



**Associazione Scientifica
TOSSICOLOGI FORENSI ITALIANI
GTFI**

**Accertamenti tossicologico-forensi
di uso pregresso e/o continuativo a rischio di alcol etilico**

Biomarcatori del consumo alcolico, procedure analitiche, aspetti interpretativi

DOCUMENTO DI CONSENSO

A cura di:

**Luca Morini, Sara Casati, Donata Favretto,
Nadia Porpiglia, Franco Tagliaro, Marco Vincenti**

Lo scopo del presente documento è di fornire informazioni scientifiche ed indicazioni tecniche atte a garantire un'adeguata gestione degli accertamenti tossicologico-forensi di uso pregresso e/o continuativo a rischio di alcol etilico, mediante l'utilizzo di idonee procedure analitiche e la corretta interpretazione dei dati analitici ottenuti.

Nel presente documento non sono trattati i marcatori indiretti di abuso alcolico più tradizionali, quali gamma-glutamyl transferasi o transpeptidasi (γ GT), alanina aminotransferasi (ALT), aspartato aminotransferasi (AST), volume globulare medio (MCV), in quanto ritenuti utili prevalentemente in ambito diagnostico clinico.

Considerata la problematica definizione, sotto il profilo quantitativo, dell'uso pregresso e/o continuativo a rischio di alcol etilico, nel presente documento si fa riferimento alla definizione della Organizzazione Mondiale della Salute (WHO) di esposizione cronica eccessiva di alcol, secondo la quale "per uso cronico eccessivo di etanolo si intende un consumo medio giornaliero uguale o superiore a 60 grammi, protratto per alcuni mesi"¹.

Considerata inoltre la vasta letteratura scientifica attualmente disponibile in tema di biomarcatori di abuso alcolico, nel presente documento vengono trattate le problematiche relative alla determinazione dei tre principali marcatori diretti, quali **etilglucuronide (EtG)** ed **esteri etilici degli acidi grassi (FAEE)** nelle formazioni pilifere, **fosfatidiletanolo (Peth)** nel sangue intero, e quelle relative alla determinazione, nel siero, del marcatore indiretto **transferrina carboidrato carente (CDT)**.

Dal momento che i marcatori presi in considerazione sono determinabili in molteplici matrici biologiche, si ritiene opportuno dapprima discutere le caratteristiche dei diversi marcatori, e successivamente esaminare le più opportune modalità di prelievo delle differenti matrici biologiche.

Bibliografia di riferimento

¹International guide for monitoring alcohol consumption and related harm. World Health Organization, Dept. of Mental Health and substance dependence, Geneva, 2000, pp 51-54.

Determinazione di etilglucuronide (EtG) nelle formazioni pilifere

L'etilglucuronide (ethyl- β -D-glucuronide, EtG) è un metabolita diretto dell'etanolo che si forma tramite un processo metabolico di tipo non-ossidativo¹. Una frazione inferiore all'1% dell'alcol etilico assunto è metabolizzata, in sede epatica, in EtG, mediante una reazione di coniugazione con l'acido glucuronico per azione dell'UDP-glucuroniltransferasi (UGT), una superfamiglia di enzimi altamente polimorfici².

L'EtG è una sostanza organica non volatile, polare, relativamente stabile e debolmente acida, che a seguito di esposizione ad etanolo può essere determinata in diverse matrici biologiche, con differenti intervalli temporali. Nello specifico, le formazioni pilifere, con una finestra di determinazione di alcuni mesi precedenti il prelievo, rappresentano la matrice ideale per l'identificazione di comportamenti di consumo moderato o cronico eccessivo di etanolo^{3,4}.

La determinazione quantitativa dell'EtG nelle formazioni pilifere, in particolare nei capelli, garantisce un'adeguata correlazione con la quantità di alcol etilico assunta⁵⁻⁹. Si ricorda a tal proposito che ogni bulbo pilifero possiede un proprio ciclo vitale, con velocità di crescita differente a seconda della regione corporea; a livello del cuoio capelluto, la crescita varia generalmente da 0,6 a 1,4 cm/mese, anche in dipendenza dell'uso di farmaci, dell'età, del sesso, dell'etnia e della stagione annuale¹².

Secondo il documento di consenso della *Society of Hair Testing* (SoHT), la cui ultima revisione è aggiornata al 2019¹³, per campioni di capelli di lunghezza compresa tra 3 e 6 cm, la soglia discriminante per l'astinenza o consumo occasionale o moderato nel periodo considerato in relazione alla lunghezza del capello è identificata in 5 pg/mg, mentre il *cut-off* utile a valutare un consumo continuativo o eccessivo (≥ 60 g/die) è identificato in 30 pg/mg. Sebbene la stabilità dell'EtG nelle formazioni pilifere sia ancora oggetto di studio, soprattutto per i segmenti distali, in alcuni studi è stata osservata una buona stabilità in campioni di capelli di lunghezza ricompresa tra 3 e 12 cm¹⁴.

Diversi studi hanno valutato la sensibilità e la specificità diagnostica dell'EtG nei capelli per discriminare un consumo di alcol occasionale o moderato da un consumo continuativo o eccessivo (≥ 60 g/die)¹⁵⁻¹⁷. Per tale finalità, considerando una porzione di capelli corrispondente ai 3 cm prossimi alla cute e applicando un *cut-off* di 30 pg/mg, l'EtG presenta una sensibilità diagnostica pari a 0,85 e una specificità diagnostica pari a 0,97¹⁷. Questi valori, ancorché variabili in funzione di diversi studi, sono complessivamente considerati di riferimento dalla comunità scientifica.

L'incorporazione dell'EtG nelle formazioni pilifere sembrerebbe non essere influenzata dal contenuto di melanina della matrice¹⁸. Tra i vari fattori fisiologici e/o patologici, ad oggi studiati, che possono influenzare la concentrazione di EtG nei capelli è stato identificato solamente l'indice di massa corporea (BMI), anche se la possibile influenza del BMI sulla quantità di EtG incorporata nei capelli è stata osservata solo in una popolazione di forti bevitori, con valori di EtG superiori a 30 pg/mg^{19,20}. Non risultano invece costituire fattori influenti l'età, il sesso, l'etnia e la presenza di patologie epatiche, quali, ad esempio, la cirrosi epatica alcolica.

In caso di capelli eccessivamente corti (< 3 cm), ovvero di calvizie, possono essere utilizzati in alternativa, per l'applicazione del *cut-off* di 30 pg/mg, solo i peli prelevati dalla zona toracica^{21,22},

con l'impossibilità tuttavia di desumere una stima temporale del consumo. Diversamente, i peli pubici, potendo risultare positivi per EtG anche in seguito ad una singola assunzione di etanolo, spesso a causa di contaminazione da parte dell'EtG presente nell'urina, trovano ragione di utilizzo unicamente in caso di necessità di verifica di completa astinenza (ad esempio a seguito di accertamenti in tema di idoneità a trapianti d'organo). Sono poi da escludere i peli ascellari, in quanto la sudorazione o l'utilizzo di deodoranti possono favorire un dilavamento dell'EtG, con una conseguente sottostima del livello di esposizione ad etanolo. Parimenti, anche i peli della barba sono da escludere perché soggetti a potenziali contaminazioni dirette da EtG contenuto negli alimenti o nei prodotti cosmetici. In casi estremi possono essere utilizzati peli di braccia e gambe, per i quali però gli studi di letteratura sono molto scarsi e il dato quantitativo risulta di difficile interpretazione²³.

La performance diagnostica dell'EtG, se confrontata con quella degli altri biomarcatori del consumo alcolico, è significativamente superiore ($P < 0.05$)^{8,24}, ad eccezione di alcune specifiche condizioni quali, per esempio, in casi di risultati falsi negativi dovuti al trattamento chimico o termico dei capelli (decolorazioni, permanente etc.)²⁵⁻²⁹, o in caso di impiego di prodotti cosmetici contaminati con EtG^{30,31}. In questi casi, l'impiego di un differente marcatore può migliorarne la performance diagnostica. Inoltre, alcuni studi di letteratura hanno riguardato l'identificazione di un marcatore di trattamenti cosmetici di tipo ossidativo (decolorazioni, tinte etc.), come il PTCA (*Pyrrrole 2,3,5 Tricarboxylic Acid*)^{27,32,33}. Tuttavia, ad oggi, l'impiego di tale marcatore, con metodiche non ancora standardizzate, non può rivestire validità medico-legale, ma costituire la fonte di informazioni aggiuntive, utili ad una valutazione più completa del dato analitico prodotto.

La tecnica strumentale più diffusa ed utilizzata per la ricerca dell'EtG nelle formazioni pilifere è costituita dalla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) con rivelatori a triplo quadrupolo; tuttavia, sono ampiamente descritte anche altre tecniche analitiche, gas- o liquido-cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa, anche ad alta risoluzione (GC-MS/MS, GC-HRMS, LC-HRMS)³. Possono essere utilizzate altre tecniche ad esclusivo scopo di *screening*, come le tecniche immunochimiche. Tali tecniche devono comunque garantire il raggiungimento di una sensibilità minima dei relativi metodi, fissata dalla SoHT a 5 pg/mg. Nel caso in cui siano adottate tecniche di *screening*, l'eventuale risultato non negativo deve essere necessariamente confermato mediante impiego di tecniche cromatografiche accoppiate a spettrometria di massa. Tutti i metodi utilizzati per la determinazione di EtG nelle formazioni pilifere, sia per *screening* che per conferma, devono garantire il raggiungimento di un limite inferiore di rivelazione (LOD) di 5 pg/mg³⁴.

La LC è comunemente condotta in fase inversa e interfacciata ad una ionizzazione *electrospray* (ESI) in modalità negativa, sebbene abbiano trovato impiego anche colonne cromatografiche a fase diretta (HILIC, *hydrophilic interaction chromatography*)³⁵⁻³⁷. La GC-MS/MS è utilizzata sia con ionizzazione ad impatto elettronico che con quella chimica. Comparativamente, la ionizzazione chimica negativa è la modalità che garantisce una maggiore sensibilità analitica³⁸.

