

Etilglucuronide: un vecchio e nuovo indicatore di uso recente di alcol

Vincenza Bianchi¹, Alessia Raspagni¹, Carlo Arfini²

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

ABSTRACT

Ethylglucuronide: an old and new biomarker of recent alcohol intake. Ethylglucuronide (EtG) is a minor ethanol metabolite formed by uridine diphosphate-glucuronyltransferase, an enzyme characterized by a genetic polymorphism. As a consequence, EtG can be used as a direct marker of alcohol misuse. It is present in several body fluids, but it is usually determined in urine. The interference caused by water-induced diuresis on EtG concentrations could be overcome by calculating the EtG/creatinine ratio. The presence of some common bacteria in urine specimens could give false-negative EtG results because of their hydrolytic activity due to bacterial β -glucuronidase. Mouthwashes, personal hygiene products, drugs, food and drink with low amount of alcohol (e.g. analcoholic beer) have been suggested as a legitimate reason for the appearance of EtG in urine. The reference method to measure EtG is the liquid chromatographic-mass spectrometric method, but a new immunoassay based on a monoclonal antibody has recently been introduced and can be applied on automated instruments. EtG measurement can be used for monitoring alcoholic patients in rehabilitation, in working place testing and in patients waiting for a liver transplantation. Since the interpretation of EtG results in urine could be difficult, it is advisable to refrain from taking action against an employee or licensee based on a single urine EtG testing and to encourage a clinical evaluation by clinical specialists.

INTRODUZIONE

Nell'ambito del sempre più importante problema dell'abuso alcolico è necessario disporre di evidenze oggettive che possano portare alla individuazione precoce dell'uso di alcol in modo da ridurre prima i problemi dell'individuo e poi quelli della società in cui esso agisce.

In campo laboratoristico esistono marcatori genetici e marcatori di stato; i primi individuano la predisposizione genetica a sviluppare dipendenza da alcol dopo esposizione cronica, mentre i secondi evidenziano il consumo acuto o cronico di alcol o il danno alcol-indotto di un organo. Questi ultimi sono stati utilizzati con successo sia per scopi clinici che forensi.

Sono stati proposti numerosi marcatori biologici di stato basati sulla misura diretta o indiretta degli effetti derivanti dal consumo di alcol nel sangue e o nelle urine; tra questi l'etilglucuronide (EtG) sembra essere il più promettente per valutare l'uso/abuso recente della sostanza.

Nel 1901 Neubauer descrisse per la prima volta un meccanismo detossificante di eliminazione dell'alcol attraverso la coniugazione con acido glucuronico attivato (1). Nel 1952 l'EtG fu isolato da Kamil et al. come triacetil-metilestere dalle urine di coniglio stimando che rappresentasse circa lo 0,5-1,6% della totale eliminazione dell'alcol (2).

ASPETTI BIOCHIMICI

EtG è un metabolita minore dell'etanolo nell'uomo (3,4). Esso è un prodotto di coniugazione dell'etanolo che si forma per reazione con l'acido glucuronico attiva-

to [acido uridin-5'-difosfo- β -glucuronico (UDPGA)] ad opera dell'uridin-difosfato-glucuroniltransferasi (UGT). Questo enzima microsomiale responsabile della reazione di glucuronidazione dell'etanolo esiste come superfamiglia di enzimi e ne è stato descritto un polimorfismo genetico per sei dei 16 geni umani (5,6). Le varianti polimorfiche nei geni che codificano l'UTG possono avere un impatto significativo sulla capacità degli esseri umani di sintetizzare EtG e possono contribuire a spiegare le differenze interindividuali nel livello di EtG dopo consumo alcolico. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare con chiarezza come le attività delle glucuronidasi umane e batteriche possano influenzare la glucuronazione dell'etanolo e quindi la formazione di EtG (7).

L'EtG è presente in vari fluidi biologici, tessuti e capelli (8-10). Recentemente è stato trovato anche nel meconio (11) e nei fluidi di un uomo esumato, morto 27 anni prima (12).

L'EtG (PM 222,3), solubile in acqua, è un metabolita diretto dell'alcol etilico e viene considerato altamente specifico per la valutazione dell'assunzione di alcol (13). Esso ha il vantaggio di essere presente nelle urine anche dopo 40-60 ore dall'assunzione alcolica (14,15). È stato dimostrato che nel sangue può essere rilevabile anche dopo 14 ore dall'assunzione di alcol, che questo intervallo dipende dalla quantità di alcol assunta e che è sufficiente una assunzione occasionale di alcol per superare la soglia di 0,5 mg/L (15-17).

