

Determinazione dell'etilglucuronide nelle urine su analizzatore Siemens Advia 2400

Vincenza Bianchi¹, Silvana Piccinini¹, Alessia Raspagni¹, Carlo Arfini²

¹Laboratorio di Tossicologia e ²Dipartimento di Patologia Clinica, Azienda Ospedaliera Santi Antonio e Biagio e Cesare Arrigo, Alessandria

ABSTRACT

Determination of urinary ethylglucuronide on Siemens Advia 2400. Ethylglucuronide (EtG) is a minor ethanol metabolite, formed by uridine diphosphate-glucuronosyltransferase, an enzyme characterized by a genetic polymorphism. EtG is a direct marker of alcohol misuse, present in many body fluids, but usually measured in urine. Recently, a new immunoassay based on a monoclonal antibody has been introduced and could be applied to automated instruments. In this study, we evaluated the performance of this method on the Siemens Advia 2400. This assay has shown good performance in terms of limit of detection (0,058 mg/L), linearity (up to 4,5 mg/L), imprecision (within-run CV 1,8% and between-run CV 2,3% for a control material with EtG concentration near the cutoff), recovery (94-102%), and stability of reagents on board (at least 8 days). When measuring urine samples, the high absorbance after the addition of first reagent may influence the measurement. To avoid this problem, we measured the absorbance soon after mixing the sample with the first reagent, setting it to zero.

INTRODUZIONE

L'etilglucuronide (EtG) è un metabolita diretto dell'etanolo che si forma per azione della UDP-glucuronosiltransferasi, un enzima di cui sono noti polimorfismi genetici (1,2). È presente nelle urine in misura di ~0,05% rispetto all'etanolo escreto e, a differenza di quest'ultimo, è misurabile in campioni urinari anche dopo alcuni giorni dall'assunzione di alcol (2,3). Non sembra essere influenzato né dall'età, né dal sesso, né da malattie alcol-correlate. Queste osservazioni hanno reso l'EtG un promettente marcatore di uso/abuso recente di etanolo e il suo impiego sta aumentando sia in ambito clinico che forense (3-8).

Negli ultimi anni, metodi in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC/MS) hanno reso possibile determinazioni quantitative dell'EtG anche nella pratica quotidiana al fine di individuare un recente uso di alcol nel monitoraggio dell'astinenza (9,10). Tali tecniche sono tuttavia costose e utilizzabili solo da pochi laboratori specializzati. Un promettente prototipo di saggio immunoenzimatico (EIA) basato sull'impiego di anticorpi monoclonali è stato sviluppato ed è oggi disponibile in commercio per la determinazione dell'EtG nelle urine (11-13). Scopo di questo lavoro è stato valutare questo nuovo prodotto per la determinazione dell'EtG mediante la sua applicazione sull'analizzatore Advia 2400 (Siemens Healthcare).

MATERIALI E METODI

È stato utilizzato un analizzatore automatico Advia 2400. Poiché nella organizzazione del laboratorio esso fa parte di un sistema analitico più complesso, per la determinazione dell'EtG lo strumento è stato utilizzato in modalità "stand-alone", programmando le sedute analitiche sullo strumento stesso e caricando direttamente i campioni.

Per la determinazione dell'EtG è stato utilizzato il kit commerciale "DRI Ethyl Glucuronide Enzyme Immunoassay" (Microgenics-Thermo Fisher, Instrumentation Laboratory) contenente, oltre ai reattivi, 5 calibratori (rispettivamente con concentrazioni di EtG di 0-0,10-0,50-1,00-2,00 mg/L) e 4 controlli. Il saggio immunometrico si basa sulla competizione nei confronti dell'anticorpo anti-EtG tra EtG marcato con glucosio-6P-deidrogenasi (G6PDH) e quello non marcato contenuto nel campione di urine. In presenza di EtG nel campione, l'analita si lega all'anticorpo anti-EtG e l'attività enzimatica della G6PDH aumenta proporzionalmente alla sua concentrazione. La rilevazione avviene accoppiando la riduzione del NAD⁺ da parte della G6PDH con aumento dell'assorbance a 340 nm.

Il metodo originale è stato qui modificato poiché, dopo l'aggiunta del primo reattivo, si osservava, fin dai primi cicli macchina, un'elevata assorbanza, con valori prossimi al limite massimo di assorbanza misurabile dallo strumento; per questo, in corrispondenza dei cicli macchina 3±1, lo strumento è stato programmato in modo da sottrarre l'assorbance della miscela campione-primo reattivo (Tabella 1).

Sono stati anche utilizzati due materiali di controllo (Medichem, BSN) a titolo noto (rispettivamente 1,53 e 4,46 mg/L) e si è partecipato al programma di VEQ della "Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie" (GTFCH) (spedizione Proficiency Test ETG 2/08).