Le modalità di trattamento dei campioni di formazioni pilifere in fase preanalitica può influire sul valore quantitativo di EtG ottenuto, in quanto la resa estrattiva dell'analita dalla matrice biologica è influenzata da diversi fattori quali modalità di prelievo, decontaminazione, omogeneizzazione del campione, condizioni estrattive. Al fine di minimizzare la contaminazione esterna del campione,

che potrebbe causare false positività od incrementare artificialmente il valore quantitativo, il campione deve essere prelevato in sede idonea, e lavato mediante l'adozione di protocolli di decontaminazione che si differenziano per tipologia di solvente o miscele di solventi, numerosità dei cicli di lavaggio, volume di solvente^{39,40}. Le diverse tecniche di comminazione del campione rappresentano la variabile preanalitica maggiormente studiata e descritta in letteratura⁴¹⁻⁴⁴ e, dal 2014, raccomandazioni a favore della polverizzazione, rispetto al tagliuzzamento in frammenti di pochi mm, sono state incluse nel documento di consenso della SoHT^{13,45,46}. La procedura estrattiva più diffusa prevede l'aggiunta di un'idonea soluzione estraente (la più utilizzata è l'acqua deionizzata), l'incubazione a temperatura ambiente e/o l'impiego di un bagno ad ultrasuoni. Infine, alcuni protocolli prevedono l'utilizzo di colonnine per l'estrazione in fase solida (SPE). Anche relativamente alla fase estrattiva, in letteratura sono descritti molteplici protocolli³ che si differenziano per la scelta del solvente(i), la durata della permanenza nel bagno ad ultrasuoni, la temperatura di incubazione, così come la scelta della fase assorbente dei sistemi SPE.

Bibliografia di riferimento

1. Woźniak, M. K., Wiergowski, M., Namieśnik, J., Biziuk, M. Biomarkers of Alcohol Consumption in Body Fluids – Possibilities and Limitations of Application in Toxicological Analysis. *Curr Med Chem* **26**, 177–196 (2019).
2. Foti, R. S., Fisher, M. B. Assessment of UDP-glucuronosyltransferase catalyzed formation of ethyl glucuronide in human liver microsomes and recombinant UGTs. *Forensic Sci Int* **153**, 109–116 (2005).
3. Biondi, A., Freni, F., Carelli, C., Moretti, M., Morini, L. Ethyl glucuronide hair testing: A review. *Forensic Sci Int* **300**, 106–119 (2019).
4. Skopp, G., Schmitt, G., Pötsch, L., Drönner, P., Aderjan, R., Mattern, R. Ethyl glucuronide in human hair. *Alcohol and Alcoholism* **35**, 283–285 (2000).
5. Høiseth, G., Morini, L., Poletti, A., Christophersen, A., Mørland, J. Ethyl Glucuronide in hair compared with traditional alcohol biomarkers-a pilot study of heavy drinkers referred to an alcohol detoxification unit. *Alcohol Clin Exp Res* **33**, 812–816 (2009).
6. Hastedt, M., Büchner, M., Rothe, M., Gapert, R., Herre, S., Krumbiegel, F., Tsokos, M., Kienast, T., Heinz, A., Hartwing, S. Detecting alcohol abuse: traditional blood alcohol markers compared to ethyl glucuronide (EtG) and fatty acid ethyl esters (FAEEs) measurement in hair. *Forensic Sci Med Pathol* **9**, 471–477 (2013).
7. Andresen-Streichert, H., Müller, A., Glahn, A., Skopp, G., Sterneck, M. Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts. *Dtsch Arztebl Int* (2018) doi:10.3238/arztebl.2018.0309.
8. Nanau, R., Neuman, M. Biomolecules and Biomarkers Used in Diagnosis of Alcohol Drinking and in Monitoring Therapeutic Interventions. *Biomolecules* **5**, 1339–1385 (2015).
9. Politi, L., Morini, L., Leone, F., Poletti, A. Ethyl glucuronide in hair: is it a reliable marker of chronic high levels of alcohol consumption? *Addiction* **101**, 1408–1412 (2006).
12. Kintz, P., Salomone, A., Vincenti, M. *Hair Analysis in Clinical and Forensic Toxicology*. (Ed. Academic Press, 2015).
13. Society of Hair Testing (SoHT). 2019 Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption. https://www.soht.org/images/pdf/Revision_2019_Alcoholmarkers.pdf.

14. Agius, R., Ferreira, L. M., Yegles, M. Can ethyl glucuronide in hair be determined only in 3cm hair strands? *Forensic Sci Int* **218**, 3–9 (2012).
15. Boscolo-Berto, R., Viel, G., Montisci, M., Terranova, C., Favretto, D., Ferrara, S. D. Ethyl glucuronide concentration in hair for detecting heavy drinking and/or abstinence: a meta-analysis. *Int J Legal Med* **127**, 611–619 (2013).
16. Morini, L., Politi, L., Poletti, A. Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking. *Addiction* **104**, 915–920 (2009).
17. Boscolo-Berto, R., Favretto, D., Cecchetto, G., Vincenti, M., Kronstrand, R., Ferrara, S. D., Viel, G. Sensitivity and Specificity of EtG in Hair as a Marker of Chronic Excessive Drinking. *Ther Drug Monit* **36**, 560–575 (2014).
18. Appenzeller, B. M. R., Schuman, M., Yegles, M., Wennig, R. Ethyl glucuronide concentration in hair is not influenced by pigmentation. *Alcohol and Alcoholism* **42**, 326–327 (2007).
19. Crunelle, C. L., Neels, H., Maudens, K., De Doncker, M., Cappelle, D., Matthys, F., Dom, G., Fransen, E., Michielsen, P., De Keukeleire, S., Covaci, A., Yegles, M. Influence of Body Mass Index on Hair Ethyl Glucuronide Concentrations. *Alcohol and Alcoholism* **52**, 19–23 (2017).
20. Crunelle, C. L., Yegles, M., Neels, H. How to Interpret Hair EtG Concentrations in Individuals with High Body Mass Index? Brief Commentary on: Influence of Body Mass Index on Hair Ethyl Glucuronide Concentrations. *Alcohol and Alcoholism* **54**, 188–189 (2019).
21. Pirro, V., Di Corcia, D., Pellegrino, S., Sciutteri, B., Salomone, A. A study of distribution of ethyl glucuronide in different keratin matrices. *Forensic Sci Int* **210**, 271–277 (2011).
22. Crunelle, C. L., Yegles, M., van Nuijs, A. L. N., Covaci, A., De Doncker, M., Maudens, K. E., Sabbe, B., Dom, G., Lambert, W. E., Michielsen, P., Neel, H. Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: A review of the current state of the art. *Drug Alcohol Depend* **134**, 1–11 (2014).
23. Pragst, F., Balikova, M. A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta* **370**, 17–49 (2006).
24. Kharbouche, H., Faouzi, M., Sanchez, N., Daepfen, J. B., Augsburg, M., Mangin, P., Staub, C., Sporkert, F. Diagnostic performance of ethyl glucuronide in hair for the investigation of alcohol drinking behavior: a comparison with traditional biomarkers. *Int J Legal Med* **126**, 243–250 (2012).
25. Petzel-Witt, S., Pogoda, W., Wunder, C., Paulke, A., Schubert-Zsilavec, M., Toennes, S. W. Influence of bleaching and coloring on ethyl glucuronide content in human hair. *Drug Test Anal* **10**, 177–183 (2018).
26. Kerekes, I., Yegles, M. Coloring, bleaching, and perming: Influence on EtG content in hair. *Ther Drug Monit* **35**, 527–529 (2013).
27. Casati, S., Ravelli, A., Angeli, I., Bergamaschi, R. F., Binelli, G., Minoli, M., Orioli, M. PTCA (1-H-Pyrrole-2,3,5-Tricarboxylic Acid) as a Marker for Oxidative Hair Treatment: Distribution, Gender Aspects, Correlation with EtG and Self-Reports. *J Anal Toxicol* **45**, 513–520 (2021).
28. Crunelle, C. L., Yegles, M., De Doncker, M., Dom, G., Cappelle, D., Maudens, K. E., van Nuijs, A. L. N., Covaci, A., Neels, H. Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients. *Forensic Sci Int* **247**, 18–22 (2015).

29. Morini, L., Zucchella, A., Polettini, A., Politi, L., Groppi, A. Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: An in vitro experiment. *Forensic Sci Int* **198**, 23–27 (2010).
30. Sporkert, F., Kharbouche, H., Augsburger, M. P., Klemm, C., Baumgartner, M. R. Positive EtG findings in hair as a result of a cosmetic treatment. *Forensic Sci Int* **218**, 97–100 (2012).
31. Arndt, T., Schröfel, S., Stemmerich, K. Ethyl glucuronide identified in commercial hair tonics. *Forensic Sci Int* **231**, 195–198 (2013).
32. Casati, S., Ravelli, A., Angeli, I., Bergamaschi, R. F., Binelli, G., Minoli, M., Orioli, M. PTCA (1-H-Pyrrole-2,3,5-Tricarboxylic Acid) as a Marker for Oxidative Hair Treatment: Distribution, Gender Aspects, Correlation with EtG and Self-Reports. *J Anal Toxicol* **45**, 513–520 (2021).
33. Petzel-Witt, S., Meier, S. I., Schubert-Zsilavec, M., Toennes, S. W. PTCA (1H-pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid) as a marker for oxidative hair treatment. *Drug Test Anal* **10**, 768–773 (2018).
34. Committee of experts and finally approved by the General Assembly of SoHT. Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption. Preprint at https://www.soht.org/images/pdf/Revision_2019_Alcoholmarkers.pdf (2019).
35. Tarcomnicu, I., van Nuijs, A. L. N., Aerts, K., De Doncker, M., Covaci, A., Neels, H. Ethyl glucuronide determination in meconium and hair by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* **196**, 121–127 (2010).
36. Palumbo, D., Fais, P., Calì, A., Lusardi, M., Bertol, E., Pascali, J. P. Novel zwitterionic HILIC stationary phase for the determination of ethyl glucuronide in human hair by LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* **1100–1101**, 33–38 (2018).
37. Yaldiz, F., Daglioglu, N., Hilal, A., Keten, A., Gülmen, M. K. Determination of ethyl glucuronide in human hair by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Forensic Leg Med* **20**, 799–802 (2013).
38. Cappelle, D., Neels, H., Yegles, M., Paulus, J., van Nuijs, A. L. N., Covaci, A., Crunelle, C. L. Gas chromatographic determination of ethyl glucuronide in hair: Comparison between tandem mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry. *Forensic Sci Int* **249**, 20–24 (2015).
39. Crunelle, C. L., Yegles, M., van Nuijs, A. L. N., Covaci, A., De Doncker, M., Maudens, K. E., Sabbe, B., Dom, G., Lambert, W. E., Michiels, P., Neels, H. Hair ethyl glucuronide levels as a marker for alcohol use and abuse: A review of the current state of the art. *Drug Alcohol Depend* **134**, 1–11 (2014).
40. Bossers, L. C. A. M., Paul, R., Berry, A. J., Kingston, R., Middendorp, C., Guwy, A. J. An evaluation of washing and extraction techniques in the analysis of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters from hair samples. *Journal of Chromatography B* **953–954**, 115–119 (2014).
41. Salomone, A., Baumgartner, M. R., Lombardo, T., Alladio, E., Di Corcia, D., Vincenti, M. Effects of various sample pretreatment procedures on ethyl glucuronide quantification in hair samples: Comparison of positivity rates and appraisal of cut-off values. *Forensic Sci Int* **267**, 60–65 (2016).
42. Mueller, A., Jungen, H., Iwersen-Bergmann, S., Raduenz, L., Lezius, S., Andresen-Streichert, H. Determination of ethyl glucuronide in human hair samples: A multivariate analysis of the impact of extraction conditions on quantitative results. *Forensic Sci Int* **271**, 43–48 (2017).
43. Kronstrand, R., Brinkhagen, L., Nyström, F. H. Ethyl glucuronide in human hair after daily consumption of 16 or 32g of ethanol for 3 months. *Forensic Sci Int* **215**, 51–55 (2012).

