

***DETERMINAZIONE DELL'ETILGLUCURONIDE
IN MATRICI BIOLOGICHE***

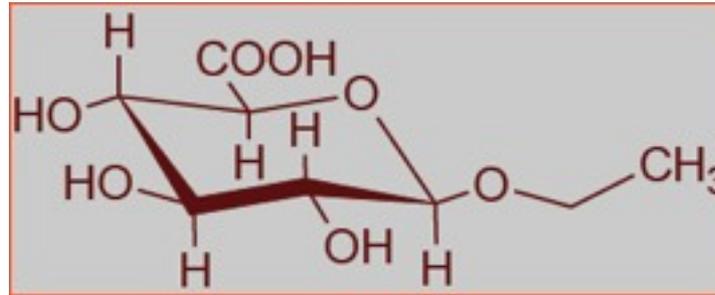
Brescia, 21 settembre 2012

Abuso di alcol

- ✓ **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

ALCOLEMIA (g/L)	EFFETTI (variabili da soggetto a soggetto)
0.2-0.4	Lieve euforia, loquacità, lieve incoordinamento motorio e riduzione dell'attenzione
0.5-0.8	Aggravamento degli effetti di incoordinamento motorio, riduzione della capacità percettiva
0.8-1.0	Sopravvalutazione delle proprie capacità di guida, ritardo dei tempi di reazione
1.0-1.5	Instabilità emotiva, alterazione della memoria, atassia, disartria
2.0-4.0	Ubriachezza profonda: confusione, disorientamento, alterazioni percettive
Oltre 4.0	Alcolemia potenzialmente mortale: coma, ipotermia, ipotensione, ipoventilazione

Etilglucuronide (EtG)



- formata dalla coniugazione dell'etanolo con acido glucuronico mediante l'enzima UDP-glucuronil transferasi
- molecola non volatile (PM 222g/mol)
- solubile in acqua
- marker diretto: elevata specificità diagnostica
- indicatore di uso/abuso alcolico nel breve (sangue/siero), medio (urina) e lungo (capelli) periodo

Solo lo 0,02-0,06 % dell' etanolo assunto viene metabolizzato sottoforma di EtG!

Analisi medico-forense di EtG urinario e su capello

- ampliamento della finestra temporale di rilevabilità dell'assunzione recente di etanolo
- escludere eventuali contaminazioni correlabili ad agenti disinfettanti su base alcolica
- escludere la formazione di etanolo dovuta a processi putrefattivi
- verificare l'eventuale assunzione di etanolo in caso di campionamento tardivo
- monitorare pazienti in trattamento per la disintossicazione da alcool

Metabolismo ed eliminazione

- l'80% dell'alcol è metabolizzato a livello epatico
(altre sedi: mucosa gastrica, polmone, rene)

VELOCITÀ DEL METABOLISMO:

- è costante, indipendente dalla concentrazione ematica e direttamente proporzionale al peso, maggiore nel bevitore abituale rispetto al saltuario (= induzione enzimatica)
- una volta completato l'assorbimento, l'alcol viene ossidato alla velocità di 0.015g/dl/ora, cioè 150mg di alcol/kg di peso corporeo/ora

Matrice biologica: URINA

😊 VANTAGGI

- ❖ prelievo non invasivo
- ❖ possibilità di analizzare sostanze e metaboliti a diversi giorni dall'assunzione
- ❖ conservazione 4/-20 °C
- ❖ L'uEtG si propone pertanto come specifico e sensibile marcatore di abuso alcolico acuto

☹️ SVANTAGGI

- ❖ concentrazione analiti varia con la dose e stato fisiologico del soggetto
- ❖ facile adulterazione
- ❖ il dosaggio non consente di provare uso cronico
- ❖ indicazione approssimata sul momento dell'assunzione

Matrice biologica: CAPELLO

😊 VANTAGGI

- ❖ prelievo non invasivo, difficilmente adulterabile
- ❖ è possibile la ripetizione del prelievo in caso di controversia
- ❖ consente una ricostruzione temporale abbastanza corretta
- ❖ finestra di sorveglianza molto più ampia
- ❖ l'hEtG si caratterizza per l'elevata specificità e sensibilità analitica

☹️ SVANTAGGI

- ❖ più soggetta a contaminazione ambientale
- ❖ deviazioni fisiologiche e non-fisiologiche
- ❖ non esiste relazione dose assunta – concentrazione

fondamentale



**FINESTRA DI
SORVEGLIANZA**

Caratteristiche delle matrici biologiche in esame

CARATTERISTICHE	URINA	CAPELLO
PRELIEVO	Disagevole	Comodo/non invasivo
ADULTERAZIONE	Possibile	Difficile
RIPETIBILITÀ' PRELIEVO	Impossibile	Possibile
CONSERVAZIONE	4/-20 °C	Temp. ambiente
TRASPORTO	Temperature controllate	Temp.ambiente
TECNICA ANALITICA	Immunoenzimatica	Cromatografica/ spettrofotometrica
TEMPO DI RISPOSTA	Rapido	Rapido
CONCENTRAZIONE IN MATRICE	Elevata	Bassa
TIPO DI MISURA	Incremento	Cumulativo
FINESTRA DI RILEVAZIONE	2/3 giorni (fino a 80 ore)	Mesi/anni

