



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CARDIO-TORACO-VASCOLARI
E SANITÀ PUBBLICA

Direttore: Ch.mo Prof. Federico Rea

TESI DI LAUREA

**DETERMINAZIONE EMATICA DEL
FOSFATIDILETANOLO QUALE MARCATORE DI
ESPOSIZIONE AD ETANOLO.
REVISIONE SISTEMATICA DELLA LETTERATURA.**

RELATORE: Prof. Guido Viel

CORRELATORE: Dott. Matteo Perilli

LAUREANDA: Arianna Ceretta

MATRICOLA: 1167563

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
METABOLISMO, MANIFESTAZIONI CLINICHE, DEFINIZIONI ED EPIDEMIOLOGIA DEL CONSUMO DI ALCOL	5
METABOLISMO E MANIFESTAZIONI CLINICHE	6
DEFINIZIONI	9
EPIDEMIOLOGIA	11
BIOMARCATORI	14
MARCATORI INDIRETTI	14
MARCATORI DIRETTI	17
APPLICAZIONI DEL FOSFATIDILETANOLO (PEth)	23
MATERIALI E METODI	27
RISULTATI	29
DISCUSSIONE	39
CONFRONTO TRA PEth E QUESTIONARI	39
1. PEth <i>VS</i> AUDIT O AUDIT-C	39
2. PEth <i>VS</i> <i>ALCOHOL TIMELINE FOLLOW-BACK</i> (TLFB)	47
3. PEth <i>VS</i> QUESTIONARIO M.I.N.I.	48
CONFRONTO TRA PEth E ALTRI BIOMARCATORI	48
1. PEth <i>VS</i> ALT, AST E GGT	49
2. PEth <i>VS</i> CDT	51
3. PEth <i>VS</i> MCV	54
4. PEth <i>VS</i> EtG	55
CONCLUSIONI	58
BIBLIOGRAFIA	59

RIASSUNTO

Background o presupposti dello studio

Il fosfatidiletanolo (PEth) è un fosfolipide di membrana anomalo che si forma in presenza di etanolo nel sangue. Questo analita si è già dimostrato dotato di una maggiore sensibilità e specificità rispetto ad altri marcatori di consumo alcolico, rendendolo un promettente marcatore di assunzione di alcol con plurimi possibili campi di applicazione, tra cui quello tossicologico-forense.

Scopo dello studio

L'obiettivo di questo lavoro è comprendere se sia attualmente possibile applicare la quantificazione del PEth ematico nella popolazione generale per consentire l'individuazione di un consumo alcolico a rischio.

Materiali e metodi

Il lavoro è una revisione sistematica della Letteratura condotta seguendo i criteri inclusi nella guida PRISMA. È stata effettuata una ricerca, sulle banche dati *PubMed*, *Web of Science* e *Scopus*, riguardo l'utilizzo del PEth come biomarcatore per identificare il consumo di alcol a rischio per la salute. Gli articoli sono stati valutati secondo criteri di inclusione ed esclusione che hanno permesso di selezionare i soli articoli in lingua inglese che ne valutavano l'applicazione in una popolazione generale. La qualità di questi ultimi è stata valutata secondo la *checklist JBI critical appraisal* per gli studi analitici caso-controllo e di coorte. Per ogni studio selezionato, sono stati estratti i dati disponibili dal *full-text*.

Risultati

L'iniziale ricerca della Letteratura ha portato all'identificazione di 2106 articoli. Da questi, dopo l'applicazione dei criteri di inclusione e di esclusione, ne sono stati selezionati 17 (0,81% del totale). Sulla base dei dati di questi ultimi, sono state confrontate le *performance* del PEth rispetto agli strumenti ad oggi comunemente utilizzati in ambito clinico per identificare la presenza di un consumo di alcol a rischio, dividendo questi ultimi tra questionari (AUDIT/AUDIT-C, TLFB e M.I.N.I.) e biomarcatori, sia indiretti (ALT, AST e GGT, CDT, MCV) che diretti (EtG).

Il PEth si è dimostrato un marcatore dotato di un'elevata concordanza nella capacità di identificare un consumo “*a rischio*” di alcol considerando l'AUDIT e l'AUDIT-C, ovvero i due principali questionari d'uso clinico per la stratificazione del rischio. Inoltre, si è rivelato un marcatore superiore, in termini di sensibilità e specificità, rispetto ai marcatori indiretti (ALT, AST, GGT, MCV) e almeno comparabile in termini di risultati al principale marcatore diretto, cioè l'EtG.

Conclusioni

Questo lavoro ha confermato la validità del PEth nell'identificare un consumo alcolico a rischio per la salute, dimostrandosi dotato di elevata specificità e sensibilità, superiore a quella di altri strumenti attualmente utilizzati in clinica a questo scopo.

Rimane ferma la necessità di procedere con ulteriori ricerche volte ad individuare valori di *cut-off* validi e applicabili in una popolazione generale, in quanto non esiste ancora un valore universalmente condiviso.

ABSTRACT

Background of the study

Phosphatidylethanol (PEth) is an abnormal phospholipid that is formed in the presence of ethanol in the blood, and it is stored in membranes of red blood cells. This analyte has already demonstrated greater sensitivity and specificity than other markers of alcohol consumption, making it a promising marker of alcohol intake with multiple possible areas of application, including toxicological-forensic.

Purpose of the study

The aim of this work is to understand whether it is currently possible the application of blood PEth quantification in the general population to provide detection of at-risk alcohol consumption.

Materials and Methods

The work is a systematic review of the literature conducted according to the criteria included in the PRISMA guide. The preliminary research, carried out on the *PubMed*, *Web of Science* and *Scopus* databases, about the use of the PEth biomarker to detect the hazardous alcohol consumption. Articles were evaluated according to inclusion and exclusion criteria aimed at selecting only English-language articles that evaluated the biomarker in a general population. Their quality was assessed according to the *JBI critical appraisal checklist* for case-control and cohort analytic studies. For each selected study, available data were extracted from the full-text.

Results

The initial literature research yielded the identification of 2106 articles. From these, after applying the inclusion and exclusion criteria, 17 (0.81% of the total) were finally selected. On the basis of their data, the performance of the PEth was compared with the instruments commonly used nowadays in clinical settings to identify the presence of hazardous/harmful drinking, dividing these between questionnaires (AUDIT/AUDIT-C, TLFB and M.I.N.I.) and biomarkers, both indirect (ALT, AST and GGT, CDT, MCV) and direct (EtG).

PEth proved to be a marker with high concordance in the capacity to identify hazardous/harmful drinking, especially with the AUDIT and AUDIT-C, i.e., the two main questionnaires of clinical use for case-identification. Moreover, it proved

to be a superior marker in terms of sensitivity and specificity compared to indirect markers (ALT, AST, GGT, MCV) and at least comparable in terms of results to the main direct marker, i.e., EtG.

Conclusions

This work has confirmed the validity of PEth for the identification of hazardous alcohol consumption, demonstrating that it has high specificity and sensitivity, superior to that of other tools currently used in the clinic for this purpose.

It remains the necessity to proceed with further research aimed at identifying valid and applicable cut-off values in the general population, as there is still no universal agreement.

INTRODUZIONE

METABOLISMO, MANIFESTAZIONI CLINICHE, DEFINIZIONI ED EPIDEMIOLOGIA DEL CONSUMO DI ALCOL

*[...] Eccomi libero, solo, deciso
a bere, fradicio, l'ultimo sorso.
Ora, senza paura né rimorso,
mi sdraierò per terra, e, così steso,
cadrò nel sonno [...]*

Sono stati riportati solo pochi versi della poesia “*Il vino dell'assassino*” appartenente alla raccolta “*I fiori del male*” di Charles Baudelaire. Poche parole che, nella loro semplicità, sono intrise di tutto il degrado derivante da una condizione di solitudine e sofferenza che porta il poeta a decidere di abbandonarsi all'obnubilamento, all'effetto tossico e psicoattivo, ma soprattutto alla dipendenza da una sostanza: l'alcol.

Il termine “alcol” deriva dall'arabo *al-koél*, locuzione che indica la polvere finissima e impalpabile del solfuro d'antimonio o del piombo, la quale, mescolata con acqua, si utilizzava fin dall'antichità in Oriente e soprattutto dalle donne per tingere di nero le sopracciglia, le ciglia e l'orlo delle palpebre. In Occidente questa stessa parola designò dapprima qualsiasi specie di polvere impalpabile e solo successivamente, grazie al famoso medico Teofrasto Paracelso (1493-1541), venne applicata allo “spirito di vino”, parte essenziale e più nobile della bevanda, che egli chiamò *alcohol vini*; questa nuova denominazione, progressivamente adottata da chimici e medici, finì per perdere l'oggetto “*vini*” venendo ad essere utilizzata per tutte quelle specialità inebrianti note sin dall'antichità (con i testi babilonesi si risale al III millennio a.C.) e prodotte mediante la fermentazione del miele, del grano, del succo della palma da datteri, ecc. (1).

Nella realtà odierna le bevande alcoliche sono parte integrante del contesto sociale di molti individui e culture, accompagnandosi ad occasioni di socializzazione, in particolar modo per coloro che operano in ambienti ad alta visibilità e influenza, sia nel privato sia a livello nazionale e internazionale. In questi contesti, è facile

trascurare o ignorare i danni alla salute e alla società causati o contribuiti dal consumo di alcol.

METABOLISMO E MANIFESTAZIONI CLINICHE

L'etanolo ingerito viene assorbito per diffusione a livello dello stomaco e dell'intestino tenue. La quantità assorbita dipende unicamente dal volume assunto che, dopo aver oltrepassato facilmente le pareti del tubo digerente, si riversa nel circolo ematico. Una volta assorbito, si distribuisce ampiamente ed uniformemente in tutti i tessuti e fluidi dell'organismo, ma in ragione della sua estrema idrofilicità e bassa lipofilicità, si accumula nei tessuti a più alto contenuto acquoso (2).

La biotrasformazione dell'etanolo avviene prevalentemente a livello epatico (circa il 90% della dose assorbita), mentre una quantità trascurabile è soggetta a biotrasformazione intestinale o ad escrezione diretta nelle urine e nell'aria espirata. A livello epatico l'etanolo viene ossidato ad acetaldeide tramite una reazione catalizzata per oltre il 70% dall'alcol deidrogenasi (ADH), enzima presente nel citoplasma dell'epatocita, per il 10-15% dal sistema microsomiale di ossidazione dell'etanolo (MEOS), il cui enzima fondamentale è il citocromo P450 (CYP2E1), e, in caso di alcolemia molto elevata e comunque per non più del 10%, dall'enzima catalasi. In presenza di basse concentrazioni di etanolo l'ADH è l'enzima ossidante principale, mentre nel caso opposto (*i.e.* alte concentrazioni) tale ruolo è rivestito dal MEOS.

Relativamente all'ADH sono state individuate tre sottoclassi enzimatiche differenti, denominate ADH I, ADH II, ed ADH III dotata ognuna di specifici isoenzimi con differenti capacità metaboliche, che spiegano in parte la variabilità interindividuale nella velocità di eliminazione dell'etanolo plasmatico (3).

Diverso il caso del MEOS, che, invece, aumenta la propria capacità metabolica dopo ripetute somministrazioni di etanolo, fenomeno definito "induzione enzimatica" e ritenuto alla base della tolleranza metabolica della sostanza (4).

Come già anticipato, il metabolita principale dell'etanolo è la sua forma ossidata: l'acetaldeide. Questa, in quanto incapace di attraversare la barriera ematoencefalica, non è dotata di effetti psicoattivi ed è ulteriormente ossidata, per circa il 90% della sua quantità, ad acido acetico dall'enzima acetaldeide deidrogenasi (ALDH). L'acido acetico a sua volta è metabolizzato in anidride

carbonica (CO_2) e acqua (H_2O) per facilitarne l'eliminazione (**Figura 1**). Piccole quantità di acido acetico vengono convertite in acetilCoA che, interagendo con gli acidi grassi, porta alla formazione di composti chiamati esteri etilici degli acidi grassi (FAEE). È stato dimostrato che questi composti contribuiscono a danneggiare il fegato e il pancreas.

In aggiunta alle già menzionate vie metaboliche, l'etanolo viene in parte coniugato all'acido glucuronico con formazione dell'etilglucuronide, metabolita escreto attraverso le urine (5).