44. Kummer, N., Wille, S. M. R., Di Fazio, V., Del Mar Ramírez Fernández, M., Yegles, M., Lambert, W. e. E., Samyn, N. Impact of the Grinding Process on the Quantification of Ethyl Glucuronide in Hair Using a Validated UPLC–ESI–MS-MS Method. *J Anal Toxicol* **39**, 17–23 (2015).
45. Kintz, P. 2014 Consensus for the use of alcohol markers in hair for assessment of both abstinence and chronic excessive alcohol consumption. *Forensic Sci Int* **249**, A1–A2 (2015).
46. Society of Hair Testing (SoHT). 2016 Consensus for the use of alcohol markers in hair for assessment of both abstinence and chronic excessive alcohol consumption. <http://www.soht.org/images/pdf/Revision> (2016).

Determinazione di transferrina carboidrato carente (CDT) nel siero

L'interesse per la CDT come biomarcatore del consumo cronico di alcol è iniziato a seguito della segnalazione nel 1978, da parte del gruppo di ricerca di Stibler, di un profilo anomalo di transferrina (Tf) mediante focalizzazione isoelettrica (*isoelectric focusing*, IEF) nel liquido cerebrospinale (CSF) di pazienti con degenerazione cerebellare alcolica¹⁻³. Nel siero dei forti bevitori, le glicoforme minori della Tf (caratterizzata da almeno 6 glicoforme misurabili) con un punto isoelettrico (pI) di 5,7 o superiore, corrispondenti all'asialo-Tf (priva di entrambi i glicani), alla monosialo-Tf (con un glicano troncato) e alla disialo-Tf (privo di uno dei due glicani), presentano concentrazioni elevate rispetto ai controlli. Di conseguenza, nella letteratura più datata e talvolta anche in pubblicazioni recenti, il misurando CDT è definito come la somma di asialo-, monosialo- e disialo-Tf⁴.

È stato dimostrato che la concentrazione relativa di asialo- e disialo-Tf, ma non di monosialo-Tf o trisialo-Tf, sono associate a un forte consumo di alcol, avendo un'emivita di circa 10 giorni⁵. Tuttavia, la frazione di asialo-Tf è solitamente misurabile solo dopo l'assunzione cronica e molto elevata di alcolici per cui non risulta misurabile con adeguata accuratezza in molte circostanze analitiche, sebbene appaia sopra il valore medio^{6,7}. Questo ha portato alla scelta della disialo-Tf come target analitico principale per la CDT. Per compensare le fluttuazioni intra-individuali della Tf sierica e, quindi, delle concentrazioni di CDT, come in caso di carenza di ferro, malattie croniche o gravidanza, l'espressione della CDT come proporzione relativa della Tf totale (%CDT) è stata introdotta a metà degli anni '90 ed è diventata lo standard internazionale⁸.

Metodi analitici basati sulla cromatografia liquida (LC)⁶ e sull'elettroforesi capillare (CE)⁹ hanno dimostrato una maggiore accuratezza e specificità analitica. Un vantaggio principale dei metodi che utilizzano LC e CE rispetto ai metodi che impiegano tecniche immunochimiche è rappresentato dalla visualizzazione delle glicoforme della Tf. Ciò è particolarmente importante in presenza di varianti genetiche della Tf o di altri modelli di glicoforme aberranti come il cosiddetto "*di-tri bridging*" che si verifica in alcune patologie epatiche.

L'uso di diversi metodi analitici per la CDT, con diversi misurandi e diversi *cut-off*, ha creato una certa confusione nell'interpretazione e nel confronto dei risultati. Per questo motivo, nel 2005 la federazione internazionale di chimica clinica e medicina di laboratorio (*The International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* - IFCC) ha istituito un gruppo di lavoro sulla standardizzazione della CDT (*working group on CDT*, WG-CDT). Nella sua prima pubblicazione, il WG-CDT ha sottolineato che l'armonizzazione e la calibrazione dovrebbero basarsi su un singolo analita e non su una miscela di due o più componenti. Il WG-CDT ha scelto la disialo-Tf come unico analita su cui basare la standardizzazione, poiché questa la glicoforma esprime la migliore correlazione con il consumo di alcol⁸.

Sia CE che LC sono tecniche di separazione efficienti, in grado di fornire una separazione completa, una totale visualizzazione ed una quantificazione delle principali glicoforme di Tf. Confrontando LC e CE in modo più dettagliato, LC con rivelazione UV-Vis è considerata migliore ed è diventata la procedura di misurazione di riferimento (*candidate reference measurement procedure*, cRMP) per la CDT, a causa della sua maggiore specificità di rivelazione, basata sulla misurazione selettiva dell'assorbanza della transferrina satura di ferro a 470 nm. Al contrario, la CE

si basa sulla rivelazione, meno specifica, del legame peptidico a 200 nm. I risultati dell'analisi della CDT mediante LC e CE mostrano comunque, in genere, un'eccellente correlazione^{10,11}, salvo casi particolari¹². Il WG-CDT ha, inoltre, concordato di utilizzare l'integrazione dei picchi sulla linea di base anziché l'approccio da valle a valle. Questa pratica ha dimostrato di ridurre il coefficiente di variazione inter-laboratorio^{5,13}. È stata, infine, creata una rete internazionale di laboratori di riferimento per la CDT che utilizzano il metodo cRMP LC e questa rete ha generato risultati riproducibili sia per i campioni di siero che per i candidati a materiali di riferimento propost¹⁴. Il materiale di riferimento eletto per la CDT, ovvero siero umano nativo congelato, si è dimostrato stabile durante la spedizione e la conservazione, ed ha permesso di ottenere risultati corretti e riproducibili all'interno dei laboratori della rete che utilizzano il cRMP.

La CDT è l'unico biomarcatore dell'alcol ad aver raggiunto la standardizzazione internazionale IFCC, compresa la definizione dei *cut-off* per la definizione clinica di abuso alcolico cronico o ripetuto (1,7% in ambito clinico e 2,0% in ambito forense, tenendo conto dell'incertezza di misura). Sono disponibili anche calibratori e materiali di riferimento certificati. Inoltre, la CDT è attualmente l'unico biomarcatore di abuso alcolico approvato dalla FDA. La sostenibilità del biomarcatore è garantita dalla rete IFCC CDT.

La determinazione della CDT è eseguita principalmente su campioni di siero. Il prelievo di siero può essere effettuato utilizzando provette con separatori di gel e/o acceleratori di coagulazione¹⁵. Oltre al siero, l'uso di *spot* di sangue essiccato (*dried blood spot*, DBS) potrebbe rappresentare una valida alternativa alla veni-puntura, nei casi in cui il siero sia difficilmente ottenibile¹⁶. Per quanto riguarda la stabilità dei campioni, le concentrazioni sieriche di CDT non sono influenzate dalla conservazione a temperatura ambiente per un massimo di 30 ore. L'esposizione a temperatura ambiente per periodi superiori a una settimana porta alla degradazione della Tf e all'aumento della frazione esasio-Tf. Altri studi segnalano come i campioni siano stabili se conservati a +4°C per circa 10 settimane o a -20°C fino a 2 anni. Inoltre, il congelamento e lo scongelamento ripetuti non interferiscono con la corretta determinazione della CDT sierica¹³.

Il trattamento del campione per la determinazione della CDT inizia solitamente con la saturazione con ferro, poiché la carica complessiva delle glicoforme della Tf influenza la loro separazione. Inoltre, tra le fasi preanalitiche che possono interferire con la quantificazione delle glicoforme della Tf va menzionato il trattamento dell'iperlipemia per i metodi in LC¹³.

Nel corso degli anni sono stati condotti molti studi e sono stati trattati e dibattuti diversi argomenti a favore o in contrasto del valore diagnostico (sensibilità e specificità) del biomarcatore CDT. In generale, è stato riscontrato che la dieta, i comuni farmaci da prescrizione e il disulfiram non influenzano la concentrazione serica di CDT¹⁷.