ASPETTI PREANALITICI

L'EtG è misurabile in molti fluidi biologici, anche se

normalmente vengono utilizzate le urine perché di più facile raccolta.

Soluzioni acquose standard contenenti EtG e soluzioni di EtG in urine a differenti pH (4,5-7,5) conservate per 15 giorni a temperature di -20 °C, 4 °C e 20 °C, così come successivi cicli di congelamento e scongelamento, non hanno evidenziato degradazioni significative (18). In urine contaminate con *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumonia* e *Clostridium sordellii*, batteri che hanno attività glucuronidasi, si può ritrovare un valore di EtG più basso del reale (19-21). In particolare, a 4 °C la degradazione è più lenta, mentre a 22 °C e a 37 °C è completa dopo 5 e 3 giorni, rispettivamente. La presenza di sodio fluoruro (10 g/L) inibisce l'idrolisi dell'EtG (19); questo ne potrebbe suggerire l'uso per una migliore stabilità dei campioni.

In presenza di *Escherichia coli* (ma non di altri batteri, come *Klebsiella pneumoniae* o *Enterobacter cloacae*) ed etanolo si può avere neoformazione di EtG. Uno studio condotto su urine contaminate con *Escherichia coli* e *Candida albicans*, a cui era stato aggiunto glucosio (la *Candida albicans* trasforma il glucosio in etanolo), ha dimostrato che dopo 7 giorni a 22 °C si formava una quantità considerevole di EtG (19).

Numerose sono anche le evidenze che l'uso di colluttori e prodotti igienici per il lavaggio delle mani e l'ingestione di cibi cotti nel vino e di birra analcolica possono portare a risultati falsamente positivi (22,23).

E' stato inoltre dimostrato che la diuresi forzata diminuisce la quantità di EtG nelle urine (24). Si raccomanda pertanto di effettuare un'adeguata anamnesi per evitare risultati falsi negativi o falsi positivi.

ASPETTI ANALITICI

Il metodo originalmente proposto per il dosaggio dell'EtG si basava sulla gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) (10,25,26) con l'impiego di standard deuterato. Il metodo prevedeva l'estrazione dell'EtG dalle urine e la derivatizzazione prima dell'analisi cromatografica. Il limite di rivelabilità per questo metodo è circa 0,1 mg/L, idoneo per il dosaggio nel siero e nelle urine.

Più recentemente sono state utilizzate la cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS) e la cromatografia liquida abbinata all'"electrospray-tandem" MS dotate di sensibilità più elevata, tale da poter essere utilizzate anche su matrici biologiche non convenzionali (27,28). Con queste metodiche si arriva infatti a determinare anche concentrazioni di 0,025-0,050 mg/L.

Molto recentemente è stata anche messa in commercio una metodica immunometrica che utilizza anticorpi monoclonali con limite di rivelabilità di circa 0,1 mg/L (29). La metodica è stata validata per campioni urinari ed i risultati ottenuti evidenziano un'ottima correlazione con il metodo LC-MS (29). La metodica immunometrica presenta quale maggiore problema l'alta densità ottica al momento della miscelazione del campione con i reattivi. Questo porta alla frequente ripetizione della misura in campioni diluiti (29).

REFERTAZIONE E INTERPRETAZIONE

Questa è sicuramente la fase più delicata nel processo di determinazione dell'EtG, in modo particolare perché la misura di questa molecola può essere utilizzata anche per scopi differenti da quelli meramente clinici.

Poiché la quantità di EtG nelle urine dipende dalla diuresi, è buona norma esprimere l'EtG come rapporto rispetto alla creatinina, anche se si potrebbero utilizzare altri parametri per misurare la diluizione urinaria, come l'osmolalità o la densità.

Un altro problema è quello del livello decisionale. Non esistendo una soglia comunemente accettata, la letteratura propone come miglior compromesso per evitare risultati positivi per esposizione non intenzionale ad alcol, il valore soglia di 0,5 mg/L (29). Ci sono infatti evidenze che l'esposizione accidentale ad alcol (colluttori) possa causare concentrazioni di EtG pari a ~0,37 mg/L (22).