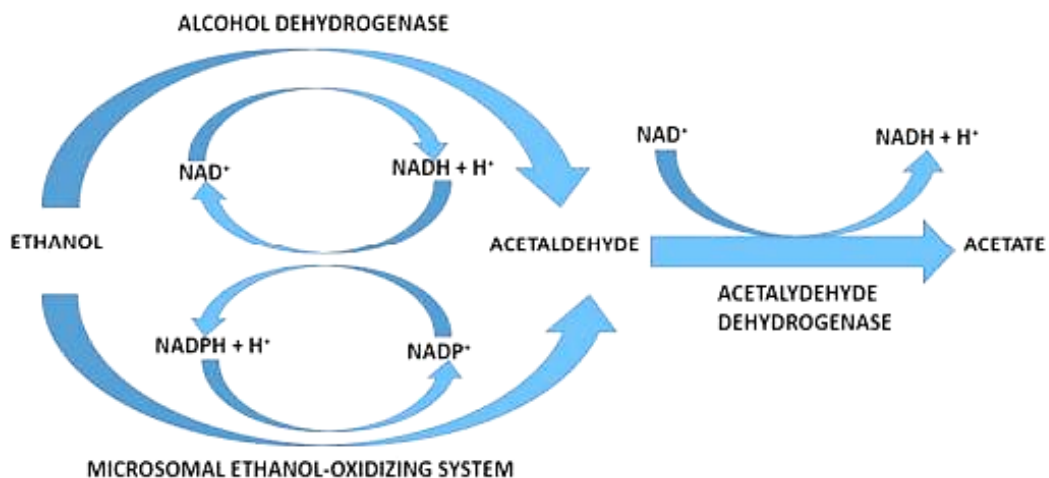


Figura 1 Metabolismo dell'etanolo (5)

L'ingestione di alcol e il suo successivo assorbimento e metabolismo producono una serie di effetti classificabili, secondo l'epoca della comparsa, in acuti e cronici. Per quanto riguarda gli effetti acuti, questi si manifestano nell'arco di breve tempo dall'assunzione della sostanza (minuti-ore) e progrediscono proporzionalmente al tasso alcolemico rilevabile nel sangue:

- 20-50 mg/dL (da 4,3 a 10,9 mmol/L): tranquillità, lieve sedazione e una certa diminuzione della fine coordinazione motoria;
- 50-100 mg/dL (da 10,9 a 21,7 mmol/L): compromissione del giudizio e un'ulteriore riduzione della coordinazione;
- 100-150 mg/dL (da 21,7 a 32,6 mmol/L): andatura incerta, nistagmo, eloquio impacciato, diminuzione delle inibizioni comportamentali e disturbi della memoria;

- 150-300 mg/dL (da 32,6 a 65,1 mmol/L): delirium e letargia (probabili);
- > 300 mg/dl (> 65,1 mmol/L): stupor, coma, morte (6).

Come è evidente, gli effetti acuti si ripercuotono prevalentemente a livello del sistema nervoso centrale e questo è dovuto al fatto che il 90% della quota ematica di etanolo attraversa quasi immediatamente la barriera ematoencefalica, interagendo poi con i recettori del GABA (acido γ -aminobutirrico) e del glutammato. Questi sono responsabili della maggior parte dell'attività cerebrale inibitoria (GABA) ed eccitatoria (glutammato) ed è proprio la loro disregolazione che provoca gli effetti neuro-psicologici della sostanza. L'alcol, infatti, aumenta l'attività inibitoria dei recettori GABA e riduce quella eccitatoria del glutammato, portando ad una complessiva depressione dell'attività del SNC. In particolare, l'aumento dell'attività del GABA è probabilmente responsabile della maggior parte degli effetti sedativi dell'alcol, mentre la soppressione dell'attività del glutammato, ottenuta agendo sul suo recettore NMDA, ha, anche a dosi molto basse, un effetto negativo sulla formazione dei ricordi e sul *problem solving*. È quindi quest'ultima azione quella responsabile dei deficit di memoria alcol-relati.

Un ulteriore effetto collegato all'attività GABAergica dell'alcol è l'incremento del tono dopaminergico nei nuclei cerebrali deputati alla genesi della sensazione di gratificazione, incentivando un utilizzo sempre più frequente della sostanza che può diventare, in alcuni casi, cronico (7).

L'abuso cronico ha effetti negativi su diversi organi e apparati. Tra quelli più coinvolti vi è senza dubbio il fegato, dove si può generare un quadro di steatosi con possibile evoluzione in steatoepatite e, infine, cirrosi. Anche l'apparato gastrointestinale è particolarmente compromesso, con lo sviluppo di episodi di nausea e vomito e danneggiamento organico con possibile comparsa di erosioni gastriche, ulcere peptiche, varici e rottura esofagea (sindrome di Mallory-Weiss o sindrome di Boerhaave), pancreatiti acute e croniche e un aumentato rischio di sviluppo di molti tipi di cancro. A livello del sistema nervoso centrale, invece, l'abuso cronico di alcol è correlato ad un peggioramento delle funzioni cognitive e di memorizzazione, crisi convulsive, cadute, atassia, neuropatie periferiche, atrofia corticale diffusa fino a quadri di encefalopatia conclamati (*c.d.* encefalopatia di Wernicke). Dal punto di vista cardiaco si evidenzia la comparsa di aritmie, ipertensione arteriosa, cardiomiopatie e morte improvvisa. Inoltre, sono comuni nei

bevitori cronici l'aumento del MCV correlato ad anemia (*c.d.* anemia megaloblastica) da sanguinamento gastrointestinale e carenza di acido folico. Infine, compromissione dell'apparato genitale con atrofia testicolare, riduzione dei livelli circolanti di testosterone e progesterone e, al contrario, un aumento degli estrogeni (8).

DEFINIZIONI

Per quanto detto, il consumo di alcol ha quindi delle importanti ricadute in termini di salute individuale e sociale a causa dello sviluppo di comportamenti di variabile gravità, talora incontrollabili, che spaziano dal sempre più comune *binge drinking* all'abuso, fino alla dipendenza.

Proprio la necessità di studiare il fenomeno del "bere", tanto dal punto di vista clinico quanto sociodemografico, ha portato nel tempo ad una standardizzazione dei mezzi di misurazione utilizzati in ambito clinico e scientifico per riferirsi ad una certa quantità di alcol. Per questo motivo è stata introdotta la definizione di unità alcolica (U.A.), corrispondente in Italia a 14 grammi di alcol, ed equivalente a un bicchiere di vino rosso da 125 mL, ad una birra da 33 cL o ad un bicchierino di superalcolico.

Per le stesse motivazioni società nazionali e internazionali come la World Health Organization (WHO) hanno formulato delle definizioni dei comportamenti dannosi associati all'assunzione di alcol.

In particolare, il National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) definisce il *binge drinking* come un consumo di alcolici che porta la concentrazione di alcol nel sangue (BAC) a valori uguali o superiori a 0,08% o 0,08 grammi di alcol per decilitro. Per un adulto tipico questo corrisponde al consumo di 5 o più U.A. (uomini), o 4 o più U.A. (donne), in circa 2 ore. La stessa Istituzione definisce l'abuso di alcol sulla base dei seguenti parametri:

- per l'uomo, un consumo di più di 4 unità alcoliche (U.A.) giornaliere o più di 14 U.A. settimanali;
- per la donna, un consumo di più di 3 U.A. giornaliere o più di 7 U.A. settimanali.

Sia l'abuso alcolico che il *binge drinking* aumentano il rischio di sviluppare il disturbo da uso di alcol (AUD), diagnosticabile secondo i criteri descritti nel

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM–5, Tabella I). Il disturbo da uso di alcol (AUD) è una patologia caratterizzata da una ridotta capacità di interrompere o controllare il consumo di alcol nonostante le conseguenze negative a livello sociale, professionale o sanitario.

Considerato un disturbo cerebrale, l'AUD può essere lieve, moderato o grave a seconda del numero di criteri soddisfatti dal paziente. I cambiamenti duraturi nel cervello causati dall'abuso di alcol perpetuano l'AUD e rendono i soggetti vulnerabili alla recidiva.

A. Un uso problematico dell'alcol che porta a sensazione di disagio o compromissione clinicamente significativi, come manifestato da almeno due delle seguenti condizioni, che si verificano entro un periodo di 12 mesi:
1. L'alcol è spesso assunto in quantitativi maggiori o per un periodo più lungo di quanto fosse nelle intenzioni.
2. Desiderio persistente o sforzi infruttuosi di ridurre o controllare l'assunzione di alcol.
3. Una gran parte del tempo è impiegata in attività necessarie a procurarsi alcol, consumarlo o riprendersi dai suoi effetti.
4. <i>Craving</i> , o forte desiderio al consumo di alcol.
5. Uso ricorrente di alcol, che causa un fallimento nell'adempimento dei principali obblighi sul lavoro, a scuola, a casa.
6. Uso continuato di alcol nonostante la presenza di persistenti o ricorrenti problemi sociali o interpersonali causati o esacerbati dagli effetti dell'alcol.
7. Numerose attività sociali, lavorative o ricreative vengono abbandonate o ridotte a causa dell'uso di alcol.
8. Uso ricorrente di alcol in situazioni nelle quali è fisicamente pericoloso.
9. Uso continuato di alcol nonostante la consapevolezza di un problema persistente o ricorrente, fisico o psicologico, che è stato probabilmente causato o esacerbato dall'alcol.
10. Tolleranza, come definita da ciascuno dei seguenti fattori: <ol style="list-style-type: none"> a. Bisogno di quantità marcatamente aumentate di alcol per raggiungere l'intossicazione o l'effetto desiderato. b. Una marcata diminuzione dell'effetto con l'uso continuato della stessa quantità di alcol.

11. Astinenza, manifestata da ciascuno dei seguenti fattori: <ol style="list-style-type: none"> a. La caratteristica sindrome da astinenza da alcol (con riferimento ai Criteri A e B dei criteri per l'astinenza da alcol). b. L'alcol (o una sostanza strettamente correlata, come una benzodiazepina) viene assunto per attenuare o evitare sintomi di astinenza.
Specificare la gravità attuale:
Lieve: Soddisfatti 2-3 criteri.
Moderata: Soddisfatti 4-5 criteri.
Grave: Soddisfatti 6 o più criteri.

Tabella I Criteri diagnostici per AUD secondo DSM-5 (9)

Definite le modalità di uso dette *binge drinking* e abuso alcolico, è necessario sottolineare come esista tuttavia una “*zona grigia*” rappresentata da tutte quelle classi di consumo alcolico (*c.d. hazardous drinking*, ovvero tra le 2 e le 4 U.A./die) che, seppur non esitanti nell’abuso alcolico o nella dipendenza, determinano comunque un aumento del rischio per diverse patologie cardiovascolari, endocrine o oncologiche e che per questo richiedono, da parte dei sistemi sanitari nazionali e delle organizzazioni sovranazionali, uno sforzo atto a identificare uno strumento sensibile e specifico che permetta la categorizzazione del rischio e l’avvio di strategie mirate ad una riduzione del consumo di alcol.

EPIDEMIOLOGIA

Come già affermato, l’uso non consono di bevande alcoliche è collegato a varie conseguenze dal punto di vista sanitario e sociodemografico. Per comprenderne l’entità dal punto di vista epidemiologico, si analizzano i dati riportati dall’ultimo report dell’Organizzazione mondiale della sanità (OMS) sull’impatto dell’alcol nel mondo (“*Global status report on alcohol and health*”, 2018 (10)). Viene presentato un quadro completo del consumo di alcol e del carico di malattia ad esso attribuibile a livello globale.

Nel 2016, il 57% della popolazione mondiale di età superiore ai 15 anni non ha consumato alcolici nei 12 mesi precedenti: il 44,5% non ha mai consumato alcolici

durante tutto l'arco della vita, mentre il 12,5% ne ha assunti nel periodo precedente agli ultimi 12 mesi.

Di conseguenza, circa 2,348 miliardi di persone (43% della popolazione) è un attivo consumatore di alcol. Tuttavia, va precisato come l'alcol venga consumato da più della metà della popolazione in tre regioni dell'OMS: la Regione Europea (EUR) (59,9% dei bevitori), delle Americhe (AMR) (54,1%) e del Pacifico occidentale (WPR) (53,8%) (**Figura 2**).