Nella letteratura meno recente, in cui la CDT era determinata con obsoleti "metodi immunometrici a due *step*" o non era espressa come %CDT, si riportava erroneamente il rischio di falsi positivi nei casi di fibrosi cistica, cirrosi biliare primaria, proteina C-reattiva serica elevata, diabete mellito di tipo 2, terapie con farmaci antiepilettici e anoressia nervosa. L'introduzione di tecniche di separazione e quantificazione della Tf moderne, in particolare LC cRMP, ha permesso di ottenere profili completi delle glicoforme, evitando così tali interferenze¹⁸. Esistono, tuttavia, alcune condizioni che influenzano il potere diagnostico della CDT, o che comunque ne rendono difficile

l'interpretazione, tra cui la gravidanza nel terzo trimestre, la presenza di varianti genetiche della Tf, i disordini congeniti della glicosilazione (CDG) e le malattie epatiche acute o croniche in fase avanzata (spesso caratterizzate dal cosiddetto *bridging* di-trisialo)¹⁹⁻²³. Tuttavia, la maggior parte di queste condizioni sono facilmente riconoscibili clinicamente. Benché piuttosto rare (ad esempio, le varianti genetiche), o facilmente identificabili (ad esempio, il terzo trimestre di gravidanza), queste potenziali interferenze pongono importanti problemi di interpretazione e richiedono un approccio integrato basato su evidenze cliniche e di laboratorio, compresi gli altri moderni biomarcatori del consumo di alcol. Infine, è opinione condivisa che la CDT non rappresenti un biomarcatore affidabile per individuare condizioni di *binge drinking*, che attualmente rappresenta una forma piuttosto comune di abuso di alcol²⁴.

Negli ultimi decenni, l'uso della CDT come biomarcatore di abuso cronico di alcol ha trovato applicazione in vari contesti forensi, come l'affidamento minorile, gli incidenti sul lavoro, i lavori con mansioni a rischio, il possesso del porto d'armi, e altre controversie civili. Tuttavia, l'applicazione più diffusa della CDT rimane nel campo della certificazione dell'idoneità al possesso della patente di guida e a mansioni lavorative che comportino rischi per l'incolumità del lavoratore e di terzi.

Bibliografia di riferimento

1. V.I. Reus, L.J. Fochtmann, O. Bukstein, A.E. Eyler, D.M. Hilty, M. Horvitz-Lennon, J. Mahoney, J. Pasic, M. Weaver, C.D. Wills, J. McIntyre, J. Kidd, J. Yager, S.-H. Hong, The American Psychiatric Association Practice Guideline for the Pharmacological Treatment of Patients With Alcohol Use Disorder., *Am. J. Psychiatry.* 175 (2018) 86–90. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2017.1750101>.
2. I. Borrelli, M.R. Gualano, A. Perrotta, M.F. Rossi, P.E. Santoro, U. Moscato, The Use of Carbohydrate-Deficient Transferrin in Occupational Setting: A Systematic Review, *Occup. Med. Heal. Aff.* 10 (2022) 1000411.
3. H. Stibler, Carbohydrate-Deficient Transferrin in Serum: a New Marker of Potentially Harmful Alcohol Consumption Reviewed, *Clin. Chem.* 37 (1991) 2029–2037.
4. A. Dasgupta, Chapter 6 - Mean Corpuscular Volume and Carbohydrate-Deficient Transferrin as Alcohol Biomarkers, in: A.B.T.-A. and its B. Dasgupta (Ed.), *Clin. Asp. Lab. Determ.*, Elsevier, San Diego, 2015: pp. 139–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800339-8.00006-7>.
5. A. Helander, J. Wienders, R. Anton, T. Arndt, V. Bianchi, J. Deenmamode, J.-O. Jeppsson, J.B. Whitfield, C. Weykamp, F. Schellenberg, Standardisation and use of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT), *Clin. Chim. Acta.* 459 (2016) 19–24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.05.016>.
6. A. Helander, A. Husa, J.O. Jeppsson, Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1881–1890.
7. N.M. Porpiglia, S.A. Savchuk, S.A. Appolonova, F. Bortolotti, F. Tagliaro, Capillary Electrophoresis (CE) vs. HPLC in the determination of asialo-Tf, a crucial marker for the reliable interpretation of questioned CDT increases, *Clin. Chim. Acta.* 486 (2018) 49–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.07.031>.
8. J.O. Jeppsson, T. Arndt, F. Schellenberg, J.P.M. Wienders, R.F. Anton, J.B. Whitfield, A.

- Helander, Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method, *Clin. Chem. Lab. Med.* 45 (2007) 558–562. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.107>.
9. C. Lanz, M. Kuhn, V. Deiss, W. Thormann, Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera, *Electrophoresis*. 25 (2004) 2309–2318.
 10. C. Weykamp, J.P.M. Wienders, A. Helander, R.F. Anton, V. Bianchi, J.O. Jeppsson, C. Siebelder, J.B. Whitfield, F. Schellenberg, Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: III. Performance of native serum and serum spiked with disialotransferrin proves that harmonization of CDT assays is possible, *Clin. Chem. Lab. Med.* 51 (2013) 991–996. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0767>.
 11. F. Schellenberg, J.P.M. Wienders, Evaluation of capillary electrophoresis assay for CDT on SEBIA's Capillary System: Intra and inter laboratory precision, reference interval and cut-off, *Clin. Chim. Acta.* 411 (2010) 1888–1893. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.015>.
 12. N. Kenan, S. Husand, A. Helander, Importance of HPLC confirmation of problematic carbohydrate-deficient transferrin (CDT) results from a multicapillary electrophoresis routine method, *Clin. Chim. Acta.* 411 (2010) 1945–1950. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.006>.
 13. F. Schellenberg, J. Wienders, R. Anton, V. Bianchi, J. Deenmamode, C. Weykamp, J. Whitfield, J.O. Jeppsson, A. Helander, IFCC approved HPLC reference measurement procedure for the alcohol consumption biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT): Its validation and use, *Clin. Chim. Acta.* 465 (2017) 91–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.12.022>.
 14. A. Helander, J.P.M. Wienders, J.O. Jeppsson, C. Weykamp, C. Siebelder, R.F. Anton, F. Schellenberg, J.B. Whitfield, Toward standardization of Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: II. Performance of a laboratory network running the HPLC candidate reference measurement procedure and evaluation of a candidate reference material, *Clin. Chem. Lab. Med.* 48 (2010) 1585–1592. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2010.322>.
 15. T. Arndt, D. Czylik, R. Hackler, A. Helwig-Rolig, T. Gilg, Carbohydrate-deficient transferrin is not affected by serum separators, *Alcohol Alcohol.* 33 (1998) 447–450. <https://doi.org/10.1093/alcalc/33.5.447>.
 16. A. Bertaso, D. Sorio, A. Vandoros, E.F. De Palo, F. Bortolotti, F. Tagliaro, Use of finger-prick dried blood spots (fpDBS) and capillary electrophoresis for carbohydrate deficient transferrin (CDT) screening in forensic toxicology., *Electrophoresis*. 37 (2016) 2867–2874. <https://doi.org/10.1002/elps.201500588>.
 17. T. Arndt, Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation, *Clin. Chem.* 47 (2001) 13–27. <http://clinchem.aaccjnls.org/content/47/1/13.abstract>.
 18. V. Bianchi, Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and heavy alcohol consumption, *Biochim. Clin.* 39 (2015) 17–24. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84943223565&partnerID=40&md5=cbe3c6795cceb2ef1ba2fa3b90b285a9>.
 19. J.P. Bergström, A. Helander, HPLC evaluation of clinical and pharmacological factors reported to cause false-positive carbohydrate-deficient transferrin (CDT) levels, *Clin. Chim. Acta.* 389 (2008) 164–166. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.11.020>.
 20. F. Bortolotti, R. Raffaelli, N. Di Simone, M. Semprebon, M. Mirandola, C. Simonetto, F. De

- Marchi, M.T. Trevisan, G. Carli, R.M. Dorizzi, G. Scambia, M. Franchi, F. Tagliaro, CDT reference values for monitoring chronic alcohol abuse in pregnancy., *Clin. Chim. Acta.* 507 (2020) 156–160. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.04.014>.
21. J. Caslavská, C. Lanz, P. Burda, M. Tobler, W. Thormann, Analysis of genetic variants of transferrin in human serum after desialylation by capillary zone electrophoresis and capillary isoelectric focusing, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 2488–2497.
 22. J. Jaeken, Congenital Disorders of Glycosylation, *Ann. New York Acad. Sci.* 1214 (2010) 190–198. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.2.1.129>.
 23. S.H. Stewart, S. Comte-Walters, E. Bowen, R.F. Anton, Liver Disease and HPLC Quantification of Disialotransferrin for Heavy Alcohol Use: A Case Series, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 34 (2010) 1956–1960. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01285.x>.
 24. J. V Sakran, A. Mehta, M.M. Matar, D.A. Wilson, A.J. Kent, R.F. Anton, S.M. Fakhry, The Utility of Carbohydrate-Deficient Transferrin in Identifying Chronic Alcohol Users in the Injured Patient: Expanding the Toolkit, *J. Surg. Res.* 257 (2021) 92–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jss.2020.07.027>.
 25. WHO, WHO Expert Committee on Problems Related to Alcohol Consumption. Second report., World Health Organ. Tech. Rep. Ser. (2007) 1–53, 55–7, back cover.
 26. J. Yao, R.B. Voas, J.H. Lacey, Drivers with alcohol use disorders and their risks of crash involvement, *Drug Alcohol Depend.* 183 (2018) 210–216. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2017.10.040>.
 27. N.M. Porpiglia, F. Tagliaro, R. Micciolo, L. Canal, G. Musile, F. Bortolotti, New evidence of high association between carbohydrate deficient transferrin (CDT) and alcohol-related road traffic accidents. A retrospective study on 929 injured drivers, *Forensic Sci. Int.* 340 (2022) 111438. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111438>.
 28. F. Bortolotti, R. Micciolo, L. Canal, F. Tagliaro, First Objective Association Between Elevated Carbohydrate-Deficient Transferrin Concentrations and Alcohol-Related Traffic Accidents, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39 (2015) 2108–2114. <https://doi.org/10.1111/acer.12879>.
 29. N.M. Porpiglia, F. Bortolotti, R.M. Dorizzi, R. Micciolo, F. Tagliaro, Critical Evaluation of the Association Between Elevated Mean Corpuscular Volume and Alcohol-Related Traffic Accidents: A Retrospective Study on 6244 Car Crash Cases, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 43 (2019) 1528–1532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/acer.14046>.
 30. N.M. Porpiglia, F. Bortolotti, R. Micciolo, L. Canal, M. Murari, F. Gibelli, F. Tagliaro, CDT vs. GGT for the certification of the fitness to hold the driving license. A comparison based on the association of incremented values with the occurrence of alcohol-related road traffic accidents., *Drug Alcohol Depend.* 228 (2021) 109088. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.109088>.