Va ricordato inoltre che, poiché l'enzima che catalizza la glucuronazione dell'etanolo presenta un polimorfismo genetico, la popolazione in generale si può comportare come "high responders" (60%) o come "low responders" (40%). Infine, si sottolinea il fatto che ad oggi non si hanno studi eseguiti sulla popolazione italiana, pertanto i livelli decisionali proposti si riferiscono ad altre popolazioni. Benché, come sopra riportato, emerga la necessità di esprimere l'EtG come rapporto con la creatinina, non si hanno ancora cutoff espressi come rapporto EtG/creatinina.

Poiché l'EtG viene utilizzato anche per scopi forensi, tutti i risultati oltre il cutoff, ottenuti con metodo immunometrico (metodo di screening), devono essere confermati con un metodo cromatografico con spettrometria di massa (metodo di conferma).

Sebbene l'EtG sia il metabolita diretto dell'etanolo più studiato per scopi clinici, molti sono ancora gli aspetti che devono essere chiariti. Influenzano significativamente le concentrazioni di EtG nelle urine l'età, il sesso, l'uso di cannabis, patologie renali ed il polimorfismo genetico del sistema enzimatico UGT, mentre etnia, indice di massa corporea, fumo e cirrosi epatica non influenzerebbero le concentrazioni di EtG urinario (30).

Se si confrontano individui che hanno bevuto nei 4 giorni precedenti il prelievo con non bevitori e individui sobri da 4 giorni, al livello decisionale di 0,145 mg/L, la sensibilità è 83,5% e la specificità 68,3%; nel caso, invece, si confrontino individui che hanno bevuto nelle 24 ore precedenti il prelievo con individui che non hanno bevuto, ad un cutoff di 0,435 mg/L di EtG, la sensibilità è 90,8% e la specificità 76,5% (30). Questi dati enfatizzano la capacità dell'EtG di distinguere tra bevitori sociali (non bevitori e bevitori moderati) e pericolosi (pesanti bevitori che necessitano di trattamento) se il consumo di etanolo è molto recente (entro le 24 ore).

L'EtG è positivo nelle urine circa dopo un'ora dal consumo alcolico: in uno studio controllato dove i soggetti assumevano 0,5 g/kg di alcol, l'EtG urinario ha mostrato il suo massimo picco tra le 5 e le 7,5 ore ed è risultato misurabile, a seconda dei soggetti, da 26 a 36 ore, con un massimo di 44 ore dopo l'assunzione di alcol (31).

APPLICAZIONE DEL DOSAGGIO DELL'ETILGLUCURONIDE

Il dosaggio dell'EtG nelle urine è utile in alcuni ambienti clinici, mentre ci sono ancora riserve sull'utilizzo di questo marcatore per fini amministrativi e legali (32).

Nei programmi di riabilitazione di pazienti alcolisti l'EtG esprime forse il più elevato significato. Esso può essere utilizzato in modo seriato e casuale nel paziente in riabilitazione da abuso alcolico, quando egli si presenta alle visite. Infatti, mentre l'alcol dopo qualche ora dall'assunzione non è più misurabile, l'EtG è misurabile anche dopo 2-3 giorni dall'assunzione alcolica.

Il dosaggio dell'EtG nelle urine può anche essere utilizzato in Medicina del Lavoro, quando il medico ha il ragionevole sospetto che il lavoratore abbia problemi legati all'uso/abuso di alcol. È raccomandato in prima istanza il dosaggio della transferrina carboidrato-carente (CDT); se il suo risultato è positivo, prima di iniziare qualsiasi azione contro il lavoratore, si dovrebbe monitorare l'EtG urinario per 12-15 giorni, a giorni alterni, e alla fine di questo periodo dosare nuovamente la CDT. Se l'EtG risulta negativo e la CDT diminuita, si può avere la ragionevole certezza che il lavoratore nel periodo di sorveglianza non ha bevuto e che l'iniziale elevata concentrazione di CDT era in relazione all'assunzione di elevate quantità di alcol.

Nei pazienti con malattie epatiche alcol-correlate in attesa di trapianto di fegato è possibile utilizzare il dosaggio seriato sulle urine di EtG per monitorare che non esista recidiva per quel che riguarda l'uso di bevande alcoliche (33). Questo esame potrebbe sostituire il dosaggio dell'alcolemia sull'espriato, utilizzato finora come criterio di eleggibilità per il trapianto di fegato in soggetti alcol-dipendenti.

Nella medicina del traffico ci sono ancora molti problemi che al momento non consigliano l'utilizzo del solo EtG urinario per intraprendere azioni restrittive con rilevanza amministrativo-forense (rilascio/ritiro di patente di guida) (34).