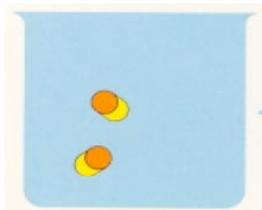
Analisi EtG

- ❖ Prelievo
- ❖ Matrice urinaria: Analisi di screening (**Test immunochimico EMIT**)
- ❖ Matrice pilifera:
 - Pretrattamento campione (lavaggio, estrazione per isolamento analiti dalla matrice, ultrasonificazione, centrifugazione)
 - Analisi strumentale **LC-MS/MS**

EMIT

Enzyme Multiplied Immunoassay

Campione contenente le molecole della sostanza da dosare



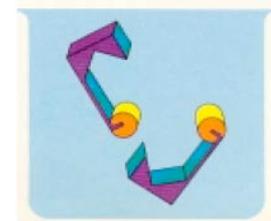
+

Anticorpi specifici per le sostanze da dosare



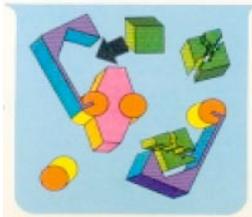
+

Marcatura enzimatica: molecole marcate con enzima, uguali a quelle da dosare



+

Substrato specifico per l'enzima



Immunoassay enzimatico EMIT: la competizione per i siti di legame dell'anticorpo lascia libera una parte delle molecole marcate con enzima. L'attività enzimatica risultante è direttamente proporzionale alla concentrazione delle molecole libere nel campione.

EMIT

Enzyme Multiplied Immunoassay

Principio: competizione tra l'UEtG e la molecola d'abuso marcata con enzima **G6PDH** per i siti leganti dell'anticorpo

- Liberazione di NADH
- Reazione chemiluminescente:

TEST POSITIVO



- ✓ Variazione **A** a 340 nm, direttamente proporzionale alla concentrazione iniziale della sostanza d'abuso

EMIT

Enzyme Multiplied Immunoassay

😊 VANTAGGI

- velocità d'esecuzione (Es. 100 campioni in 1-2 ore)
- buona gestione reagenti
- efficace ed efficiente
- completamente automatizzato
- elevata sensibilità (0.1, 0.5, 1 $\mu\text{g/mL}$ o $\mu\text{g/g}$)
- modeste q.tà liquido biologico (Es. 10 μL di urina)
- reazione eseguita direttamente sul campione

☹️ SVANTAGGI

- non specifico
- elevato costo di apparecchiature e reattivi
- durata limitata dei reattivi
- interferenze dovute a cross-reactivity.

LC-MS/MS

😊 VANTAGGI

- specifica e sensibile
- determinazione quantitativa
precisa, accurata e affidabile
- completamente automatizzabile
- identificazione computerizzata dei
tempi e “impronte digitali”

☹️ SVANTAGGI

- tempi di analisi piuttosto lunghi
- necessarie procedure di
lavaggio, sonicazione e
centrifugazione
- costo strumentazione elevato

LC-MS/MS

Pretrattamento campione

- Lavaggio del campione con solventi
- Incubazione overnight di 100 mg di capello in 800 μ l di acqua bidistillata contenente D5-EtG (I.S.)
- Ultrasonificazione, centrifugazione ed iniezione in LC-MS/MS

Acquisizione spettri LC-MS/MS

MRM (Multiple Reaction Monitoring)



rivelazione selettiva di più transizioni caratteristiche



**INTERPRETAZIONE
SPETTRO MS**

SRM (Selected Reaction Monitoring)



isola ed emette solo quegli ioni prodotto con rapporto m/z prescelto

Determinazione quantitativa di molecole specifiche

VANTAGGI:

- Aumento rapporto segnale/rumore
- Migliore sensibilità di rivelazione

Cut-off

Valore soglia (indicato dalla Regione Lombardia)

Fissato a concentrazioni maggiori della sensibilità del metodo analitico



- ✓ uEtG (metodo immunochimico) = 0,5 g/L
- ✓ hEtG (metodo spettroscopico) = 30 pg/mg

Criteri scelta cut-off

- Sostanza d'abuso
- Finalità dell'indagine (medico-legale)
- Matrice biologica
- Tecnica analitica adottata

Risultato **NEGATIVO** → sotto cut-off
Risultato **POSITIVO** → sopra cut-off

Conclusioni

Screening EMIT

- semplicità d'uso
- elevata produttività
- velocità e sensibilità

LC-MS/MS

- identificazione e quantificazione sicura
- altamente specifica
- elevata accuratezza e precisione
- uso di standard interni deuterati

Maggiore specificità e sensibilità della LC-MS rispetto all'EMIT

LC-MS/MS tecnica *gold-standard* nell'analisi dell'EtG nel capello

Ringraziamenti

Laboratorio di Conferma Tossicologica del Dipartimento di
Sanità Pubblica dell'ASL di Brescia

Dott. Fabrizio Speziani

GRAZIE PER LA CORTESE ATTENZIONE

Finestra di sorveglianza