Determinazione di Fosfatidiletanolo (*Phosphatidylethanol* - Peth) nel sangue intero

Il fosfatidiletanolo (Peth) comprende un gruppo di fosfolipidi che si formano nelle membrane cellulari dei globuli rossi a seguito della reazione di fosfatidilcolina con alcol etilico, catalizzata dall'enzima fosfolipasi D. I diversi fosfolipidi ottenuti si differenziano per i due acidi grassi a catena lunga (R1 e R2) presenti nella struttura base dell'etanolfosfogliceride^{1,2}.

L'omologo Peth 16:0/18:1, contenente i gruppi esterei di un acido palmitico e un acido oleico, rappresenta la specie più abbondante e corrisponde stabilmente al 35%-45% del Peth totale³, per cui recentemente si preferisce determinare analiticamente questo singolo omologo in rappresentanza del Peth totale. Anche se la dieta personale può influenzare l'abbondanza dei singoli omologi, la variazione individuale dell'omologo Peth 16:0/18:1 è ampiamente ricompresa nell'ambito di fluttuazione dei diversi fattori di influenza. In pratica, per passare dalla scala di misura del Peth totale a quella del Peth 16:0/18:1 si può usare il fattore moltiplicativo di 0,4, corrispondente al 40% del totale⁴.

Il Peth si può formare nel sangue soltanto in presenza di etanolo, per cui è considerato un biomarcatore diretto di consumo alcolico, peraltro non soggetto a condizioni note di falsa positività. Cautelativamente, si è comunque affermato nel tempo un valore-soglia di 20 ng/mL di Peth nel sangue, riferito alla forma 16:0/18:1^{5,6}, per distinguere astinenza e consumo di alcol etilico. In altri termini, concentrazioni di Peth comprese fra il limite di rilevabilità (LOD, generalmente inferiore a 2 ng/mL e progressivamente più basso con l'evoluzione strumentale) e 20 ng/mL sono comunemente interpretate come “non contraddittorie” rispetto ad un'asserzione di astinenza dal consumo alcolico. Al contrario, concentrazioni di Peth pari o superiori a 20 ng/mL sono ritenute comprovanti di assunzione giornaliera di almeno 2,5 unità alcoliche (~30 g/die) per i maschi e di 1,5 unità alcoliche (~20 g/die) per le femmine.

Nell'interpretazione dei dati analitici occorre tener presente la cinetica di formazione e metabolizzazione del Peth. Il Peth inizia a prodursi immediatamente dopo l'assunzione di alcol e raggiunge il picco massimo di concentrazione circa 8 ore dopo^{7,8}. Una volta formato, il Peth degrada molto lentamente, rendendolo utile come biomarcatore di consumo. Il tempo di emivita del Peth nel sangue è stimato in 3-6 giorni³, in funzione della variabilità individuale e tenendo conto che per i forti bevitori occorre utilizzare il limite minimo dell'intervallo, in ragione della loro più rapida capacità di metabolizzazione sviluppata nel tempo⁹⁻¹¹. Per fare un esempio, un picco di Peth di 200 ng/mL, seguito da astinenza, richiederà 10-20 giorni per scendere al di sotto della citata soglia di 20 ng/mL, giudicata compatibile con l'astinenza. Sostanzialmente, i fattori che determinano la concentrazione di Peth nel sangue sono: quantità di alcol ingerito, frequenza/rapidità nel consumo, tempo trascorso dal consumo. Non risultano differenze ascrivibili al genere^{8,11,12}, mentre un fattore di qualche significatività è rappresentato dal rapporto fra il grasso corporeo e il contenuto corporeo di acqua. Pur nella variabilità dei fattori di influenza, da rivalutare in condizioni limite, il Peth è attualmente considerato un importante biomarcatore di consumo alcolico riferito ai 30 giorni antecedenti il prelievo di sangue. Concentrazioni di Peth di 80-200 ng/mL risultano indicative dell'ingestione di significative quantità di alcol nelle settimane antecedenti il controllo⁶, per consumo regolare o mediante “*binge-drinking*”, mentre concentrazioni di Peth superiori a 200 ng/mL sono comunemente associate ad un consumo molto elevato di alcol, spesso in combinazione con la cronicità del consumo¹. Benché in passato siano stati effettuati molti studi per identificare

tutti i diversi omologhi del Peth^{13,14}, l'utilizzo pratico di questo biomarcatore alcolico restringe l'interesse analitico al solo omologo maggioritario 16:0/18:1. I successivi omologhi più abbondanti sono 16:0/18:2 (~25%) e 16:0/20:4 (~13%).

Nel contesto dell'accertamento dell'abuso alcolico cronico, utile ad esempio nell'ambito della certificazione dell'idoneità al possesso della patente di guida, il valore soglia più comunemente adottato (~200 ng/mL) è di due ordini di grandezza superiore al LOD fornito dai più comuni metodi analitici. Ciò comporta l'assenza di vincoli di sensibilità e apre la strada alla possibilità di effettuare micro-campionamenti di sangue con minima invasività nei confronti dei soggetti controllati.

La tecnica strumentale più diffusamente utilizzata per l'analisi del Peth, eventualmente in abbinamento con etil glucuronato (EtG) ed etil solfato (EtS)^{15,16}, è costituita dall'accoppiamento della cromatografia liquida con la spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) con analizzatori a triplo quadrupolo¹⁷⁻²⁰, ma è ampiamente descritto anche l'uso di analizzatori di massa ad alta risoluzione in configurazione tandem, in accoppiamento con quadrupoli (LC-MS/HRMS)^{2,21,22}. Per ionizzare l'analita, viene utilizzata la tecnica *electrospray* (ESI), che tuttavia può soffrire di un significativo effetto-matrice, dovuto anche alla presenza dei diversi omologhi del Peth nel campione di sangue. Per limitare questo fenomeno deve essere posta attenzione alle condizioni di separazione cromatografica e/o alle condizioni di estrazione e purificazione del Peth^{19,23-25}.

Infine, come già citato, la concentrazione relativamente elevata dell'analita, unitamente all'elevata sensibilità della tecnica strumentale, consente l'uso generalizzato delle pratiche di campionamento micro-invasivo di sangue capillare, come quelle definite "*dried blood spot*", facilmente eseguibili "*on-site*" anche da personale non sanitario^{21,22,26-34}. Tale prerogativa rende il campionamento facilmente ottenibile, con minimo disagio per il soggetto controllato. In diversi studi, l'uso del Peth quale marcatore di abuso alcolico è posto a confronto con quello di altri marcatori, specialmente degli altri metaboliti diretti dell'alcol, quali EtG ed EtS, in contesti forensi e clinici³⁵⁻³⁷. In particolare, il confronto è stato effettuato fra il Peth nel sangue e gli altri due marcatori nella stessa matrice ematica³⁸, oppure in urina^{36,37}, oppure nei capelli^{9,37,39}. Infine, in alcuni studi il confronto con il Peth è stato esteso ad alcuni biomarcatori indiretti di consumo alcolico, quali: transferrina carboidrato-carente (CDT), volume globulare medio (MCV), γ -glutamilttransferasi (γ -GT) e altri^{5,40-42} ed ha dimostrato, rispetto a marcatori già noti, una maggiore sensibilità diagnostica a seguito del confronto in una limitata finestra di sorveglianza.

Bibliografia di riferimento

1. W. Ulwelling, K. Smith. The Peth blood test in the security environment: what it is; why it is important; and interpretative guidelines; J. Forensic Sci. 2018, 63, 1634.
2. Nalesso, G. Viel, G. Cecchetto, D. Mioni, G. Pessa, D. Favretto D, S.D. Ferrara. Quantitative profiling of phosphatidylethanol molecular species in human blood by liquid chromatography high resolution mass spectrometry; J. Chromatogr. A 2011, 1218, 8423.
3. G. Viel, R. Boscolo-Berto, G. Cecchetto, P. Fais, A. Nalesso, S.D. Ferrara. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: a systematic review and meta-analysis; Int. J. Mol. Sci. 2012, 13, 14788.