Numerose pubblicazioni propongono metodi per il dosaggio dell'EtG in matrici biologiche alternative (11, 40,41). Particolarmente interessante l'impiego dei capelli per la determinazione dell'abuso alcolico, che potrebbe trovare applicazione nei casi di rilevanza amministrativo-forense, e l'uso del meconio quale marcatore di esposizione cronica di alcol in utero.

CONCLUSIONI

L'EtG è un marcatore di uso/abuso alcolico in grado di evidenziare anche singoli recenti consumi di alcol. Esso arricchisce il pannello di analiti a disposizione del clinico per la valutazione del soggetto alcolista, avendo il vantaggio di essere rilevabile anche alcuni giorni dopo la completa scomparsa dell'etanolo.

Il metodo immunometrico recentemente reso disponibile faciliterà la diffusione della determinazione dell'EtG fino ad oggi effettuata solo in pochi laboratori specialistici, anche se questo metodo deve essere anco-

ra completamente validato (è stato recentemente dimostrato che il cloralio idrato può crossreagire con l'EtG con risultati falsi positivi) (37). Peraltro, l'uso per scopi forensi di risultati derivati da metodi immunometrici è sconsigliato.

È raccomandabile esprimere la concentrazione di EtG in rapporto alla creatinina (es. mg/g) e accertarsi se il soggetto ha assunto o è stato esposto accidentalmente all'etanolo. Resta ancora aperta la questione del cutoff per discriminare bevitore sociale/moderato da quello pesante/problematico e del polimorfismo dell'enzima che coniuga l'acido glucuronico con l'etanolo. I cutoff proposti sono stati diversi (17,38). Ad oggi, 0,5 mg/L sembra quello che offre il miglior compromesso, evitando risultati positivi dovuti all'esposizione accidentale ad etanolo. È infine raccomandabile l'uso dell'EtG insieme ad altri marcatori (es. CDT) per un appropriato inquadramento del problema, per la valutazione dell'efficacia della terapia, nonché per le valutazioni socio-sanitarie ed economiche legate al problema dell'uso/abuso di alcol.

BIBLIOGRAFIA

1. Neubauer O. Ueber Glucuronsäurepaarung bei Stoffen der Fettreihe. *Archiv für Experimentelle und Pathologische Pharmakologie* 1901;46:133-54.
2. Kamil IA, Smith JN, Williams RT. A new aspect of ethanol metabolism: isolation of ethyl-glucuronide. *Biochem J* 1952;51:32-3.
3. Jaakonmaki PI, Knox KL, Homing E, et al. The characterisation by gas-liquid chromatography of ethyl beta-D-glucosiduronic acid as a metabolite of ethanol in rat and in man. *Eur J Pharmacol* 1967;1:63-70.
4. Besserer K, Schmidt V. Ein Beitrag zur renalen ausscheidung von äthylglucuronid nach oraler alkoholaufnahme (A contribution on the renal excretion of ethyl glucuronide following oral ethanol intake). *Zentralblatt für Rechtsmedizin* 1983;25:369.
5. Mackenzie P, Miners JO, McKinnon RA. Polymorphisms in UDP glucuronosyltransferase genes: functional consequences and clinical relevance. *Clin Chem Med Lab* 2000;38:889-92.
6. Miners JO, McKinnon RA. Genetic polymorphisms of UDP glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology* 2002;181:453-6.
7. Wurst FM, Skipper GE, Weinmann W. Ethyl glucuronide the direct ethanol metabolite on the threshold from science to routine use. *Addiction* 2003;98:51-61.
8. Wurst FM, Schuttler R, Kempfer C, et al. Can ethyl glucuronide be determined in post-mortem body fluids and tissues? *Alcohol Alcohol* 1999;34:262-3.
9. Wurst FM, Kempfer C, Metzger J, et al. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol* 2000;20:111-6.
10. Wurst FM, Kempfer C, Seidl S, et al. Ethyl glucuronide - a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol* 1999;34:71-7.
11. Morini L, Marchei E, Pellegini M, et al. Liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for measurement of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium: new biomarkers of gestational ethanol exposure? *Ther Drug Monit* 2008;30:725-32.
12. Politi L, Morini L, Mari F, et al. EtG and EtS in autopsy samples 27 years after death. *Int J Legal Med* 2008;122:507-9.