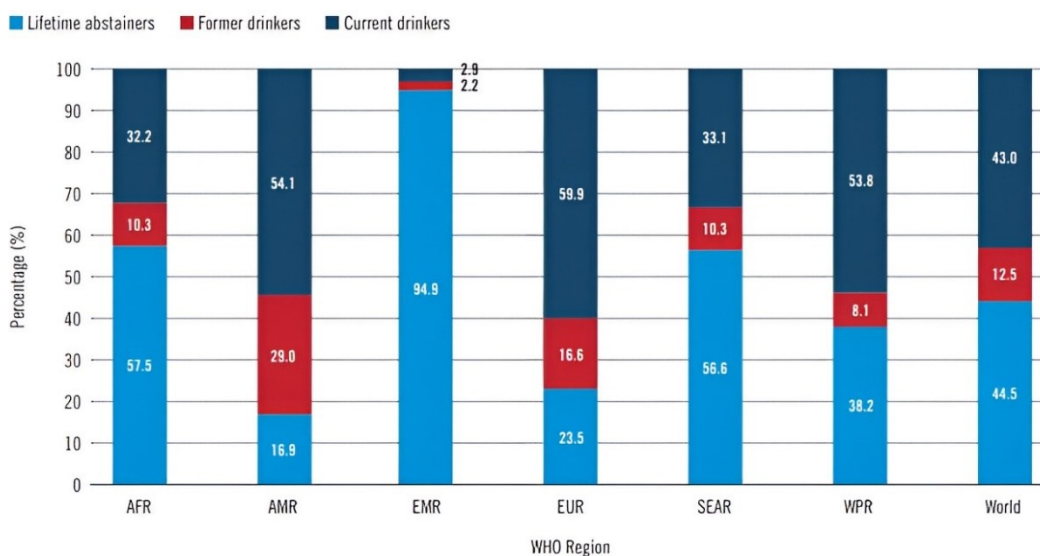


Figura 2 Percentuale di bevitori attuali, ex bevitori e astemi nel corso della vita (in %) nella popolazione totale (età superiore ai 15 anni) per ogni regione OMS del mondo, 2016 (10)

Gli stessi dati riportano poi come il consumo totale *pro capite* di alcol nella popolazione mondiale di età uguale o superiore ai 15 anni equivalga in media a 6,4 litri di alcol puro all'anno, ovvero 13,9 grammi di alcol al giorno.

Tuttavia, anche in questo caso vi è un'ampia variabilità nella quantità totale di alcol consumata tra le diverse regioni dell'OMS e gli Stati membri. Tralasciando poche eccezioni (ad esempio, la Nigeria, l'Uruguay, l'Australia e la Nuova Zelanda), il più elevato consumo annuale *pro capite* di alcol (10 litri o più) si osserva nei Paesi della Regione Europea dell'OMS. Livelli di consumo di alcol inferiori ma comunque relativamente alti (7,5-9,9 litri di alcol puro *pro capite*) si riscontrano soprattutto in altri Paesi ad alto reddito, in particolare nella regione OMS delle Americhe e della Regione del Pacifico occidentale, ma anche in alcuni stati della Regione africana.

Analizzando i dati riguardanti l'impatto dell'assunzione di alcol, si può notare come le stime attribuiscono all'uso dannoso di alcol circa 3 milioni di morti (5,3% di tutti i decessi) a livello globale nel 2016.

Gli effetti del consumo di alcol sulla mortalità sono superiori a quelli della tubercolosi (2,3%), dell'HIV/AIDS (1,8%), del diabete (2,8%), dell'ipertensione (1,6%), delle malattie dell'apparato digerente (4,5%), delle lesioni stradali (2,5%) e delle violenze (0,8%).

Nel 2016 l'alcol ha causato anche un grande carico di malattia e disabilità, provocando la perdita di 132,6 milioni di DALY (*disability-adjusted life year* o attesa di vita corretta per disabilità), pari al 5,1% del totale. Scomposti, 107,7 milioni di DALY sono dovuti a mortalità prematura (cioè anni di vita persi, o YLL), che rappresentano il 5,8% di tutti gli YLL, e 24,9 milioni di DALY sono attribuiti alle morbidità alcol-correlati (cioè anni di vita vissuti con disabilità, o YLD), che rappresentano il 3,4% di tutti gli YLD.

Tra i 230 codici ICD-10 a tre cifre cui è correlato l'alcol, le malattie dell'apparato digerente, lesioni involontarie, malattie cardiovascolari (CVD) e diabete sono state le principali cause dei 3 milioni di decessi stimati attribuibili all'alcol nel 2016, e sono stati singolarmente responsabili rispettivamente del 21,3%, 20,9% e 19,0% di questi decessi (10) (**Figura 3**).

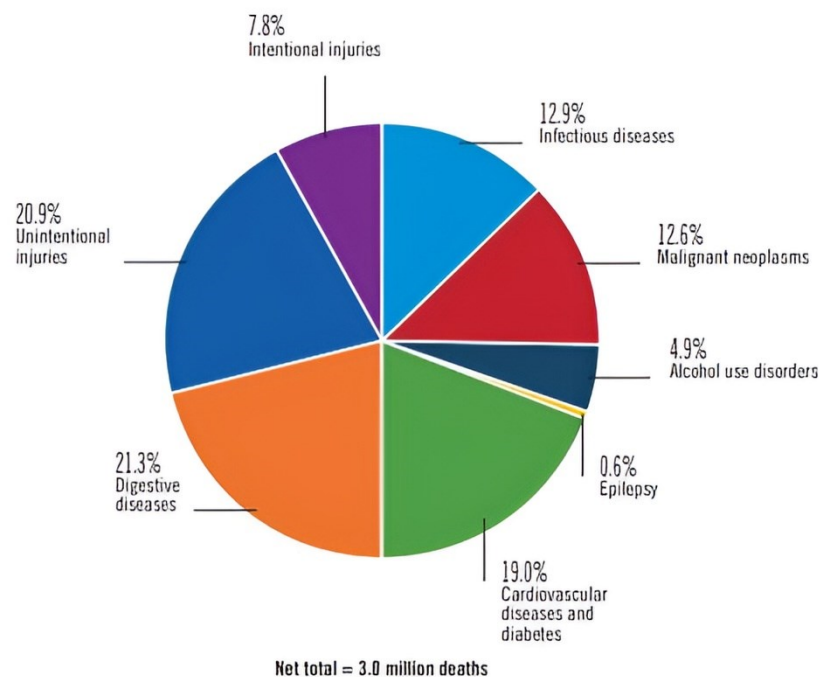


Figura 3 Percentuale (in %) di decessi attribuibili all'alcol, per categorie di malattia, 2016 (10)

Le più recenti valutazioni dell'OMS in merito al consumo di alcol come fattore di rischio per mortalità prematura e disabilità, indicano esplicitamente che non sia possibile individuare quantità di alcol sicure per la salute. Viene sottolineato, inoltre, che anche l'ingestione di quantità moderate di bevande alcoliche, indipendentemente dalla tipologia, produca danni non solo al bevitore ma anche a terzi con conseguenti implicazioni negative immediate per i *setting* sociali e relazionali allargati, come testimoniato dal livello crescente di comportamenti violenti che avvengono sotto l'influenza dell'alcol e dei suoi effetti psicoattivi sul cervello, di abusi, maltrattamenti (su coniuge, *partner*, minori), separazioni, abbandoni, perdita di lavoro, perdite di opportunità sociali, incapacità di costruire legami affettivi e relazioni stabili, invalidità, incidenti sul lavoro e sulla strada (10). In riferimento a tutto ciò che è stato sopraddetto, è intuibile la necessità di biomarcatori dotati di elevata sensibilità e specificità e che possano permettere una quantificazione il più possibile oggettiva dell'assunzione di alcol da parte del soggetto in esame.

BIOMARCATORI

I biomarcatori del consumo di alcol vengono classificati in indiretti, ossia correlati alla risposta fisiopatologica dell'organismo all'etanolo, e diretti, comprendenti l'etanolo stesso ed altri metaboliti non volatili.

MARCATORI INDIRETTI

1. ENZIMI EPATICI (AST, ALT, GGT)

L'aspartato transaminasi (AST) e l'alanina aminotransferasi (ALT) sono entrambi degli enzimi essenziali per la sintesi degli aminoacidi a partire dal ciclo di Krebs. Gli esami di laboratorio valutano la loro presenza nel siero o nel plasma, la quale risulta particolarmente elevata in caso di danno epatico. Di conseguenza, considerando che il metabolismo dell'alcol avviene principalmente nel fegato e che questo porta ad un suo danneggiamento, la quantificazione degli enzimi epatici è utile a identificare il danno epatico alcol-correlato (11). La loro specificità (50-95% (12)) e sensibilità (15-69% (12)) può essere aumentata andando a considerare non il loro valore assoluto, ma il rapporto tra l'attività sierica di AST e ALT. È stato

infatti dimostrato che un rapporto AST/ALT > 2 è un forte indicatore di danno epatico causato dal consumo di alcolici, è tuttavia da segnalare che la scarsa specificità di questi enzimi è provata dal fatto che un loro rialzo si presenta sia in caso di interessamento epatico non alcolico (come avviene nelle epatiti virali, nella steatosi o steatoepatite, nei danni da farmaci e tossici, nelle epatiti autoimmuni e nell'emocromatosi), sia nel caso di diverse condizioni non epatiche (ad esempio il diabete, la sindrome metabolica, celiachia, emolisi, miopatie e ipertiroidismo) (13). La funzionalità epatica può essere valutata anche dalla quantificazione della γ -glutamyl transferasi (GGT), un enzima coinvolto nel metabolismo extracellulare del glutatione (14) e presente sulla membrana plasmatica di molte cellule e tessuti tra cui reni, fegato, pancreas ed intestino, e che può essere elevato nel contesto di un forte consumo di alcol (15). Viene descritta una sensibilità del 40-50%, con una specificità dell'80-90%. Anche in questo caso la scarsa specificità è associata al rialzo dei valori enzimatici in presenza di altre condizioni patologiche, quali ostruzione biliare, malattie cardiache e renali e obesità.

Diversi studi hanno presentato una notevole variabilità nella valutazione delle prestazioni degli enzimi epatici quali metodo di monitoraggio e identificazione di consumo alcolico. Questo può essere spiegato dal fatto che i valori rilevati possono subire l'interferenza di molti fattori, tra cui età, sesso, comorbidità e la prevalenza del consumo di alcol nelle varie popolazioni di riferimento (16).

2. VOLUME CORPUSCOLARE MEDIO (MCV)

Il volume corpuscolare medio (MCV) è un parametro che descrive la dimensione media dei globuli rossi e viene valutato nell'ambito dell'esame emocromocitometrico. Un aumento dei valori di MCV al di sopra dei valori soglia (100 fL) individua una condizione di aumentata dimensione degli eritrociti, così detta macrocitosi (8). La macrocitosi e l'anemia macrocitica sono frequentemente riscontrabili nei pazienti che abusano di alcolici poiché l'etanolo e i suoi metaboliti, come l'acetaldeide, hanno effetti tossici sulla produzione, maturazione e differenziamento delle cellule precursori dei globuli rossi, influenzandone la morfologia e l'integrità (17). L'MCV elevato può perdurare fino a diversi mesi dopo un consumo prolungato ed importante di alcol, e, allo stesso tempo, un cambiamento nel consumo si rifletterà in una variazione del MCV nel corso dei mesi successivi (18). Quanto affermato precedentemente per gli enzimi epatici si

replica anche per l'MCV. La sua sensibilità (60-90% (12)) e specificità (30-75% (12)) sono limitate nella rilevazione di un uso cronico di alcolici e, sebbene questo marcatore sia di facile accessibilità ed economica valutazione, l'influenza di altre condizioni ematologiche come emolisi ed emorragie, carenza di vitamina B12 o folati ed alcuni farmaci, lo rendono di scarsa utilità a questo scopo (16).