4. J.A. Hahn, R.F. Anton, M.A. Javors. The formation, elimination, interpretation, and future research needs of phosphatidylethanol for research studies and clinical practice. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2016, 40, 2292.
5. L. Walther, A. de Bejczy, E. Lof, T. Hansson, A. Andrsson, J. Guterstam, A. Hammarberg, G. Asanovska, J. Franck, B. Söderpalm, A. Isaksson. Phosphatidylethanol is superior to carbohydrate-deficient transferrin and glutamyltransferase as an alcohol marker and is a reliable estimate of alcohol consumption level. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2015, 39, 2200.
6. N. Daglioglu, P. Efeoglu Ozseker, H. Dengiz b, Z. Kekec Determination of phosphatidyl ethanol (Peth) 16:0/18:1 in dried blood samples of drivers involved in traffic accidents: A pilot study. *Legal Med.* 2022, 58, 102091.
7. H. Gnann, W. Weinmann, A. Thierauf. Formation of phosphatidylethanol and its subsequent elimination during an extensive drinking experiment over 5 days. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2012, 36, 1507.
8. A. Schrock, A. Thierauf-Emberger, S. Schurch, W. Weinmann. Phosphatidylethanol (Peth) detected in blood for 3 to 12 days after single consumption of alcohol – a drinking study with 16 volunteers. *Int. J. Legal Med.* 2017, 131, 153.
9. A. Schrock, M. Pfaffi, S. Konig, W. Weinmann. Application of phosphatidylethanol (Peth) in whole blood in comparison to ethyl glucuronide in Hair (hEtG) in driving aptitude assessment (DAA). *Int. J. Legal Med.* 2016, 130, 1527.
10. M.A. Javors, N. Hill-Kapturczak, J.D. Roache, T.E. Karns-Wright, D.M. Dougherty. Characterization of the pharmacokinetics of phosphatidylethanol 16:0/18:1 and 16:0/18:2 in human whole blood after alcohol consumption in a clinical laboratory study. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2016, 40, 12284.
11. A. Helander, O. Peter, Y. Zheng. Monitoring of the alcohol biomarkers Peth, CDT and EtG/EtS in an outpatient treatment setting. *Alcohol Alcohol.* 2012, 47, 552.
12. S.H. Stewart, A. Reuben, W.A. Brzezinski, D.G. Koch, J. Basile, P.K. Randall, P.M. Miller. Preliminary evaluation of phosphatidylethanol and alcohol consumption in patients with liver disease and hypertension. *Alcohol Alcohol.* 2009, 44, 464.
13. H. Gnann, C. Engelmann, G. Skopp, M. Winkler, V. Auwärter, S. Dresen, N. ferreirós, F.M. Wurst, W. weinmann. Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESIMS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010, 396, 2415.
14. A. Helander, Y. Zheng. Molecular species of the alcohol biomarker phosphatidylethanol in human blood measured by LC-MS. *Clin. Chem.* 2009, 55, 1395.
15. X. Zhang, F. Zheng, Z. Lin, S. Stybe Johansen, T. Yu, Y. Liu, Z. Huang, J. Li, J. Yan, Y. Rao. Simultaneous determination of ethanol's four types of non-oxidative metabolites in human whole blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta* 2017, 963, 68.
16. V.L. Nguyen, P. Paull, P.S. Haber, K. Chitty, D. Seth. Evaluation of a novel method for the analysis of alcohol biomarkers: ethyl glucuronide, ethyl sulfate and phosphatidylethanol. *Alcohol* 2018, 67, 7.
17. Y. Zheng, O. Beck, A. Helander. Method development for routine liquid chromatography–mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (Peth) in blood. *Clin. Chim. Acta* 2011, 412, 1428.
18. P. Cabarcos, J.Á. Cocho, A. Moreda, M. Míguez, M.J. Tabernero, P. Fernández, A.M. Bermejo. Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of

- phosphatidylethanol in blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 2013, 111, 189.
19. S. Wang, R. Yang, F. Ji, H. Li, J. Dong, W. Chen. Sensitive and precise monitoring of phosphatidylethanol in human blood as a biomarker for alcohol intake by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta* 2017, 166, 315.
 20. S. Casati, A. Ravelli, I. Angeli, R. Durello, M. Minoli, M. Orioli. An automated sample preparation approach for routine liquid chromatography tandem-mass spectrometry measurement of the alcohol biomarkers phosphatidylethanol 16:0/18:1, 16:0/16:0 and 18:1/18:1. *J. Chrom. A* 2019, 1589, 1.
 21. J. Déglon, T. Joye, E. Lauer, A. Thomas, M. Augsburger. Quantification of phosphatidylethanol combining dried blood spots sampling with Orbitrap-based LC-HRMS platform: method validation and proficiency testing. *Toxicol. Anal. Clin.* 2022, 34, S106.
 22. C. Ververi, M. Massano, E. Gerace, E. Alladio, M. Vincenti, A. Salomone. Phosphatidylethanol (Peth) in Dried Blood Spots: Development, validation and comparison between LC-MS/MS and QTOF methods. *Toxicol. Anal. Clin.* 2022, 34, S54.
 23. D. White, S. O'Halloran, S. Salman, G. MacQuillan, D.A. Joyce. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for erythrocyte phosphatidylethanol revealing critical considerations for its use as a clinical biomarker. *J. Chrom. B* 2022, 1192, 123134.
 24. L.D. Müller, S. Føreid. A comparison of an optimized automated sample preparation of Peth in blood pretreated by freezing versus manual preparation in whole blood, analyzing by UHPLC – MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2022, 212, 114635.
 25. M.H. Maria, B.M. Jørgenrud, T. Berg. Determination of eight phosphatidylethanol homologues in blood by reversed phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry – How to avoid coelution of phosphatidylethanols and unwanted phospholipids. *J. Chrom. A* 2022, 1684, 463566.
 26. N. Kummer, S.M.R. Wille, A. Poll, W.E.E. Lambert, N. Samyn, C.P. Stove. Quantification of EtG in hair, EtG and EtS in urine and Peth species in capillary dried blood spots to assess the alcohol consumption in driver's licence regranting cases. *Drug Alcohol Dependence.* 2016, 165, 191.
 27. O. Beck, N. Kenan Modén, S. Seferaj, G. Lenk, A. Helander. Study of measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (Peth) in dried blood spot (DBS) samples and application of a volumetric DBS device. *Clin. Chim. Acta* 2018, 479, 38.
 28. K. Van Uytvanghe, M. del Mar Ramirez Fernandez, A. De Vos, S.M.R. Wille, C.P. Stove. Quantitation of phosphatidylethanol in dried blood after volumetric absorptive microsampling. *Talanta* 2021, 223, 121694.
 29. M. Luginbühl, F. Stöth, W. Weinmann, S. Gaugler. Fully automated correction for the hematocrit bias of non-volumetric dried blood spot phosphatidylethanol analysis. *Alcohol* 2021, 94, 17.
 30. R. Fatch, M. Luginbühl, D.M. Cheng, S. Gaugler, N.I. Emenyonu, C. Ngabirano, J. Adong, W.R. Muyindike, J.H. Samet, K. Bryant, J.A. Hahn. Comparison of automated determination of phosphatidylethanol (Peth) in dried blood spots (DBS) with previous manual processing and testing. *Alcohol* 2022, 98, 51.

31. N. Daglioglu, P. Efeoglu Ozseker, H. Dengiz, Z. Kekec. Determination of phosphatidylethanol (Peth) 16:0/18:1 in dried blood samples of drivers involved in traffic accidents: a pilot study. *Legal Med.* 2022, 58, 102091.
32. L.M. Salah, L.R. Bushman, K.M. Brooks, P.L. Anderson, J.J. Kiser. Development and validation of an LC-MS/MS method to quantify the alcohol biomarker phosphatidylethanol 16:0/18:1 in dried blood spots for clinical research purposes. *J. Chrom. B* 2023, 1223, 123725.
33. F. Hakim, C. Ghouil, J.-F. Wiart, C. Richeval, Y. Delannoy, V. Hedouin, D. Allorge, J.-M. Gaulier. Added value evidences of a simultaneous determination of two phosphatidylethanol isoforms and ethylglucuronide in dried blood spots in forensic contexts. *Toxicol. Anal. Clin.* 2022, 34, S36.
34. W. Weinmann, F. Stöth, P. Pütz, D. Schuldis, A. Thierauf-Emberger. Optimization of DBS-self sampling for Peth in a drinking experiment with standard DBS cards and with a new design of volumetric DBS card. *Toxicol. Anal. Clin.* 2022, 34, S74.
35. F.M. Wurst, N. Thon, M. Yegles, A. Schrück, U.W. Preuss, W. Weinmann. Ethanol metabolites: their role in the assessment of alcohol intake. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2015, 39, 2060.
36. R. Mastrovito, F.G. Strathmann, Distributions of alcohol use biomarkers including ethanol, phosphatidylethanol, ethyl glucuronide and ethyl sulfate in clinical and forensic testing. *Clin. Biochem.* 2020, 82, 85.
37. N. Aboutara, A. Szewczyk, H. Jungen, A. Mosebach, M. Rodriguez Lago, E. Vettorazzi, S. IwersenBergmann, A. Müller, M. Sterneck. Phosphatidylethanol in patients with liver diseases of different etiologies: analysis of six homologues and comparison with other alcohol markers. *Clin. Chim. Acta* 2022, 524, 171.
38. J. Neumann, O. Beck, M. Böttcher. Phosphatidylethanol, ethyl glucuronide and ethanol in blood as complementary biomarkers for alcohol consumption. *J. Mass Spectrom. Adv. Clin. Lab* 2021, 22, 3.
39. C. Dumitrascu, C. Gys, S.M.R. Wille, M. del Mar Ramiréz-Fernandéz, D. D'Hondt, A. Van Goethem, B. Van Rafelghem, E. Baetens, W. Jacobs, H. Neels, A. Covaci, A.L.N. van Nuijs. The complementarity of phosphatidylethanol in whole blood and ethyl glucuronide in hair as biomarkers for the monitoring of alcohol use. *Drug Test. Anal.* 2023, early view.
40. N. Aboutara, A. Müller, H. Jungen, A. Szewczyk, V. van Rùth, F. Bertram, K. Püschel, F. Heinrich, S. Iwersen-Bergmann. Investigating the use of Peth, CDT and MCV to evaluate alcohol consumption in a cohort of homeless individuals – A comparison of different alcohol biomarkers. *For. Sci. Int.* 2022, 331, 111147.
41. E.M. Lowery, M. Walsh, M. Yong, E.J. Kovacs, C. Joyce, M. Afshar. Use of alcohol biomarkers to identify alcohol misuse in organ donors. *Alcohol* 2018, 73, 67.
42. Al- Arving , G. Høiseth, T. Hilberg, T. Trydal , A. Husa, A. Djordjevic, S. Kabas hi, V. Vindenes, S. Tore Bogstrand. Comparison of the diagnostic value of phosphatidylethanol and carbohydrate-deficient transferrin as biomarkers of alcohol consumption. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2021, 45, 153.

Determinazione degli esteri etilici degli acidi grassi (*Fatty acids ethyl esters* - FAEE) nelle formazioni pilifere

L'alcol etilico interferisce con l'attività della lipasi, sostituendo gli alcoli alifatici che esterificano normalmente gli acidi grassi. L'enzima implicato è la FAEE sintetasi. Ciò si traduce nella formazione di esteri etilici degli acidi grassi (FAEE), ovvero una classe di prodotti lipidici neutri¹, metaboliti non ossidativi dell'etanolo, ritenuti responsabili di danno d'organo. I FAEE si formano mediante sintesi cellulare direttamente dall'etanolo anche a dosi fisiologiche², ad esempio, nelle cellule del sangue mononucleate, ma la loro formazione è direttamente proporzionale al tasso alcolemico totale nel tempo, dato dall'area sotto la curva (AUC) della concentrazione alcolica nel sangue (*Blood Alcohol Concentration* - BAC)³.