Per la valutazione delle prestazioni analitiche è stato preparato un pool di urine proveniente da 20 campioni ambulatoriali resi opportunamente anonimi.

Per la valutazione delle possibili sostanze interferenti, sono stati selezionati 98 campioni provenienti dalla Commissione Medico-Locale Patenti di Guida e 6 campioni da soggetti che avevano, per cause contingenti, assunto prodotti da banco antitussivi e antidolorifici. Tutti i campioni sono stati raccolti in barattoli sterili e congelati.

ti a -40 °C fino al momento della determinazione dell'EtG. Dopo aver fornito un consenso informato, tutti i soggetti hanno compilato un questionario in cui dichiaravano quali farmaci avessero assunto o quali colluttori ed altri prodotti igienici avessero utilizzato nelle 36 ore precedenti la minzione.

RISULTATI

Nella Figura 1 è riportata una curva di taratura ottenuta con gli standard del kit.

Nelle prove di imprecisione il materiali di controllo con concentrazione di 0,625 mg/L e il pool di urine erano misurati per 5 giorni consecutivi in tre replicati al giorno. I risultati sono riassunti nella Tabella 2.

La linearità del metodo è stata valutata misurando soluzioni ottenute da diluizioni scalari di un controllo Medichem a concentrazione 4,46 mg/L. La retta ottenuta tra valori assegnati e misurati presentava un coefficiente di correlazione pari a 0,9985 (Figura 2).

Per valutare il recupero, un campione con valore assegnato di EtG pari a 3,54 mg/L è stato diluito in rapporti differenti e misurato il valore di EtG risultante. I risultati andavano da 94,3% a 101,5% (Tabella 3).

È stato poi indagato il limite del bianco (LoB), che è risultato essere 0,041 mg/L, ed il limite di rilevabilità (LoD), che è risultato essere 0,058 mg/L (13). Considerato l'ambito di applicazione dell'esame, è stato definito un limite di quantificazione (LoQ) pari alla concentrazione di EtG in corrispondenza della quale si osserva un CV = 10%, che è risultato essere di 0,105 mg/L.

Si è valutata inoltre la stabilità della curva di calibrazione con i reattivi "on board", che è risultata essere di 8 giorni (Figura 3) e l'eventuale trascinarsi, facendo seguire un campione non contenente EtG a standard o controlli a concentrazione elevata. In questo esperimento, tale campione "zero" non ha mai dato valori maggiori del LoD.

La partecipazione alla VEQ ha evidenziato per il campione di urina a valore "target" 4,27 mg/L un risulta-

to di 3,60 mg/L, con uno scostamento di -15,7%.

Per quel che riguarda la valutazione dei possibili interferenti, nei soggetti che dichiaravano di aver assunto benzodiazepine, antidepressivi, antiepilettici e sostanze d'abuso, ma non alcol, non sono mai stati trovati valori di EtG superiori al LoQ, mentre per quel che riguarda i farmaci da banco, una positività si è avuta nel caso in cui la formulazione del prodotto era a base alcolica. Un valore di 2,8 mg/L di EtG è stato trovato dopo l'assunzione di un cucchiaino di Bronchenolo® 12 ore prima della minzione.

DISCUSSIONE

Il kit commerciale valutato è caratterizzato da una buona imprecisione e linearità. Il recupero è stato ottimale e il LoQ ottenuto (0,105 mg/L) accettabile, tenuto conto che il cutoff di positività proposto è 0,50 mg/L (14). Anche la stabilità dei reagenti appare appropriata. Le prestazioni analitiche su Advia 2400 appaiono complessivamente sovrapponibili a quelle pubblicate da Bötcher et al. (14). Questi Autori hanno ottenuto un'ottima concordanza ($r^2=0,931$, EIA = 0,96 LC/MS - 0,104) tra i risultati del metodo immunometrico e quelli con tecnica LC/MS.

I risultati della VEQ danno ragione del fatto che per concentrazioni >4,0 mg/L probabilmente la relazione assorbanza/concentrazione è al limite della linearità. Tuttavia, è da considerare che tali valori rappresentano comunque concentrazioni molto elevate di EtG, mentre sarebbe più interessante confrontarsi su concentrazioni simili alle soglie di positività proposte per valutare l'assunzione volontaria di alcol (0,5 e 1,0 mg/L) (15).

