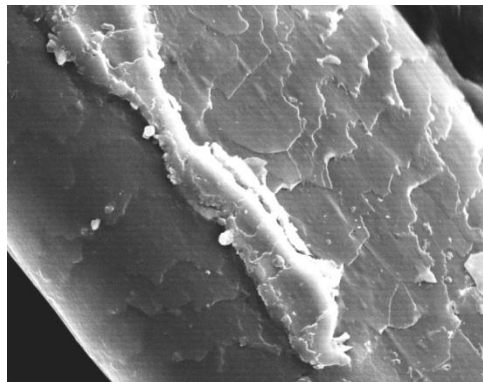
Possibili fattori di bias: trattamenti cosmetici chimici e fisici

- No contaminazione esterna da prodotti contenenti alcol. Un solo caso di contaminazione descritto in letteratura da prodotti contenenti EtG (*Sporkert et al. 2012*)
- Prodotti decoloranti (forti ossidanti) possono degradare e dilavare la matrice cheratinica e ridurre la concentrazione riscontrata di EtG

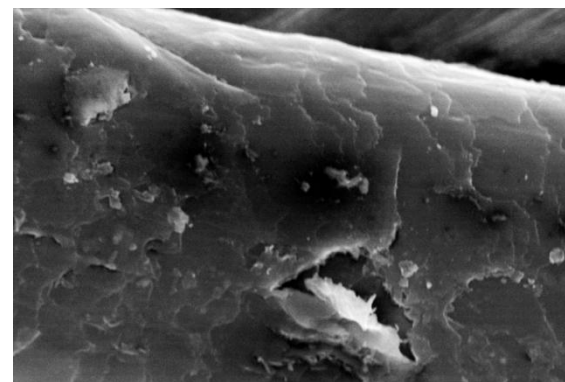
Non trattati



Piastrati



Decolorati



Analisi SEM (microscopio elettronico a scansione)

CONCLUSIONI:

- I marcatori indiretti possono essere utilmente impiegati in valutazioni di screening su popolazioni ampie di soggetti (es. lavoratori), considerando i dati dopo un'opportuna sintesi (es. trattamento statistico)
- EtG nel capello rappresenta un insostituibile marcatore di abuso alcolico cronico, da utilizzare senza eccezione in tutti i casi sospetti (es. ritiro della patente di guida), nonché nelle mansioni di particolare rischio (es. disponibilità di armi, autisti di autobus, piloti, ecc.)
- Il campionamento di pelo toracico può sostituire quello del capello per la determinazione dell'EtG, benchè l'intervallo cronologico non sia ben definito
- La determinazione dell'EtG in capelli che mostrino un'evidente degradazione e/o colorazione deve essere considerata con senso critico, e abbinata ad altri accertamenti, su matrici alternative o con marcatori indiretti (CDT, γ -GT, MCV)

“SCREENING”: mondo del lavoro

- **Commisurare gli strumenti accertativi ai rischi che la mansione comporta per i terzi (maestro vs. autista di scuolabus) in relazione al rapporto costi/benefici**
- **Accettare il conseguente rischio di non riuscire a riconoscere tutti i consumatori problematici di alcol e/o di sostanze stupefacenti**

“CONFERMA”: (presunta colpa)

- Allontanamento da mansione lavorativa
- Sospensione della patente di guida
- Concessione del porto d'armi

- Utilizzare **SEMPRE** gli strumenti accertativi più efficaci a riconoscere inequivocabilmente il consumo di sostanze stupefacenti e/o il consumo problematico di alcol
- **NON** accettare il rischio di non riconoscere tutti i consumatori problematici di alcol

Cartellone pubblicitario ad Alba (CN)



L'ORÉAL-UNESCO
FOR WOMEN
IN SCIENCE

*Cambiare il volto
della scienza*



PER LE DONNE E LA SCIENZA
IN COLLABORAZIONE CON



LE BORSISTE
2013

XI Edizione

Valentina PIRRO

PROGETTO

La spettrometria di massa: dalla scena del crimine alla lotta al cancro

ISTITUTO OSPITANTE

*Dipartimento di Chimica Università degli Studi di Torino e Centro Regionale
antidoping e di tossicologia "A. Bertinaria"*

GRAZIE !