13. Dahl H, Stephanson N, Helander A. Comparison of urinary excretion of ethanol and ethyl glucuronide. *J Anal Toxicol* 2002;26:201-4.
14. Wurst FM, Seidl S, Ladewig D, et al. Ethyl glucuronide: on the time course of excretion in urine during detoxification. *Addic Biol* 2002;7:427-4.
15. Høiseth G, Bernard JP, Karinen R, et al. A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: applications to forensic toxicology. *Forensic Sci Int* 2007;172:119-24.
16. Halter CC, Dresen S, Auwaerter V, et al. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulphate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med* 2008;122:123-8.
17. Helander A. Biological markers in alcoholism. *J Neural Trasm* 2003;66:15-32.
18. Bicker W, Lämmerhofer M, Keller T, et al. Validated method for the determination of the ethanol consumption markers ethyl glucuronide, ethyl phosphate and ethyl sulphate in human urine by reverse-phase/weak anion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;76:5884-92.
19. Helander A, Olsson I, Dahl H. Postcollection synthesis of ethyl glucuronide by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem* 2007;53:1855-7.
20. Helander A, Dahl H. Urinary trait infection. A risk factor for false-negative urinary ethyl glucuronide but not ethyl sulfate in detection of recent alcohol consumption. *Clin Chem* 2005;51:1728-30.
21. Baranowski S, Serr A, Thierauf A, et al. In vitro study of bacterial degradation of ethylglucuronide and ethylsulfate. *Int J Legal Med* 2008;122:389-93.
22. Constantino A, Digregorio EJ, Korn W, et al. The effect of the use of mouthwash on ethylglucuronide concentrations in urine. *J Anal Toxicol* 2006;30:659-62.
23. Rohrig TP, Huber C, Goodson L, et al. Detection of ethylglucuronide in urine following the application of Germ-X. *J Anal Toxicol* 2006;30:703-4.
24. Bergström J, Helander A, Jones AW. Ethyl glucuronide concentration in two voids from drinking drivers: relationship to creatinine content and blood and urine ethanol concentrations. *Forensic Sci Int* 2003;133:86-94.
25. Schmitt G, Droeber P, Skopp G, et al. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers and suspected drinking drivers. *J Forensic Sci* 1997;42:1099-102.
26. Jandt I, Alt A. Improvement of ethylglucuronide determination in human urine and serum by solid phase extraction. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;758:229-34.
27. Stephanson N, Dahl H, Helander A, et al. Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Therap Drug Monit* 2002;24:645-51.
28. Politi L, Morini L, Groppi A, et al. Direct determination of ethanol metabolites ethyl glucuronide and ethyl sulphate in urine by liquid chromatography/electrospray tandem - mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2005;19:1321-31.
29. Böttcher M, Beck O, Helander A. Evaluation of new immunoassay for urinary EtG testing. *Alcohol Alcohol* 2008;43:46-8.
30. Wurst FM, Wiesbeck GA, Metzger JW, et al. On sensitivity, specificity, and the influence of various parameters on ethyl glucuronide levels in urine - Results from the WHO/ISBRA Study. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1220-8.
31. Halter C, Dresen S, Auwaerter V, et al. Kinetics in serum and urinary excretion of ethyl sulphate and ethyl glucuronide after medium dose ethanol intake. *Int J Legal Med* 2008;122:507-9.
32. Bianchi V, Raspagni A, Arfini C, eds. *Vecchi e nuovi marcatori di abuso alcolico nelle matrici biologiche convenzionali*. Torino: Ananke, 2008.
33. Erim Y, Bötcher M, Dahmen U, et al. Urinary ethyl glucuronide detects alcohol consumption in alcoholic liver disease patients awaiting liver transplantation. *Liver Transplant* 2007;13:747-61.
34. Center for Substance Abuse Treatment. *The role of biomarkers in the treatment of alcohol use disorders*. Substance Abuse Treatment Advisory 2006;5:1-8.
35. Jurado C, Soriano C, Gimenez MP, et al. Diagnosis of chronic di alcohol consumption. Hair analysis for ethyl glucuronide. *Forensic Sci Int* 2004; 145:161-6.
36. Morini L, Politi L, Groppi A, et al. Determination of ethyl glucuronide in hair samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2006;41:34-42.
37. Arndt T, Gierten B, Gussregen B, et al. False-positive ethyl glucuronide immunoassay screening associated with chloral hydrate medication as confirmed by LC-MS/MS and self medication. *Forensic Sci Int* 2009;184:1-3.
38. Wurst FM, Alling C, Aradottir S, et al. Emerging biomarkers: new directions and clinical applications. *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29:465-75.