3. TRANSFERRINA DESIALATA (CDT)

La transferrina è una glicoproteina responsabile del trasporto del ferro ed è sintetizzata prevalentemente a livello epatico. Ne esistono molte isoforme che variano principalmente per il numero di residui terminali di acido sialico. Nei soggetti sani la tetrasialotransferrina (4 acidi sialici terminali) è l'isoforma più abbondante in circolazione (> 80% della transferrina totale) (19). Le transferrine con deficit di carboidrati (CDT) sono isoforme di transferrina che presentano un deficit di 1 o più acidi sialici terminali. L'uso prolungato di alcol (circa 40-60 g/die per settimane-mesi) provoca un aumento transitorio delle concentrazioni circolanti delle isoforme meno abbondanti, soprattutto asialo- e disialotransferrine a scapito della tetrasialotransferrina (20). Il processo alla base del cambiamento delle isoforme di transferrina associato all'alcol è poco conosciuto, ma probabilmente è causato da un'alterazione del processo di glicosilazione della transferrina mediata dall'acetaldeide (21).

La CDT, misurata a seconda dei diversi test utilizzati come disialotransferrina, somma di disialo- e asialotransferrina, oppure come percentuale di CDT (disialo- e asialotransferrine) rispetto a tutte le isoforme, ha prestazioni migliori rispetto ad altri metodi indiretti nell'identificazione del consumo cronico di dosi elevate di alcol. La variabilità interindividuale è determinata soprattutto da sesso ed età (22) e, nella popolazione generale, la sensibilità riportata varia dal 65% al 95%, mentre la specificità oscilla tra il 95% e il 100% (23). La limitazione principale è data dal fatto che il suo valore può risultare aumentato nel caso di malattie epatiche non alcoliche, come la cirrosi biliare, l'epatite cronica, l'epatite autoimmune e le neoplasie epatiche; risulta inoltre elevata nel corso della gravidanza, non rendendolo un adeguato marcatore per la valutazione dell'assunzione di alcol durante l'epoca gestazionale (16).

MARCATORI DIRETTI

1. ETANOLO

L'alcolemia è la misurazione diretta della concentrazione di etanolo a livello ematico e viene espressa come rapporto tra la concentrazione in grammi di quest'ultimo per volume di sangue in litri. L'alcolemia nell'organismo ha valore zero ed aumenta quando il soggetto assume bevande alcoliche, raggiungendo rapidamente un picco iniziale, per poi diminuire spontaneamente e gradualmente nell'arco di 24-48 ore (24). La sua quantificazione permette di ottenere un valore puntuale relativo alla quantità di sostanza disciolta nel sangue e dunque dotata di un effetto psicoattivo, motivo per cui questa rappresenta il *gold standard* per la quantificazione e qualificazione degli effetti di questa sull'individuo. Tuttavia, perché la misurazione dell'alcolemia sia possibile è necessario innanzitutto un campione ematico del paziente, da acquisirsi necessariamente tramite un prelievo invasivo, e inoltre che la molecola sia ancora presente in circolo. Riguardo a quest'ultimo punto, giova qui ricordare come l'etanolo abbia un'elevata velocità di *clearance*, circa 0,1 g/kg per ora, corrispondente a 0,15-0,20 g/L per ora, con valori variabili in base al metabolismo individuale. Di conseguenza, il principale limite della quantificazione dell'etanolo è rappresentato proprio dal fatto che è possibile identificare solo un uso molto recente, rendendolo un marcatore molto specifico ma poco sensibile (la sensibilità oscilla tra 0 e 98%, mentre alla specificità viene attribuito un valore del 98% (24)). È abbastanza intuitivo che una persona potrebbe consumare considerevoli quantità di alcol durante la sera precedente e presentare un valore di etanolo ematico molto basso o nullo il mattino successivo (25). Trovare poi un singolo campione positivo per etanolo non è indicativo né del consumo regolare di alcol né di dipendenza; è necessario tenere presente, oltretutto, che un test positivo che rileva basse concentrazioni di etanolo potrebbe derivare sia da una recentissima assunzione di una piccola dose di alcol, sia da una più lunga eliminazione di una dose tossica molto elevata. Infatti, il valore dell'alcolemia è fortemente influenzato dal metabolismo (26). Questa risulterà maggiore, a parità di alcol assunto, nel caso di un soggetto molto giovane, magro, donna, disidratato, a digiuno o non avvezzo al consumo di alcolici. La spiegazione di questo fenomeno è data dalla diversa attività degli enzimi che metabolizzano l'alcol che, nei casi precedentemente descritti, sarà minore, cosa che porta ad un *bias* nella corretta

interpretazione dei risultati ottenuti (24). Nel caso di particolari ambiti come la guida, il pronto soccorso e il luogo di lavoro ci sono metodi di campionamento non invasivi che permettono di valutare l'esposizione all'alcol attraverso l'analisi dell'aria espirata o della saliva, questo perché una piccola parte di etanolo non viene metabolizzato a livello epatico, ma viene eliminato direttamente attraverso la via respiratoria o attraverso la secrezione ghiandolare (26). Nonostante il vantaggio dell'utilizzo di metodi non invasivi, tutte le osservazioni riguardanti la difficoltà nell'interpretazione dei risultati derivante dalla variabilità interindividuale nell'assorbimento, metabolismo ed eliminazione della sostanza, risulterà ancora maggiore nel momento in cui si vanno ad utilizzare matrici diverse rispetto al sangue.

2. ETILGLUCURONIDE (EtG) E ETILSOLFATO (EtS)

L'etilglucuronide (EtG) è un prodotto della coniugazione dell'etanolo con l'acido glucuronico, analogamente l'etilsolfato (EtS) è un prodotto della coniugazione di etanolo e solfato. Questi metaboliti non ossidativi costituiscono < 1% del totale dei metaboliti dell'etanolo e vengono concentrati a livello urinario, dove sono misurati, 200 volte in più rispetto al siero e sono stabili a temperatura ambiente fino a 4 giorni (27). Sono rilevabili nelle urine circa 1 ora dopo il consumo di etanolo e rimangono rilevabili per 24-48 ore (28).

Sia EtG che EtS urinari sono considerati altamente sensibili (circa 80%-100%) e specifici (circa 90%-100%) nel rilevare l'uso o l'esposizione recente all'alcol. L'ostacolo principale all'ampio utilizzo di questi biomarcatori è l'incapacità nel distinguere tra l'assunzione di piccole quantità di etanolo poche ore prima della misurazione, oppure quella di abbondanti quantità diversi giorni precedenti alla valutazione. Inoltre, è dimostrato che le concentrazioni di EtG e EtS sono minori nei maschi e nei soggetti con malattie renali e la possibilità di ottenere dei risultati falsi positivi causati dall'esposizione involontaria all'etanolo nell'uso di lavaggi della bocca o disinfettanti delle mani a base di alcol. Sono stati segnalati, inoltre, dei risultati falsi positivi dovuti alla sintesi *post-mortem* dell'EtG nelle urine da parte di batteri in presenza di etanolo; al contrario, dei falsi negativi possono presentarsi nel caso di infezioni urinarie per l'idrolisi dell'EtG da parte di idrolasi batteriche (29).

Anche i capelli possono rappresentare una matrice utile al rilevamento dell'EtG (16). Attraverso di essi è possibile offrire una finestra più ampia di tempo di rilevamento, valutando l'uso cronico di etanolo nell'arco di diversi mesi con l'analisi di un singolo campione. Inoltre, anche in assenza di autodichiarazioni da parte dei pazienti, l'analisi segmentale dei capelli risulta essere vantaggiosa per la valutazione dell'andamento del consumo di alcol; questo è reso possibile dalla relazione direttamente proporzionale tra la concentrazione dell'EtG nel capello e il consumo alcolico.

Secondo la più recente revisione della *Society of Hair Testing* (SoHT) (30), una concentrazione di EtG ≤ 5 pg/mg nel segmento prossimale dei capelli (da 3 cm a 6 cm dal cuoio capelluto) è indicativa di astinenza dal consumo di bevande alcoliche, una concentrazione > 5 pg/mg suggerisce un consumo abituale e moderato di alcol, mentre una concentrazione ≥ 30 pg/mg suggerisce un abuso cronico. Pertanto, sulla base dei *cut-off* adottati a livello internazionale, è possibile individuare l'astinenza, consumo moderato o abuso di alcol. Purtroppo, l'EtG, può subire variazioni a causa di diversi fattori intrinseci, tra cui il sesso, l'età, le condizioni di comorbidità come malattie epatiche e renali e il diabete; e fattori estrinseci, come i trattamenti cosmetici e/o l'igiene dei capelli (31).

3. ESTERI ETILICI DEGLI ACIDI GRASSI (FAEE)

Gli esteri etilici degli acidi grassi (FAEE) sono metaboliti non ossidativi dell'etanolo formantisi attraverso una reazione di esterificazione tra etanolo e acidi grassi endogeni, trigliceridi, lipoproteine e fosfolipidi. La concentrazione quantificabile di FAEE nel sangue diminuisce rapidamente entro le prime 24 ore e questo è il principale motivo dello scarso utilizzo di questo marcatore a favore dell'utilizzo di biomarcatori più performanti con emivite più lunghe, come EtG, EtS e fosfatidiletanolo (16).

4. FOSFATIDILETANOLO (PEth)

Il fosfatidiletanolo (PEth) è un fosfolipide di membrana anomalo la cui sintesi è catalizzata dalla fosfolipasi D (PLD), un enzima ubiquitario, normalmente coinvolto nell'idrolisi della fosfatidilcolina (PC) in acido fosfatidico (PA). Nel momento in cui vi è la presenza di etanolo, la PLD (presente nell'umano in due

diverse isoforme: PLD1 che si distribuisce a livello perinucleare e mostra un'attività basale bassa richiedendo l'attivazione della proteina chinasi C; PDL2 che è localizzata a livello delle membrane cellulari e costitutivamente attiva) (32) catalizza la reazione di transfosforilazione utilizzando come substrato l'alcol anziché l'acqua, ottenendo PEth (33), come riassunto in **Figura 4**.

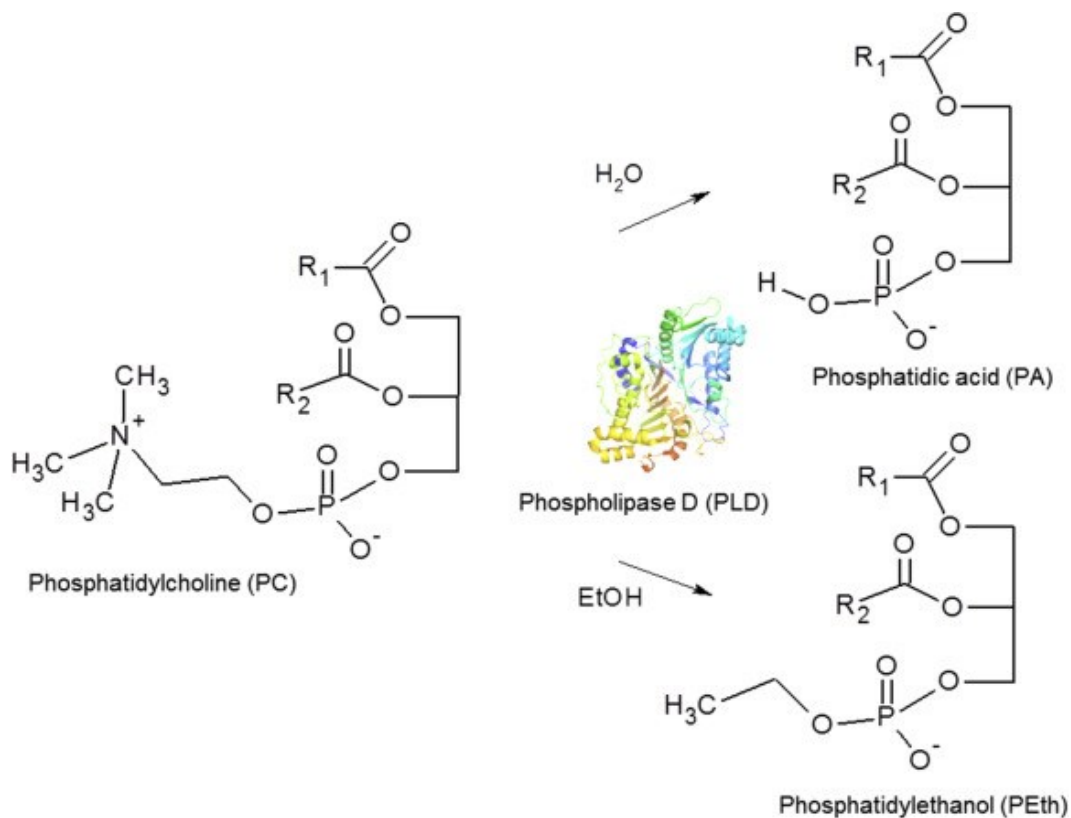


Figura 4 Reazione di transfosforilazione mediata dall'enzima PDL in presenza di acqua e di etanolo

La sintesi del PEth inizia subito dopo l'assunzione di etanolo, che ne è, come detto, un elemento essenziale, raggiunge un picco dopo 8 ore circa e può essere rilevato in circolo fino a 4 settimane dopo l'inizio di un periodo di completa astinenza (nel 64.3% dei casi (32)) grazie alla sua lunga emivita (16). Il PEth circolante è localizzato quasi esclusivamente nei globuli rossi, questo perché essi mancano dell'enzima fosfatidilcolina fosfolipasi C (PLC) indispensabile per la sua degradazione. Ciò determina uno squilibrio tra la formazione e degradazione del PEth che porta ad un accumulo di questo a livello delle membrane cellulari dei globuli rossi (32).