La maggiore criticità del kit è rappresentata da un'elevata assorbanza aspecifica iniziale subito dopo l'aggiunta del primo reattivo. Oltre il 20% dei campioni urinari presentava assorbanze vicine al limite di lettura dello strumento già dai primi cicli macchina, indipendentemente dalla concentrazione di EtG, e come tale lo strumento non era in grado di effettuare la misura. La modifica sviluppata ha permesso di minimizzare il numero dei

Tabella 1

Parametri strumentali per la determinazione di EtG su analizzatore Advia 2400

Primo reagente	40 µL
Secondo reagente	40 µL
Campione	25 µL
Diluizione campione con fisiologica	Automatica 30:30
Tempo di reazione	10 min
Lunghezza d'onda principale	340 nm
Lunghezza d'onda secondaria	410 nm
Lecture per azzerrare l'assorbanza campione-primo reattivo	Ai cicli macchina 3±1
Metodo di analisi	Cinetica con controllo della linearità (RRA)
Metodo di calcolo	Calibrazione a 5 punti
Tempo di reazione	Aumento
Numero cicli macchina utilizzati per la misura	6 (normalmente dal ciclo 25 al ciclo 30, se necessario dal ciclo macchina 22)

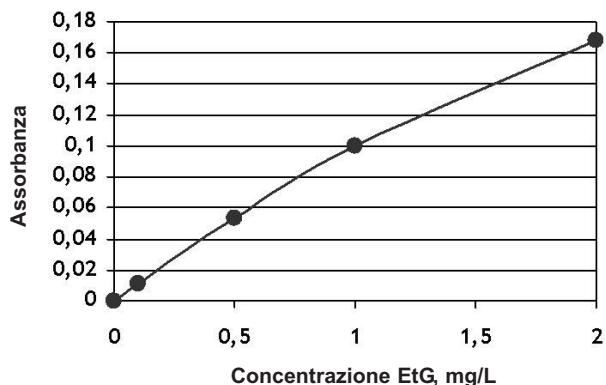


Figura 1
Retta di calibrazione della determinazione di EtG.

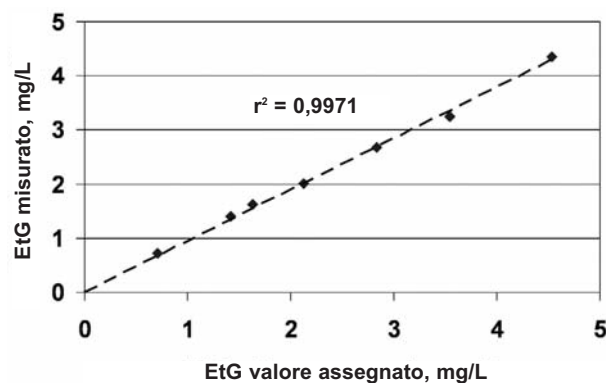


Figura 2
Linearità del metodo.

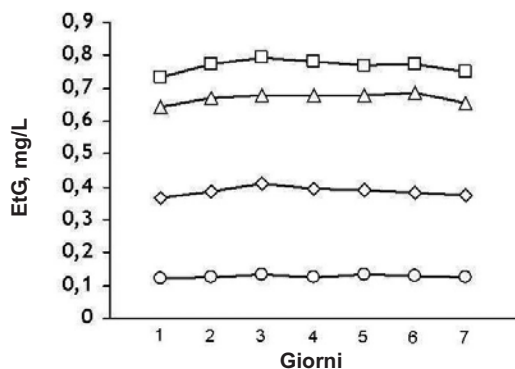


Figura 3
Stabilità della curva di calibrazione con reattivi "on board" valutata con i 4 materiali di controllo contenuti nel kit.

campioni da diluire, riducendo la tempistica di refertazione, il consumo dei reattivi e gli eventuali errori derivante dalla manipolazione dei campioni prima dell'analisi. Questo è in accordo con quanto descritto precedentemente su analizzatore Olympus (14), dove gli Autori superavano tale criticità (14% dei campioni) diluendo le urine manualmente con soluzione fisiologica prima dell'analisi. Con la modifica introdotta su Advia 2400 è stato

Tabella 2
Risultati delle prove di imprecisione

	Controllo			Pool di urine		
	Media (mg/L)	DS (mg/L)	CV	Media (mg/L)	DS (mg/L)	CV
Nella serie	0,66	0,012	1,8%	1,00	0,008	0,8%
Tra le serie	0,66	0,015	2,3%	1,02	0,009	0,9%

Tabella 3
Risultati delle prove di recupero

	Valore teorico, mg/L	Valore trovato, mg/L	Recupero, %
Campione intero	3,54	-	-
Campione 4 parti Acqua 1 parte	2,83	2,67	94,3
Campione 3 parti Acqua 2 parti	2,13	2,02	94,8
Campione 1 parte Acqua 1 parte	1,77	1,76	99,7
Campione 2 parti Acqua 3 parti	1,42	1,40	98,6
Campione 1 parte Acqua 4 parti	0,71	0,72	101,5
Campione 1 parte Acqua 6 parti	0,51	0,51	100,1
Campione 1 parte Acqua 9 parti	0,35	0,35	100,0
Campione 1 parte Acqua 19 parti	0,18	0,18	100,6

possibile ridurre il numero dei campioni da diluire dal 20% al 5%. La nostra esperienza evidenzia che tale 5% era costituito essenzialmente da campioni con concentrazioni di EtG approssimativamente oltre 20 volte il cutoff.