I livelli di FAEE aumentano con i livelli di assunzione cronica^{4,5}; tuttavia, la variazione inter-individuale dei FAEE nei capelli è considerevole, con un'ampia sovrapposizione tra i soggetti che dichiarano un'assunzione abituale nulla, moderata o elevata^{4,6}. Infatti, si osservano sia valori nulli che elevati nei capelli di alcuni soggetti in tutti e tre i gruppi.

L'analisi segmentale dei capelli indica profili simili ma altamente individuali; questo fenomeno potrebbe essere dovuto al fatto che i FAEE si incorporano nei capelli principalmente dal sebo⁷. È stato dimostrato che la concentrazione dei FAEE nelle formazioni pilifere di diverse parti del corpo sono correlati, anche se con ampie variazioni intra- e inter-individuali⁸. I FAEE sono stati rilevati anche nel sebo raccolto mediante test con strofinamento cutaneo, dimostrando che gli alcolisti ed i bevitori sociali non differivano; tuttavia, il consumo eccessivo di alcol influenza i livelli di sebo cutaneo⁹. Infine, potrebbero potenzialmente esistere percorsi di formazione endogena dei FAEE.

In uno studio dedicato, gli autori non hanno trovato alcuna correlazione tra FAEE ed EtG nei capelli⁴, indicando che l'incorporazione di questi composti può essere influenzata da processi biochimici o fisiologici diversi. I FAEE sono risultati misurabili in tutti i campioni di capelli, anche nei capelli dei bambini.

Nell'ultima versione di *Consensus* della SoHT è definito l'etil palmitato (EtPa) nei capelli come estere etilico degli acidi grassi maggiormente indicativo del consumo pregresso e continuativo di alcol etilico¹⁰.

La formazione dei FAEE può essere influenzata dall'uso dei prodotti per capelli contenenti alcol¹¹: un test negativo per FAEE o EtG nel siero o EtG nelle urine, in presenza di un test positivo a FAEE o EtG nei capelli, è considerato indicativo dell'uso di prodotti per capelli a base alcolica.

I livelli di FAEE nei capelli possono essere influenzati negativamente da shampoo e/o altri prodotti per capelli, che potrebbero potenzialmente estrarre FAEE dalla matrice biologica¹¹. In ampi studi trasversali su casi di interesse forense, né la composizione corporea né l'uso di cera per capelli, grasso, olio, gel o spray hanno avuto effetti importanti sui livelli di FAEE dei capelli¹²⁻¹⁴; invece, la decolorazione e/o la tintura dei capelli provocano la riduzione dei FAEE. Tuttavia, nel documento di *Consensus* della SoHT si afferma che gli spray per capelli e diverse lozioni ad uso topico possono aumentare i livelli di EtPa¹⁰.

Attualmente una concentrazione pari a 120 pg/mg di EtPa misurata nel segmento prossimale di 3 cm, ovvero una concentrazione pari a 150 pg/mg misurata nel segmento prossimale di 6 cm, sono considerate le soglie di riferimento per discriminare un'astinenza da alcol o un consumo occasionale pregresso da un uso continuativo, mentre una concentrazione di EtPa pari a 350 pg/mg misurata nel segmento prossimale di 3 cm e una concentrazione di EtPa pari a 450 pg/mg misurata nel segmento prossimale di 6 cm sono considerate le soglie di riferimento per discriminare un consumo continuativo moderato da un consumo cronico eccessivo di alcol etilico (≥ 60 g/die)¹⁰.

La tecnica strumentale maggiormente in uso per la determinazione di EtPA nei capelli e, più in generale di FAEE, è rappresentata dalla gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, sia a singolo quadrupolo (GC-MS)⁷, sia a triplo quadrupolo (GC-MS/MS)¹⁵, con sorgente ad impatto elettronico. L'estrazione avviene in solvente organico non polare, tipo n-eptano, ovvero miscele n-eptano-dimetilsolfossido, e successiva estrazione degli analiti mediante colonnine SPE, ovvero mediante tecnica "solid phase microextraction" (SPME). Il LOD di riferimento è fissato entro un ampio intervallo: si consiglia il raggiungimento di limiti di sensibilità ricompresi nel range 10-50 pg/mg.

Bibliografia di riferimento

1. Lange LG, Bergmann SR, Sobel BE. Identification of fatty acid ethyl esters as products of rabbit myocardial ethanol metabolism. *J Biol Chem.* 1981;256:12968–73. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)42991-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)42991-2).
2. Alhomsy K, Cluette-Brown JE, Laposata M. Fatty acid ethyl esters in human mononuclear cells: production by endogenous synthesis greatly exceeds the uptake of preformed ethyl esters. *Alcohol Clin ExpRes.* 2006;30:560–6. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00062.x>.
3. Perez-Mana. C, Farr. M, Pastor A, Fonseca F, Torrens M, Menoyo E, Pujadas M, Frias S, Langohr K, de la Torre R. Non-linear formation of EtG and FAEEs after controlled administration of low to moderate doses of ethanol. *Alcohol Alcohol.* 2017;52:587–94. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agx033>.
4. Yegles M, Labarthe A, Auwarter V, Hartwig S, Vater H, Wennig R, Pragst F. Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotalers. *Forensic Sci Int.* 2004;145:167–73. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.032>.
5. Oppolzer D, Barroso M, Passarinha L, Gallardo E. Determination of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters in hair samples. *Biomed Chromatogr.* 2017;31:1–12. <https://doi.org/10.1002/bmc.3858>.
6. Pragst F, Rothe M, Moench B, Hastedt M, Herre S, Simmert D. Combined use of fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide in hair for diagnosis of alcohol abuse: interpretation and advantages. *Forensic Sci Int.* 2010;196:101–10. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.028>.
7. Auwarter V, Sporkert F, Hartwig S, Pragst F, Vater H, Diefenbacher A. Fatty acid ethyl esters in hair as markers of alcohol consumption. Segmental hair analysis of alcoholics, social drinkers, and teetotalers. *Clin Chem.* 2001;47:2114–23. <https://doi.org/10.1093/clinchem/47.12.2114>.

8. Kintz P, Nicholson D. Testing for ethanol markers in hair: discrepancies after simultaneous quantification of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl esters. *Forensic Sci Int.* 2014;243:44–6. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.03.012>.
9. Hartwig S, Auwörter V, Pragst F. Fatty acid ethyl esters in scalp, pubic, axillary, beard and body hair as markers for alcohol misuse. *Alcohol Alcohol.* 2003;38:163–7. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agg046>.
10. Society of Hair Testing (SoHT). 2019 Consensus for the use of alcohol markers in hair for supporting the assessment of abstinence and chronic alcohol consumption. https://www.soht.org/images/pdf/Revision_2019_Alcoholmarkers.pdf.
11. Pragst F, Auwörter V, Kiebling B, Dyes C. Wipe-test and patch-test for alcohol misuse based on the concentration ratio of fatty acid ethyl esters and squalene CFAEE/CSQ in skin surface lipids. *Forensic Sci Int.* 2004;143:77–86. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.02.041>.
12. Hartwig S, Auwörter V, Pragst F. Effect of hair care and hair cosmetics on the concentrations of fatty acid ethyl esters in hair as markers of chronically elevated alcohol consumption. *Forensic Sci Int.* 2003;131:90–7. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(02\)00412-7](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(02)00412-7).
13. Süesse S, Selavka CM, Mieczkowski T, Pragst F. Fatty acid ethyl ester concentrations in hair and self-reported alcohol consumption in 644 cases from different origin. *Forensic Sci Int.* 2010;196:111–7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.029>.
14. Süesse S, Pragst F, Mieczkowski T, Selavka CM, Elian A, Sachs H, Hastedt M, Rothe M, Campbell J. Practical experiences in application of hair fatty acid ethyl esters and ethyl glucuronide for detection of chronic alcohol abuse in forensic cases. *Forensic Sci Int.* 2012;218:82–91. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.006>.
15. Oppolzer, D., C. Santos, E. Gallardo, L. Passarinha, and M. Barroso. "Alcohol Consumption Assessment in a Student Population through Combined Hair Analysis for Ethyl Glucuronide and Fatty Acid Ethyl Esters." *Forensic Sci Int* 294 (2019): 39-47.

Modalità di prelievo di matrici biologiche

Prelievo di capelli

Il prelievo dei capelli deve essere effettuato dall'area corrispondente al vertice posteriore della testa (*posterior vertex*), attraverso l'applicazione di un taglio il più possibile radente al cuoio capelluto e parallelo alla cute mediante forbici idonee allo scopo, ovvero altri strumenti idonei a limitare, il più possibile, residui piliferi. I capelli non devono essere strappati. In alternativa, ove non fosse possibile eseguire il prelievo nella zona posteriore, la raccolta può essere effettuata in aree differenti del capo.

La quantità di capelli necessaria all'analisi è stimabile in almeno 100 mg di campione, ovvero almeno due ciocche del diametro approssimativo di 0.5-1 cm. È consigliabile che il peso di ciascuna aliquota non sia inferiore a 25-30 mg. Le ciocche devono presentare una lunghezza minima di 3 cm e, in ogni caso, non superiore a 6 cm. L'operatore che esegue il prelievo deve identificare in modo univoco la porzione prossimale, dove è avvenuto il taglio.

Il prelievo deve essere divisibile in due aliquote di pari quantità (A e B): l'aliquota A è destinata all'analisi richiesta; l'aliquota B deve essere conservata ai fini di una eventuale analisi di verifica (controanalisi). La predisposizione di un'eventuale terza aliquota (C) può essere utile in caso di necessità di ripetizione.

Il campione deve essere conservato a temperatura ambiente, in luogo non umido e lontano da fonti di calore e di luce, fino all'esecuzione dell'analisi, in buste o in contenitori muniti di sigillo antimanomissione, debitamente compilato e firmato dal paziente e dall'operatore che ha eseguito il prelievo.