Sebbene, fino a questo momento, ci si sia riferiti al PEth come ad una singola molecola, è bene precisare che in realtà non è così. Si tratta, infatti, di un gruppo di

glicerolfosfolipidi omologhi con un gruppo di testa comune di fosfoetanololo cui sono legate due lunghe catene laterali di acido carbossilico, tipicamente contenente dai 14 ai 22 atomi di carbonio con diversi gradi di saturazione (da 0 a 6 doppi legami). Numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di 48 omologhi del PEth, derivanti dalle diverse combinazioni di catene con diverse lunghezze e doppi legami, nominati come A:B/C:D, dove A e C indicano il numero di carboni nelle catene laterali, mentre B e D indicano il numero di doppi legami in ogni catena. Sebbene esistano differenze interindividuali nella presenza di diversi omologhi, i dati suggeriscono che 5 specie (16:0/18:1, 16:0/18:2, 16:0/20:4, 18:1/18:1, 18:1/18:2) costituiscono più dell'80% del PEth totale (32).

Questo marcatore ha inoltre dimostrato un'alta sensibilità (> 88%) e specificità (> 90%), quest'ultima molto elevata in quanto il PEth si viene a formare soltanto in presenza di etanolo (16).

Andando ad analizzare i fattori che possono influenzare la sensibilità del PEth si è evidenziato che, con molta probabilità, sesso, età, etnia e metodo di analisi del PEth non hanno nessuna influenza. Tra le variabili biologiche che portano ad un aumento della sensibilità, ci sono delle evidenze per quanto riguarda l'emoglobina elevata e la fibrosi epatica avanzata. La spiegazione che viene fornita nel primo caso è che la formazione del PEth avviene sulla membrana dei globuli rossi, pertanto, quanto maggiore è il loro numero, tanto più elevata sarà anche la concentrazione del marcatore; mentre per quanto riguarda la fibrosi, sembra essere associata al fatto che il danno epatico comporta una ridotta eliminazione dell'etanolo.

Una riduzione della sensibilità del PEth si è invece individuata in pazienti con un BMI elevato poiché la concentrazione di etanolo nel sangue, a parità di alcol consumato, è inversamente proporzionale al peso corporeo. Allo stesso modo, ciò è stato evidenziato anche in pazienti HIV positivi. Le possibili ipotesi che spieghino questo secondo fenomeno sono diverse, tra cui la probabilità che vi sia una più lenta eliminazione dell'alcol o un minor assorbimento per la contemporanea assunzione di farmaci antiretrovirali (34).

Probabilmente, potrebbe esserci l'interferenza di tutti questi fattori alla base della variabilità interindividuale nella determinazione del PEth.

Tuttavia, non sono ancora stati validati a livello internazionale dei *cut-off* che permettano di identificare il quantitativo di alcol consumato dal soggetto in esame sebbene siano stati proposti dei "valori guida":

- < 20 ng/mL: consumo lieve o assente. Ovvero astinenza o consumo di meno di 2 U.A. al giorno per la maggior parte dei giorni della settimana;
- 20-200 ng/mL: consumo moderato-elevato. Ovvero assunzione tra le 2 e 4 U.A. per diversi giorni della settimana. Questo *range* corrisponde a quello che viene definito da NIAAA come “*basso rischio*”, identificato per l'uomo nell'assunzione di non più di 4 U.A. al giorno o 14 U.A. a settimana, mentre per la donna in non più di 3 U.A. al giorno o 7 U.A. a settimana;
- > 200 ng/mL: consumo eccessivo. Ovvero definito “*forte bevitore o heavy drinker*” secondo NIAA nel momento in cui il consumo di alcol supera le 4 U.A. al giorno (35).

Per la misurazione del PEth viene ad oggi ampiamente utilizzato dai laboratori il metodo della cromatografia liquida - spettrometria di massa (LC-MS), validato in quanto tecnologia che presenta *performance* analitiche superiori a tutte le altre metodiche di misurazione (32).

È necessario sottolineare uno dei vantaggi principali del PEth, ovvero la sua finestra di rilevazione. Osservando gli altri marcatori citati precedentemente, è generalmente accettato che l'utilizzo di un singolo analita non possa documentare con certezza se il consumo dell'alcol sia avvenuto nel breve o nel lungo termine; nonostante ciò, si può notare come, per quanto riguarda la valutazione dell'alcolemia o dell'EtG nel sangue/urina, le finestre di rilevamento siano brevi, sarebbero perciò necessari campionamenti giornalieri o multipli nella settimana per monitorare un periodo più lungo; l'EtG nei capelli invece, non consente di rilevare il consumo recente a causa della lenta crescita degli stessi. Il PEth si colloca in una posizione intermedia per quanto riguarda la finestra di rilevazione, guadagnando un crescente consenso nella valutazione del consumo alcolico.

Tutte queste considerazioni permettono di comprendere come vi siano delle caratteristiche che rendono il PEth un biomarcatore di consumo alcolico molto promettente e con un campo di applicazione molto ampio, mostrandosi utile in diversi ambiti, soprattutto nel contesto medico-legale (36).

APPLICAZIONI DEL FOSFATIDILETANOLO (PEth)

Vengono in seguito elencati e descritti i diversi possibili campi di applicazione di questo marcatore:

1. *FOLLOW-UP* DEI CONDUCENTI IN STATO DI EBBREZZA

In seguito a un'infrazione del codice della strada, come la guida in stato di ebbrezza (in Italia nel momento in cui il tasso alcolemico sia superiore a 0,5 g/L), ai trasgressori può essere comminata la sospensione della patente in via provvisoria e cautelare *ex art.* 186, Codice della Strada (37).

In questi casi, può essere riottenuto il diritto alla guida previa esecuzione di esami di reintegrazione, il cui scopo è aumentare la sicurezza stradale e diminuire il tasso di recidiva. Sebbene la legge sia diversa a seconda dei Paesi, in genere risulta obbligatoria l'astinenza prima e dopo il rilascio della patente.

Sebbene l'EtG nelle urine e/o nei capelli oppure i marcatori indiretti, come la CDT, siano stati e siano tutt'ora ampiamente utilizzati per valutare l'astinenza o l'assenza di consumo eccessivo, alcune istituzioni si stanno orientando verso l'analisi del PEth. Questo perché, in quest'ultimo caso, i cambiamenti nel comportamento del consumo alcolico possono essere rilevati più precocemente ed accuratamente, rendendo possibile eseguire un *follow-up* a breve termine. Pertanto, il PEth potrebbe rappresentare un valido biomarcatore per la valutazione dell'attitudine alla guida. A tutt'oggi, però, manca ancora una validazione dell'utilizzo di questo biomarcatore a fini forensi, necessitando di ulteriori studi in questo senso (36).

2. TRAPIANTO DI ORGANI

La malattia epatica causata dall'abuso alcolico sta diventando indicazione sempre più frequente di trapianto di fegato. I biomarcatori assumono, perciò, un ruolo rilevante nel valutare l'astinenza dei pazienti prima dell'inserimento nelle liste d'attesa, nel monitoraggio dei pazienti in lista o nel rilevare una ricaduta dopo il trapianto. Ciò è di notevole importanza perché gli organi disponibili sono in numero minore rispetto alla domanda e, in questo modo, si può valutare l'idoneità di un ricevente e stimolare l'adesione all'astinenza nel *post-trapianto* (36).

I due biomarcatori impiegati maggiormente nei pazienti affetti da malattia epatica alcol correlata (*Alcoholic Liver Disease* o ALD) sono l'etilglucuronide (EtG) e il

fosfatidiletanolo (PEth). Due studi, condotti per la valutazione della validità dell'EtG, hanno chiaramente dimostrato la sua migliore accuratezza rispetto ai biomarcatori tradizionali, in particolare biomarcatori indiretti come gli enzimi epatici (38), (39). Analogamente, il PEth è stato testato in uno studio su pazienti affetti da ALD (40), e in due studi che includevano sia pazienti in *pre-* che *post-*trapianto (41), (42). Nel complesso, tutti gli studi sopracitati sembrano suggerire che il PEth fornisca un significativo valore aggiunto alle procedure di monitoraggio nei pazienti affetti da ALD, poiché, analogamente ad altri biomarcatori diretti dell'alcol, mostra una maggiore sensibilità rispetto a quanto viene autodichiarato o ai biomarcatori tradizionali indiretti. Inoltre, il campione da analizzare può essere ottenuto direttamente attraverso un prelievo ematico, il che lo rende molto meno soggetto a contaminazione o manipolazione.

Tuttavia, sono necessari altri studi, reclutando un numero maggiore di pazienti, per confermare questi risultati preliminari. Inoltre, sarebbe opportuno incrementare i confronti tra i biomarcatori diretti, in queste popolazioni, per valutare le diverse prestazioni diagnostiche (43). Nonostante ciò, l'utilizzo del PEth sta diventando sempre maggiore proprio per la sua elevata specificità anche in pazienti in cui sono presenti malattie epatiche e cirrosi.

3. SCREENING NEONATALE / SINDROME ALCOLICA FETALE

L'esposizione all'alcol di una donna in gravidanza può comportare dei danni al feto, in particolare dei deficit neurocognitivi permanenti e uno spettro sintomatologico definito nel complesso sindrome alcolica fetale. Per una diagnosi precoce è necessaria una conferma del consumo da parte della madre (36). Tuttavia, le donne in gravidanza tendono a non dichiarare il proprio consumo di alcol per vergogna o stigma sociale, generando la necessità di biomarcatori sensibili e specifici in grado di identificare l'eventuale consumo di alcol in gravidanza, al fine di promuovere programmi educativi e interventi di *counselling*, con un'attenzione particolare soprattutto al primo trimestre.

Nella Letteratura recente, tra i biomarcatori proposti, il PEth è emerso per la sua elevata specificità e per la possibilità di essere quantificato sia nel sangue materno che in quello neonatale, anche utilizzando i *dried blood spots* (DBS) raccolti per gli *screening* di *routine*. Sebbene la problematica principale risulti essere l'assenza di *cut-off* precisi, ulteriori studi sarebbero indispensabili per verificare se la

concentrazione di PEth nel sangue materno e/o neonatale possa essere in grado di identificare anche un'assunzione minima di etanolo durante la gravidanza (44).

4. SICUREZZA NEGLI AMBIENTI DI LAVORO

Un altro ambito in cui può essere proposto l'utilizzo del PEth è la sicurezza nel posto di lavoro, dove l'autodichiarazione del lavoratore spesso non corrisponde al vero per il timore di ripercussioni negative e/o licenziamenti. Sarebbe pertanto necessario uno *screening* con un marcatore valido che permetta una misura oggettiva del consumo di alcol (36).

5. INDAGINI GIUDIZIARIE

L'analisi del PEth è stata introdotta nei tribunali familiari per la valutazione dell'abuso di alcol da parte di genitori di figli vittime di molestie e/o maltrattamenti. In altri studi si è applicata l'analisi del PEth come test di *routine* nei casi forensi, compresi i casi di stupro o nel *post-mortem*. In questo modo, i risultati possono far luce sulle abitudini di consumo del defunto, della vittima o dell'imputato, e quindi permettere un'interpretazione della vicenda avendo un quadro più completo possibile (36).