Per quel che riguarda l'assunzione di farmaci, quali benzodiazepine, antidepressivi, antiepilettici, sostanze d'abuso (cocaina, cannabinoidi, oppiacei) o prodotti da banco, questi sembrano non influenzare la misura dell'EtG. Solo nel caso di un preparato antitussivo a base di alcol (1 cucchiaino assunto 12 ore prima della minzione) si è avuta una marcata positività.

I nostri dati sperimentali suggeriscono nel complesso che il kit per la determinazione dell'EtG, proposto da Microgenics-Thermo Fisher, può essere adattato all'analizzatore Advia 2400 con risultati analiticamente affidabili ed economicamente vantaggiosi. Considerando il fatto che il kit valutato si basa su un metodo immunometrico, che potrebbe comunque presentare crossreattività con altre sostanze, come recentemente dimostrato per il cloralio idrato (16), si raccomanda di confermare tutti i risultati positivi con tecnica di spettrometria di massa.

Resta poi ancora aperta la questione legata al cutoff da utilizzare per discriminare un forte consumatore da uno occasionale, alla luce anche delle numerose situazioni di esposizione accidentale ed involontaria ad alcol etilico (uso di colluttori, prodotti dell'igiene personale, cibi, medicine a contenuto, anche basso, di alcol), in particolare per quel che riguarda l'idoneità a particolari mansioni lavorative o al rilascio di licenze amministrative.

BIBLIOGRAFIA

1. Foti R, Fisher M. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int* 2005;153:109-18.
2. Wurst FM, Wiesbeck GA, Metzger JW. On sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine- results from WHO/ISBRA Study. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;8:1220-8.
3. Dahl H, Stephanson N, Beck O, et al. Comparison of urinary excretion characteristics of ethanol and ethylglucuronide. *J Anal Toxicol* 2002;26:201-4.
4. Bianchi V, Raspagni A, Arfini C. Etilglucuronide: un vecchio e nuovo indicatore di uso recente di alcol. *Biochim Clin* 2009;33:187-90.
5. Bergström J, Helander A, Jones AW. Ethylglucuronide concentrations in two successive urinary voids from drinking drivers: relationship with creatinine content and blood and urine ethanol concentration. *Forensic Sci Int* 2003;133:86-94.
6. Wurst FM, Vogel R, Jachau K, et al. Ethylglucuronide discloses recent covert alcohol use not detected by standard testing in forensic psychiatric inpatients. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;3:471-6.
7. Jones AW. Urine as biological specimen for forensic analysis of alcohol and variability in the urine-to-blood relationship. *Toxicol Review* 2006;21:15-35.
8. Hoiseith G, Karinen R, Asbjorg SC, et al. A study of ethyl glucuronide in post mortem-blood as a marker of ante-mortem ingestion of alcohol. *Forensic Sci Int* 2007;165:41-5.
9. Stephanson N, Dahl H, Helander A, et al. Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2002;24:645-51.
10. Bicker W, Lammerhofer M, Keller T, et al. Validated method for the determination of the ethanol consumption markers ethylglucuronide, ethylphosphate, and ethylsulphate in human urine by reversed phase/weak anion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:5884-92.
11. Zimmer H, Schmitt G, Aderjan R. Preliminary immunochemical test for the determination of ethylglucuronide in serum and urine: comparison of screening method results with gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 2002;26:12-6.
12. Bih C, Mitra S, Bodepudi V, et al. Development of a homogeneous enzyme immunoassay for the detection of ethylglucuronide in urine and its evaluation on the MGC 240 analyzer. *J Anal Toxicol* 2006;30:146.
13. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantification. *Clin Biochem Rev* 2008;29:S49-52.
14. Bötcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of new immunoassay for urinary ethyl glucuronide testing. *Alcohol* 2008;43:46-8.
15. Marchioro L, Trombin A, Toffolon S, et al. Determinazione di etilglucuronide in gruppi selezionati di soggetti: è sufficiente un unico livello decisionale? *Biochim Clin* 2009;33:213-4.
16. Arndt T, Gierten B, Gussregen B, et al. False-positive ethylglucuronide immunoassay screening associated with chloral hydrate medication as confirmed by LC-MS/MS and self medication. *Forensic Sci Int* 2009;184:e27-9.