Non devono essere effettuati, di norma, prelievi di capelli trattati con soluzioni decoloranti o ossidanti, in quanto tali pratiche possono rendere inattendibile il risultato analitico.

Devono, inoltre, essere raccolte e registrate le informazioni utili per la successiva interpretazione delle analisi, tra le quali si ritengono di particolare interesse: l'eventuale trattamento fisico-chimico-cosmetico effettuato nei mesi precedenti il prelievo, terapie farmacologiche topiche in atto, l'applicazione di lozioni e prodotti simili nel periodo monitorato.

Prelievo di altre formazioni pilifere (peli toracici o pubici)

Il campionamento dei peli corporei deve essere effettuato dall'area corporea corrispondente (ad es. torace) in più punti, in modo da ottenere una quantità adeguata di materiale, da suddividere omogeneamente in due aliquote. È sempre opportuno effettuare il taglio il più vicino possibile alla cute. In questo caso non è prevista una lunghezza minima e/o massima del pelo da campionare e non è pertanto necessario definire la parte prossimale ovvero la parte distale del campione. L'analisi è effettuata sull'intera lunghezza del campione prelevato.

Per il numero di aliquote da prelevare, la quantità minima di matrice pilifera, la conservazione del campione e la registrazione delle informazioni utili per la successiva interpretazione del dato analitico si rimanda al paragrafo precedente.

Per l'adeguatezza della matrice pilifera in merito al marcatore da analizzare si rimanda ai capitoli specifici.

Prelievo di sangue

Il prelievo del campione ematico per il dosaggio della CDT e del Peth deve essere eseguito in provette idonee alla tipologia dell'analisi. Il numero delle aliquote da prelevare dipende dalle modalità di analisi adottate nei laboratori. In linea generale, in caso nel laboratorio sia eseguita direttamente una procedura analitica di conferma o quando siano eseguite contestualmente screening e conferma nella stessa sede, si può prevedere la raccolta del campione ematico in due aliquote (A e B), utilizzando la prima per le analisi richieste e conservando opportunamente la seconda per l'eventuale controanalisi. Nel caso la fase di screening analitico e quella di conferma si svolgano in due sedi differenti, o in due tempi sostanzialmente differenti, il campione dovrà essere suddiviso in tre aliquote (A, B e C), utilizzando la prima per lo screening, la seconda per la conferma, e tenendo a disposizione la terza per eventuale controanalisi.

Per la ricerca/dosaggio di Peth, e in determinate condizioni anche per la determinazione della CDT, come riportato nello specifico capitolo, il prelievo può essere anche effettuato attraverso la raccolta di sangue capillare, mediante l'utilizzo di specifici ed idonei dispositivi pungidito e substrati per "*dried blood spots* - DBS". I DBS devono essere lasciati asciugare prima della loro conservazione, che dovrà avvenire in ambiente privo di umidità, lontano da fonti di luce e di calore ed eventualmente anche in condizioni di refrigerazione.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

I dati di letteratura relativi alla determinazione di EtG nei capelli, ancorché ottenuti da popolazioni numericamente inferiori a quelle considerate per la CDT nel siero, consentono di affermare l'attendibilità di tale marcatore nella diagnosi di consumo cronico eccessivo di alcol etilico. Si sottolinea, inoltre, come aspetti tecnico-pratici quali, ad esempio, la non invasività della raccolta del campione, la maggiore sensibilità diagnostica rispetto alla CDT serica a parità di specificità diagnostica, il più ampio intervallo di tempo monitorabile, contribuiscono a considerare la determinazione del biomarcatore EtG nei capelli quale pratica d'elezione nella valutazione del consumo pregresso e continuativo a rischio di alcol etilico a lungo termine.

Il dosaggio della CDT serica risulta essere oggi, sia a livello nazionale che internazionale, la procedura più frequentemente utilizzata per la valutazione di un consumo pregresso e/o continuativo a rischio di alcol etilico. La letteratura scientifica a supporto di questo test risulta solida e basata su studi caratterizzati da un'adeguata numerosità campionaria. Alcuni studi, tuttavia, riportano per la CDT una sensibilità diagnostica inferiore all'EtG nei capelli quando utilizzata per diagnosi di condizioni di consumo alcolico a rischio.

La determinazione di Peth nel sangue intero nonostante mostri, ad oggi, elevatissime sensibilità e specificità diagnostiche, non si considera ancora idonea al suo utilizzo come test esclusivo in contesti di interesse medico legale a causa della limitata frequenza di utilizzo in indagine routinarie e, di conseguenza, della carenza di dati solidi che ne attestino l'attendibilità diagnostica sotto il profilo statistico ed epidemiologico. Si consiglia pertanto, al momento, l'utilizzo della determinazione di PEth nel sangue intero contestualmente alla determinazione di EtG nei capelli e/o a quella della CDT serica.

In considerazione della letteratura scientifica pertinente, la determinazione dei FAEE nei capelli non si configura come pratica analitica idonea alla valutazione del consumo pregresso e/o continuativo a rischio di alcol etilico in un contesto di interesse medico legale. Essi possono essere utilizzati, al più, quale test diagnostico supplementare rispetto alle procedure analitiche per la determinazione degli altri marcatori considerati in questo documento. In ogni caso, come suggerito dal *Consensus* SoHT, risulta sufficiente determinare il solo EtPa nei capelli.

In ogni caso l'interpretazione quali-quantitativa dei risultati è demandata a professionisti esperti che operano nell'ambito della tossicologia forense, in particolare modo quando si effettuino determinazioni relative a molteplici marcatori.

In Tabella 1 sono riassunte le principali caratteristiche dei marcatori presi in considerazione.

Tabella I: Per ciascun marcatore descritto si riassumono le seguenti caratteristiche: finestra di rilevabilità, tecniche analitiche più frequentemente adottate, valori soglia per discriminare un consumo pregresso e/o continuativo a rischio, criticità e limitazioni.

Marcatore	Finestra di rilevabilità	Tecniche analitiche più frequentemente adottate	Valore soglia per discriminare un consumo pregresso e/o continuativo	Criticità e limitazioni
EtG nelle formazioni pilifere	3-6 mesi	LC-MS/MS	30 pg/mg in capelli di 0-3 cm, fino a 0-6 cm, o pelo toracico	Trattamenti decoloranti o ossidanti
CDT nel siero	2-3 settimane	LC-UV/Vis CE-UV	2.0 %	Gravidanza nel terzo trimestre; varianti genetiche della Tf; disordini congeniti della glicosilazione (CDG); malattie epatiche acute o croniche; scarsa transferrina totale
Peth (omologo 16:0-18:1) nel sangue intero	3-4 settimane	LC-MS/MS	200 ng/mL	Limitata base di letteratura. Si sconsiglia l'utilizzo individuale di questo biomarcatore
FAEE/EtPa nei capelli	3-6 mesi	GC-MS GC-MS/MS	EtPa 350 pg/mg (0-3 cm) 450 pg/mg (0-6 cm)	Considerevole variazione intra- ed inter-individuale; interferenze da shampoo e prodotti per capelli a base alcolica, trattamenti decoloranti o ossidanti. Si sconsiglia fortemente l'utilizzo individuale di questo biomarcatore

** Si consiglia di valutare il LOQ delle metodiche ad un valore pari a: cut-off/4.

** Si raccomanda di fornire i risultati sottraendo l'incertezza di misura ad essi associata.

Nota bibliografica a margine, relativa allo studio della CDT come marcatore di rischio nell'incidentalità stradale.

Per quanto riguarda l'applicazione dei biomarcatori di abuso alcolico nell'ambito della verifica dell'idoneità al possesso della patente di guida, si deve osservare che l'interpretazione dei risultati si basa ancora su criteri sviluppati in ambito clinico, dove l'obiettivo è la prevenzione delle patologie alcol-correlate e non la sicurezza della circolazione stradale.

In realtà, la letteratura sulla correlazione tra abuso cronico di alcol e rischio di incidenti stradali è relativamente scarsa e spesso scarsamente dimostrativa¹. Al contrario, il valore probatorio del biomarcatore in termini di effettiva associazione tra valori “di allarme” di questo e un aumento dell'incidentalità è di fondamentale importanza. In questo contesto, la CDT è stata ampiamente studiata e si è dimostrata più affidabile di altri tradizionali biomarcatori indiretti dell'abuso di alcol, come MCV e GGT^{2,3}.

In particolare, un'elevata associazione tra CDT e incidentalità stradale alcol correlata è stata riferita in uno studio del 2015⁴ e confermata su ampia casistica (929 conducenti) nel 2022¹. I risultati dello studio hanno mostrato una correlazione elevata e quasi lineare tra la CDT al momento del sinistro e la frequenza di alcolemie positive nei conducenti.

Bibliografia di riferimento

1. N.M. Porpiglia, F. Tagliaro, R. Micciolo, L. Canal, G. Musile, F. Bortolotti, New evidence of high association between carbohydrate deficient transferrin (CDT) and alcohol-related road traffic accidents. A retrospective study on 929 injured drivers, *Forensic Sci. Int.* 340 (2022) 111438. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2022.111438>.
2. N.M. Porpiglia, F. Bortolotti, R.M. Dorizzi, R. Micciolo, F. Tagliaro, Critical Evaluation of the Association Between Elevated Mean Corpuscular Volume and Alcohol-Related Traffic Accidents: A Retrospective Study on 6244 Car Crash Cases, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 43 (2019) 1528–1532. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/acer.14046>.
3. N.M. Porpiglia, F. Bortolotti, R. Micciolo, L. Canal, M. Murari, F. Gibelli, F. Tagliaro, CDT vs. GGT for the certification of the fitness to hold the driving license. A comparison based on the association of incremented values with the occurrence of alcohol-related road traffic accidents., *Drug Alcohol Depend.* 228 (2021) 109088. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.109088>
4. F. Bortolotti, R. Micciolo, L. Canal, F. Tagliaro, First Objective Association Between Elevated Carbohydrate-Deficient Transferrin Concentrations and Alcohol-Related Traffic Accidents, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 39 (2015) 2108–2114. <https://doi.org/10.1111/acer.12879>.