6. DIAGNOSI E TRATTAMENTO DEI DISTURBI DA USO DI ALCOL

Al momento nessun marcatore è utilizzato per la diagnosi del disturbo da uso di alcol, questa infatti, viene posta solo nel momento in cui siano soddisfatti i criteri del DSM-5. È pertanto, allo stato attuale, una diagnosi esclusivamente clinica.

L'analisi del PEth, sperimentalmente, potrebbe rappresentare un valido aiuto nella misurazione oggettiva del consumo di alcol sia nel momento della diagnosi che nel periodo di astinenza durante la riabilitazione dei pazienti affetti da AUD. È stato documentato che il PEth è più utile per rilevare le ricadute in quanto, a differenza dell'EtG e dell'EtS nelle urine, che possono azzerarsi nell'arco di un breve intervallo di tempo, risulta misurabile per diversi giorni o settimane (36). Il PEth si è dimostrato altamente specifico, ma non è stata identificata una altrettanto alta sensibilità, auspicabile in una popolazione non preselezionata, tale da permetterne una diffusione dell'utilizzo nella pratica clinica nella popolazione generale.

Tra gli svantaggi maggiori vi è la mancanza della comparabilità dei risultati ottenuti, dovuta all'inesistenza di un sistema di misurazione di riferimento. Ergo, una delle sfide principali, al momento, è la corretta interpretazione dei risultati e l'identificazione di *cut-off* per distinguere tra astinenza / consumo leggero, consumo moderato oppure consumo dannoso.

Questo lavoro si concentra soprattutto su quest'ultimo campo di applicazione, ovvero l'identificazione oggettiva, attraverso il valore rilevato del PEth nel soggetto in esame, di un consumo alcolico a rischio per la salute con potenziale evoluzione in un disturbo da uso di alcol. Questo rappresenterebbe sicuramente un vantaggio rilevante per il fatto che, in questo modo, la diagnosi di AUD verrebbe dimostrata attraverso dei criteri laboratoristici e non soltanto clinici, attraverso l'impiego del DSM-5, come avviene al momento.

Pertanto, l'obiettivo del lavoro è cercare di comprendere se sia attualmente possibile applicare l'analisi del PEth per consentire l'individuazione nella popolazione generale di un consumo alcolico a rischio.

MATERIALI E METODI

Questa revisione sistematica è stata condotta seguendo i criteri inclusi nella guida *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) del 2020 (45).

Nell'agosto 2022 è stata effettuata una ricerca sistematica della Letteratura attraverso i protocolli "MeSH" e "free-text" nelle banche dati *PubMed*, *Scopus* e *Web of Science*, stabilendo come limiti temporali 1° Gennaio 2011 – 1° Agosto 2022. Per *PubMed* e *Web of Science* sono stati utilizzati i seguenti termini di ricerca: ("*phosphatidylethanol*" [*Supplementary Concept*] OR PEth OR *phosphatidylethanol*) AND (*forensic* OR *legal* OR *biomarker* OR *marker* OR *alcohol abuse* OR *abstinence* OR *monitoring*). Per *Scopus* è stata utilizzata una stringa modificata: "ALL ((*phosphatidylethanol* OR PEth OR *phosphatidylethanol*) AND (*forensic* OR *legal* OR *biomarker* OR *marker* OR *alcohol* AND *abuse* OR *abstinence* OR *monitoring*))". La selezione dei lavori è stata condotta sulla base dei titoli e degli *abstract*. Sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione ed esclusione.

Criteri di inclusione

- A. Titoli e *abstract* disponibili in lingua inglese.
- B. PEth utilizzato per rilevare un consumo di alcol dannoso per la salute nella popolazione generale.
- C. PEth quantificato nel sangue umano intero o in *dried blood spots* (DBS) mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS).
- D. *Full-text* in lingua inglese.

Criteri di esclusione

- E. Articoli di opinione, editoriali e *review* senza nuovi dati.
- F. Articoli riguardanti popolazioni specifiche (ad esempio, donne in gravidanza, soggetti sieropositivi, ecc.).
- G. Articoli riguardanti lo sviluppo e/o la validazione di metodi analitici.
- H. Lavori riguardanti casi autoptici.

Sono stati esclusi gli articoli che non soddisfacevano almeno uno dei criteri A - D o che soddisfacevano uno dei criteri di esclusione E - H. In caso di classificazione dubbia sulla base del titolo e dell'*abstract*, è stato esaminato il testo completo. Eventuali discrepanze nel processo di selezione degli articoli sono state risolte mediante discussione con il correlatore.

I dati estratti dagli studi sono stati raccolti in una tabella. Il relatore ha verificato l'accuratezza del processo di estrazione dei dati, al fine di minimizzare il giudizio soggettivo. Di ogni studio sono stati raccolti i seguenti elementi: autori e anno di pubblicazione, caratteristiche (tipo di studio, gli obiettivi principali, tipologia e numero di soggetti coinvolti, *setting* clinico e criteri di inclusione ed esclusione), caratteristiche della popolazione studiata (numero di soggetti, età media, razza/etnia, comorbidità, presenza di una popolazione di controllo), metodi adottati per la stratificazione della popolazione e per la stima dell'uso alcolico, quantità di alcol consumato in media dai partecipanti allo studio, metodo analitico utilizzato per la quantificazione, isoforme del PEth misurate e loro concentrazione, tipologia di campione raccolto, tempi di raccolta, principali risultati ottenuti (sensibilità, specificità, valore predittivo positivo e valore predittivo negativo), altri marcatori eventualmente studiati. Eventuali discrepanze nel processo di estrazione dei dati sono state risolte mediante discussione consensuale.

RISULTATI

Come riportato nel diagramma di flusso del PRISMA (**Figura 5**) la ricerca combinata sulle banche dati *PubMed*, *Web of Science* e *Scopus* ha permesso di recuperare 2106 documenti, 592 dei quali sono stati eliminati in quanto duplicati. Dei 1514 lavori esaminati in base al titolo e all'*abstract*, 1351 sono stati esclusi in base ai criteri A, B e C. I restanti 163 lavori sono stati analizzati in *full-text* e 146 sono stati esclusi in base ai criteri D - H. Diciassette ($n = 17$) lavori (0,81% dei lavori totali) sono stati inclusi nella presente revisione.

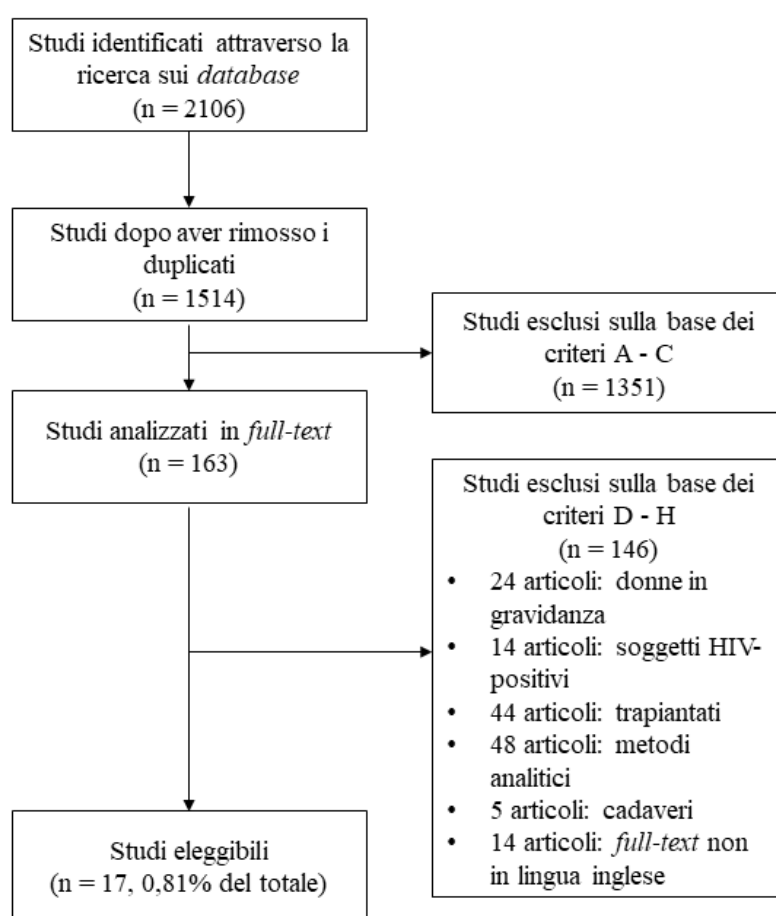


Figura 5 PRISMA Flow Chart

I principali dati estratti dai diciassette ($n = 17$) lavori inclusi sono presentati nella **Tabella II**.

Autori e anno	Obiettivo principale	Numero di soggetti	Metodi per stimare l'uso di alcol	Campione	Conclusioni	Altri marker
Aboutara <i>et al.</i> (46) 2022	Valore diagnostico degli omologhi del fosfatidiletanolo (PEth) rispetto ad altri biomarcatori di consumo alcolico in relazione a tempi e quantità d'assunzione diversi	234 pazienti reclutati in una clinica per nefro- o epatopatie (130 M / 104 F)	AUDIT (1 settimana; 4 settimane; 3 mesi)	DBS da sangue con EDTA	Il PEth ha fornito la migliore sensibilità e specificità per il consumo di alcol durante tutti i periodi di tempo precedenti al prelievo di sangue. Soprattutto il numero di casi in cui il consumo di alcol è stato rilevato esclusivamente dal PEth (n = 33), sottolinea il vantaggio di integrare il PEth ai marcatori alcolici standard nella valutazione del consumo alcolico.	hEtG uEtG CDT AST ALT GGT MCV
Afshar <i>et al.</i> (47) 2021	Studio dei biomarcatori per lo <i>screening</i> dell'uso di alcol dannoso per la salute in un <i>trauma-setting</i>	251 pazienti che hanno fatto accesso ad un centro-traumi (187 M / 64 F)	AUDIT	DBS da sangue con EDTA	L'utilizzo di un <i>cut-point</i> ottimale di 25 ng/mL del PEth può superare le difficoltà di <i>screening</i> attuali e aiutare ad identificare i pazienti che consumano quantità di alcol dannose per la salute.	uEtS uEtG CDT GGT BAC
Afshar <i>et al.</i> (48) 2017	Studio del PEth per identificare il consumo di alcol dannoso per la salute, soprattutto nei pazienti in condizioni critiche	122 soggetti: Da unità di terapia intensiva medica e per ustionati (n=33) Da centri di disintossicazione da alcol (n=51) Volontari sani (n=38) (93 M / 29 F)	AUDIT AUDIT-C	DBS da sangue intero	Si è dimostrata una buona accuratezza diagnostica del PEth nel discriminare il consumo di alcol dannoso per la salute con <i>cut-point</i> utili per la stratificazione del rischio dei pazienti.	BAC

Baggio <i>et al.</i> (49)	Confronto tra l'accuratezza dell'AUD e della quantità autodichiarati e i biomarcatori rispetto ad un questionario clinico <i>gold-standard</i> , nell'identificare un consumo alcolico dannoso per la salute	233 soggetti da un centro di reclutamento per l'esercito (233 M / 0 F)	Intervista diagnostica per studi genetici (DIGS) come <i>gold standard</i> per l'AUD AUDIT	DBS da sangue intero	La migliore opzione per lo <i>screening</i> del consumo alcolico dannoso per la salute tra i giovani uomini del centro sembra essere una combinazione tra otto sintomi del disturbo da uso di alcol e quattro biomarcatori.	hEtG
Cherrier <i>et al.</i> (50)	Valutazione della relazione tra concentrazioni del PEth e consumo di alcol autodichiarato in adulti con consumo di alcol di tipo dannoso e non dannoso	183 soggetti (121 M / 62 F)	AUDIT AUDIT-C <i>Form-30</i>	EDTA - sangue intero	Forte relazione tra consumo di alcol e livelli di PEth. L'età è un fattore secondario che contribuisce a prevedere i livelli del marcatore. Il PEth era più strettamente associato alla quantità di alcol consumato rispetto ai giorni di consumo.	GGT AST ALT Bilirubina
Couture <i>et al.</i> (51)	Confrontare il consumo autodichiarato con i risultati ottenuti dal PEth.	200 soggetti 100 <i>sex-workers</i> 100 clienti maschi	AUDIT-C (3 mesi)	DBS da puntura del dito	Stretta correlazione tra il PEth e quanto dichiarato. Tra le donne, il 95,0% di quelle positive al PEth ha riferito di bere in quantità dannose per la salute. Tra gli uomini, il 57,1% dei positivi al PEth ha riferito di bere quantità dannose di alcol. Il consumo elevato riferito tra i soggetti con PEth negativo è stato del 70,0% per le donne e del 39,7% per gli uomini.	-

Francis <i>et al.</i> (52) 2015	Confronto tra il questionario MINI e il PEth negli studenti e giovani lavoratori	202 studenti del <i>college</i> e lavoratori occasionali (161 M / 41 F)	AUDIT MINI	EDTA-sangue intero	Utilizzando il biomarcatore alcolico PEth come riferimento per il consumo di alcol dannoso per la salute, le prestazioni del MINI nel rilevare la dipendenza da alcol tra i giovani sono risultate insoddisfacenti.	-
Francis <i>et al.</i> (53) 2015	Confronto tra i questionari AUDIT, AUDIT-C e TFLB e il PEth in studenti e giovani lavoratori	202 studenti del <i>college</i> e lavoratori occasionali (161 M / 41 F)	AUDIT AUDIT-C TFLB (30 giorni)	EDTA-sangue intero	Il TLFB e l'AUDIT sono sensibili nel rilevare il consumo di alcol dannoso per la salute tra i giovani.	-
Gerbase <i>et al.</i> (54) 2020	Confronto tra le prestazioni del PEth, concentrazione di alcol nel sangue (BAC) e l'AUDIT-C nello <i>screening</i> del consumo di alcol dannoso per la salute in pazienti con trauma fisico	238 pazienti adulti che si sono presentati al pronto soccorso con qualsiasi tipo di trauma (161 M / 77 F)	AUDIT-C	EDTA-sangue intero	Correlazione significativa tra i livelli di PEth e il punteggio AUDIT-C (Spearman's $r = 0.654$; $p < 0.0001$).	-

Jorgenrud <i>et al.</i> (55) 2021	Indagare la correlazione tra gli livelli di PEth, l'AUDIT-QF e i grammi settimanali di alcol consumati dai pazienti di due ospedali urbani in Norvegia e Russia; Indagare il valore predittivo del PEth nell'identificare l'uso di alcol a rischio come stimato dall'AUDIT-QF e dai <i>cut-off</i> settimanali di grammi di alcol	2874 pazienti a Oslo, di cui 931 con dati completi sull'AUDIT-QF e livelli di PEth \geq 0,030 μ M 3009 pazienti a Mosca di cui 953 con dati completi di AUDIT-QF e livelli di PEth \geq 0,030 μ M	AUDIT-QF	Sangue intero	I livelli di PEth correlano con i punteggi AUDIT-QF. <i>Cut-point</i> di PEth di 0,128 μ M (Oslo) e 0,270 μ M (Mosca) hanno fornito una discriminazione ottimale per il consumo di alcol a rischio per la salute. Convertendo l'AUDIT-QF in grammi di alcol consumati settimanalmente, il valore predittivo del PEth è migliorato, con <i>cut-point</i> ottimali di PEth di 0,327 (Oslo) e 0,396 (Mosca) μ M per l'uso elevato di alcol definito in grammi (\geq 350 grammi/settimana).	-
Kechais <i>et al.</i> (56) 2015	Valutare la capacità del PEth e dei tradizionali marcatori di assunzione di alcol nel rilevare il consumo moderato di alcol e nel distinguere tra consumo moderato e astinenza	44 soggetti (12 M / 32 F)	AUDIT-C	Sangue intero	Il PEth è stato l'unico marcatore in grado di rilevare l'assunzione moderata di alcol. I presenti risultati indicano anche che il PEth è probabilmente in grado di distinguere il consumo moderato di alcol dall'astinenza.	CDT MCV GGT AST ALT

Kuteesa <i>et al.</i> (57) 2019	Validare l'AUDIT (<i>Alcohol Use Disorders Identification Test</i>) rispetto al <i>Timeline Follow Back</i> (TLFB), al Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali (DSM-5) e al fosfatidiletanolo (PEth); Confrontare l'AUDIT 30-giorni con l'AUDIT 12-mesi tra i giovani in Uganda	1281 soggetti (675 M / 606 F)	AUDIT TLFB	DBS	Tra i giovani ugandesi, l'AUDIT a 30 giorni e a 12 mesi ha buone proprietà diagnostiche rispetto al PEth, al DSM-5 e al TLFB.	-
Lowery <i>et al.</i> (58) 2018	Identificare un <i>cut-point</i> ottimale per il PEth per il consumo di alcol a rischio per la salute nei donatori di organi	140 donatori di organi con morte cerebrale 62% (n=87) della coorte di donatori Gift of Hope (GOH) 38% (n=53) dalla coorte del Loyola University Medical Center (LUMC)	Intervista per la valutazione del rischio, compilata dai parenti del donatore.	Sangue intero	Il <i>cut-point</i> del PEth ≥ 84 ng/mL ha fornito una discriminazione ottimale secondo l'indice di Youden (J) per l'identificazione del consumo elevato di alcol in una coorte di donatori di organi in stato di morte cerebrale. I biomarcatori indiretti dell'alcol come AST, ALT, GGT e %CDT sono risultati poco discriminanti per l'abuso di alcol nei donatori di organi deceduti.	AST ALT GGT CDT

Piano <i>et al.</i> (59) 2015	Confrontare i livelli di PEth con l'assunzione di alcol autodichiarata tra giovani adulti <i>binge drinkers</i>	103 soggetti (36 M / 67 F)	AIQ AUDIT	Sangue intero venoso DBS venoso	I livelli di PEth misurati nel sangue intero e nel DBS erano significativamente correlati e maggiori nei <i>binge drinkers</i> rispetto agli astemi e ai bevitori moderati, questi livelli erano inoltre positivamente correlati con i punteggi AUDIT. I livelli di AUDIT, confrontati con il PEth nel sangue intero e nel DBS, erano significativamente ($p < 0,001$) maggiori nei <i>binge drinkers</i> (13 ± 4 , 186 ± 170 e 65 ± 53 , rispettivamente) rispetto ai bevitori moderati (6 ± 3 , 24 ± 29 e 11 ± 13 , rispettivamente) e agli astemi ($0,6 \pm 0,89$, 0 e 0 , rispettivamente). Nessuna differenza in MCV e GGT tra i gruppi.	-
Schrock <i>et al.</i> (60) 2016	Indagare la validità del PEth come marcatore diagnostico aggiuntivo per la valutazione del consumo alcolico, confrontando le concentrazioni di PEth nel sangue intero con l'EtG in segmenti di capelli prossimali di lunghezza fino a 5 cm	136 soggetti (120 M / 16 F)	hETG	Sangue intero	Il PEth potrebbe essere utilizzato come marcatore per identificare più precocemente, rispetto alla sola analisi dell'hEtG, i cambiamenti nel comportamento di consumo alcolico.	hEtG

Schrock <i>et al.</i> (61) 2017	Indagare il potenziale del PEth nel riflettere le diverse abitudini di consumo, come l'astinenza, il consumo a rischio moderato o elevato; Valutare i valori di riferimento per la creazione di un <i>database</i> delle concentrazioni di PEth 16:0/18:1 e PEth 16:0/18:2	300 soggetti (203 M / 94 F / 3 non specificato)	AUDIT-C Autodichiarazione	Sangue intero	Elevata correlazione tra i valori di PEth e le autodichiarazioni. I valori di PEth 16:0/18:1 inferiori al LOD di 10,0 ng/mL sono fortemente correlati con il consumo leggero (≤ 10 g di alcol puro/giorno) o l'astinenza. Il 95% delle persone con consumo moderato di alcol hanno concentrazioni di PEth da $< LOD$ a 112 ng/mL (PEth 16:0/18:2 da $< LOD$ a 67,0 ng/mL). Questi intervalli paiono essere indicatori ottimali per il consumo moderato (≤ 20 g/die femmine, ≤ 40 g/die maschi). Valori superiori indicano un recente consumo elevato.	-
Van Uytfanghe <i>et al.</i> (62) 2022	Quantificazione del PEth in volontari con diverse abitudini di consumo all'inizio dello studio e dopo astinenza. Approfondire l'emivita, rispetto ai dati esistenti. Valutare la possibilità di identificare l'astinenza sulla base dei risultati del PEth.	796 adulti che bevono abitualmente alcolici ma che hanno dichiarato di essersi astenuti dal consumo di alcol per 1 mese. (370 M / 426 F)	Questionario per raccogliere informazioni su: - dati demografici - AUDIT-C - consumo medio settimanale in gennaio (unità /settimana) - Diario sul consumo per il mese di febbraio (unità/giorno)	DBS	Non conclusivo per l'esistenza o meno di un'associazione tra sesso, punteggio AUDIT-C e l'emivita del PEth. Stabilire un modello di previsione per verificare le dichiarazioni di astinenza, anche quando i valori di PEth sono ancora al di sopra del limite decisionale per la coerenza con la dichiarazione di astinenza.	-

Tabella II. Principali dati estratti dagli articoli selezionati. PEth: fosfatidiletanolo; DBS: *dried blood spot*; AST: aspartato aminotransferasi; ALT: alanina aminotransferasi; GGT: γ -glutamyl transferasi; CDT: transferrina desialata; h-/u-EtG: etilglucuronide in capelli/urine ; MCV: volume corpuscolare medio; BAC: alcolemia.

Tutti i lavori inclusi erano articoli originali, di cui quattordici studi trasversali (53, 56–62, 64–69) tre studi di coorte (54, 55, 63).

La valutazione della validità di ogni manoscritto è stata effettuata utilizzando la *checklist JBI critical appraisal* per gli studi analitici caso-controllo o per gli studi di coorte (63), in base al tipo di studio. Per effettuare la valutazione di qualità dello studio, gli studi trasversali sono stati valutati sulla base di otto criteri, mentre gli studi di coorte sono stati valutati sulla base di undici criteri. Per ogni voce di qualità, "no" indica che non è stata riportata nel manoscritto, "non chiaro" indica che è stata riportata in modo inadeguato, "sì" indica che è stata riportata in modo adeguato e "non applicabile" si riferisce a quelle voci che non sono coerenti con lo studio in questione. I risultati della valutazione della qualità degli studi inclusi sono illustrati nella **Figura 6** e **Figura 7**.

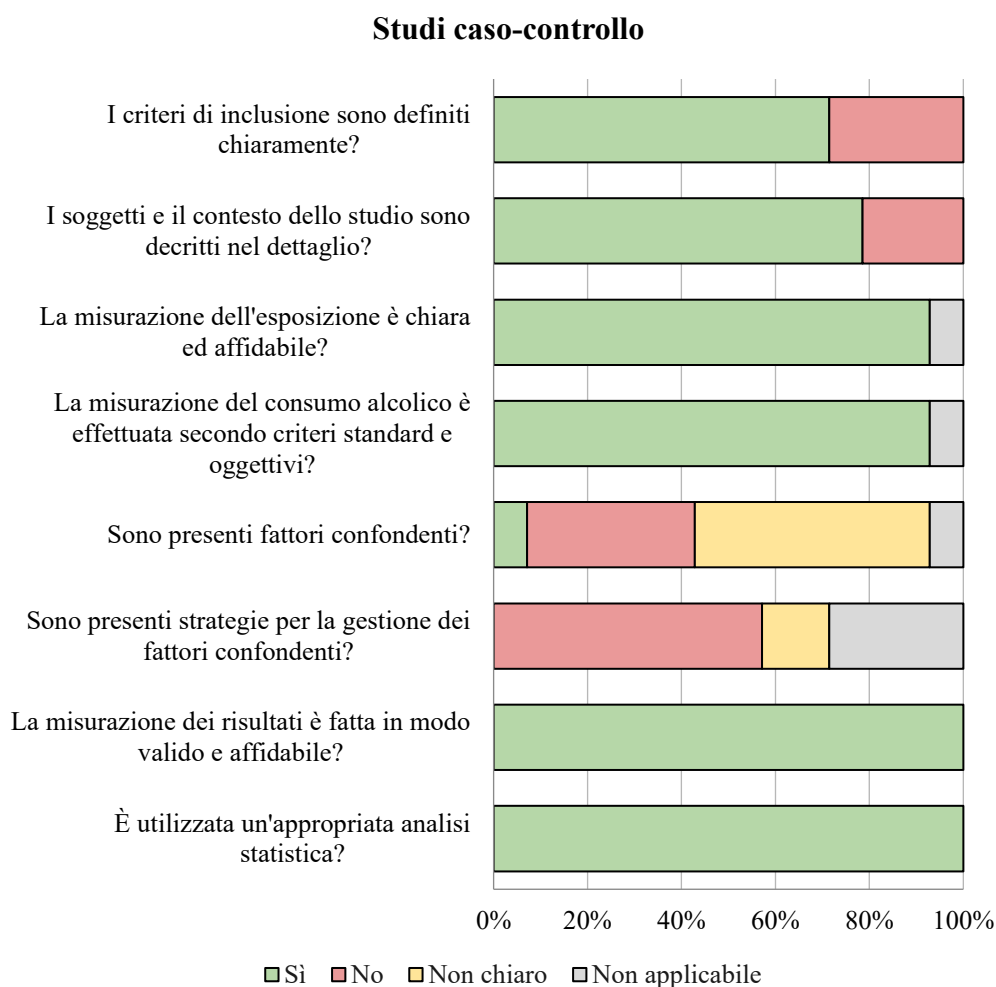


Figura 6 Risultati della *checklist JBI critical appraisal* per gli studi caso-controllo

Studi di coorte

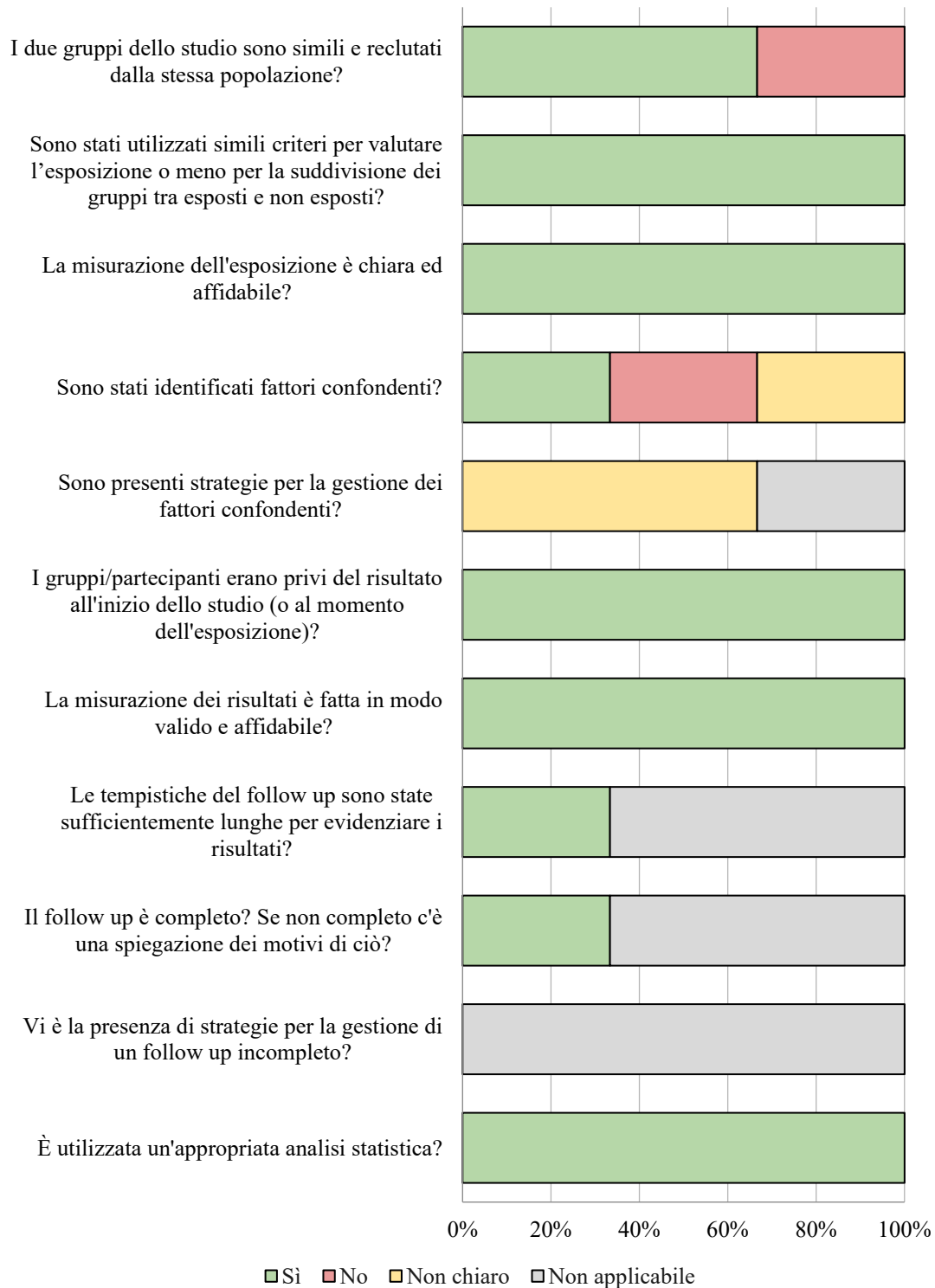


Figura 7 Risultati della *checklist JBI critical appraisal* per gli studi di coorte

DISCUSSIONE

Come già accennato, quando si parla di PEth si intende un gruppo di 48 diverse isoforme, tra queste il 16:0/18:1, 16:0/18:2 e 16:0/20:4 sono le più importanti e studiate e sono caratterizzate da un'emivita diversa l'una dall'altra (3.7-10.4 giorni, 2.7-8.5 giorni e 2.3-8.4 giorni, rispettivamente). Nella presente *review*, tutti gli articoli selezionati hanno studiato l'isoforma 16:0/18:1, sia in modo esclusivo (54–56, 58–66, 69) sia in combinazione con l'isoforma 16:0/18:2 (57, 67, 68). Fa eccezione l'articolo di Aboutara *et al.* nel quale sono state studiate, oltre alle isoforme 16:0/18:1 e 16:0/18:2, anche la 16:0/20:4, 18:0/18:1, 18:0/18:2, 18:1/18:1 (46).

Si descrivono le osservazioni derivanti dall'analisi degli articoli selezionati.

CONFRONTO TRA PEth E QUESTIONARI

In ambito clinico, e in particolare nel caso della medicina territoriale e delle cure primarie, la necessità di uno strumento di *screening* che sia poco costoso e semplice da utilizzare per identificare i soggetti con un consumo dannoso di alcol, a rischio quindi di svilupparne dipendenza, è prioritaria. Ad oggi un efficace strumento nelle mani degli operatori sanitari è l'utilizzo di questionari strutturati e validati; questi consistono in una serie di domande semplici e veloci, sia a risposta aperta che chiusa, che caratterizzano il rapporto del paziente con l'alcol e distinguono l'uso a rischio per la salute da quello non a rischio.

1. PEth VS AUDIT O AUDIT-C

Nel corso degli anni sono stati proposti diversi tipi di questionari. Questi, in base al numero di *item* esplorati, si dividono in *screening* "a singolo" o "a multipli" *item*. Tra i più importanti e più utilizzati in ambito clinico, spiccano l'*Alcohol Use Disorders Identification Test* (AUDIT) e la sua forma più breve, l'AUDIT-C.

Il primo è uno strumento ampiamente validato che permette di indagare l'abitudine all'uso di alcol di un paziente attraverso l'analisi di 10 *item*, da cui deriva un punteggio da 0 a 40, con valori di sensibilità e specificità rispettivamente di circa il 90% e l'80% (64). Il principale limite dell'AUDIT, ovvero la mancanza di praticità per la lunghezza del questionario e per il tempo richiesto (circa 2-3 minuti), sono

superati dall'AUDIT-C, che indaga solo 3 *item* con valori di sensibilità e specificità rispettivamente > 70% e di circa il 90% (65). In entrambi i casi, il raggiungimento di punteggi elevati è suggestivo della presenza di un disturbo da uso di alcol. Dei 17 studi inclusi, 11 hanno effettuato un confronto diretto tra le concentrazioni di PEth e i punteggi dell'AUDIT o dell'AUDIT-C tale da permettere di determinare le concentrazioni soglia e i valori di sensibilità e specificità del biomarcatore nell'identificazione del consumo a rischio. Quattro di questi studi hanno adottato esclusivamente l'AUDIT (53, 54, 56, 66), altrettanti l'AUDIT-C (58, 61, 63, 68) e tre entrambi i questionari (55, 57, 60).

Per quanto riguarda l'AUDIT, i diversi studi che hanno utilizzato questo questionario hanno adottato anche punteggi di *cut-off* diversi per identificare il consumo a rischio per la salute. Infatti, solo alcuni (68, 69) si sono allineati a quanto raccomandato dalla Letteratura di riferimento, utilizzando un punteggio ≥ 8 per identificare il consumo a rischio intermedio (*c.d. Hazardous drinking*), tra 16 e 19 per il rischio elevato (*c.d. Harmful drinking*) e 20 per una probabile dipendenza (66). Secondo questi *score*, nel secondo articolo citato, pubblicato nel 2017, concentrazioni di PEth ≥ 250 ng/mL su sangue intero hanno permesso di identificare un consumo a rischio (AUDIT ≥ 5 per le donne o ≥ 8 per i maschi); mentre una concentrazione *cut-off* ≥ 400 ng/mL è risultata sensibile al consumo a rischio elevato (AUDIT ≥ 13 per le donne o ≥ 16 per i maschi). In questi casi, l'area sotto la curva ROC per il PEth è stata di 0,927 (95% CI: 0,877; 0,977) per il consumo a rischio intermedio e di 0,906 (95% CI: 0,850; 0,962) per il consumo a rischio elevato come definiti dall'AUDIT, con un valore predittivo positivo (PPV) per il valore ≥ 250 ng/mL di 88,7% (95% CI: 77,5; 95,0) e un valore predittivo negativo (NPV) di 86,7% (95% CI: 74,9; 93,7). Il *cut-off* di PEth ≥ 400 ng/mL ha ottenuto risultati simili (PPV 83% e NPV 92,8%) rispetto all'AUDIT. Quattro anni dopo, lo stesso autore ha quantificato il PEth su DBS, identificando in questo caso un *cut-off* ottimale di 25 ng/mL con valori simili di AUROC (0,93 (95% CI: 0,92-0,93)), e dati elevati per quanto riguarda sensibilità (95%) e specificità (80%) nel rilevare il consumo di alcol appartenente a qualsiasi categoria di rischio, sia nella popolazione generale che nei pazienti in condizioni cliniche critiche. L'adozione, in questo lavoro più recente (47), di un *cut-off* inferiore al precedente, ha permesso un aumento della sensibilità al prezzo di un incremento del numero di falsi positivi. I risultati di entrambi gli articoli concordano nell'indicare come, in questi casi, il

punteggio dell'AUDIT è fortemente correlato ai valori di PEth e, pertanto, il marcatore potrebbe essere utilizzato a supporto del questionario clinico per rilevare il consumo di alcol a rischio intermedio ed elevato. Questa possibilità è ulteriormente avvalorata dal valore assunto dall'indice di correlazione lineare di Pearson, ovvero un coefficiente che indica la presenza di una relazione di linearità tra due variabili (più l'indice è vicino a zero, più la relazione sarà debole, più si avvicina a -1 oppure a +1 più la relazione sarà forte, e rispettivamente identificherà una correlazione negativa o positiva) (67). L'indice di Pearson assume un valore di 0,52 ($p < 0,001$) nella popolazione generale e 0,82 nella popolazione di pazienti in condizioni critiche, questo suggerisce che il biomarcatore PEth e il questionario AUDIT sono concordanti nell'identificare un consumo di alcol a rischio.

Risultati simili sono stati ottenuti da altri autori (56, 58, 63). Nel lavoro di Francis *et al.* (53) è stata riportata una forte correlazione tra il punteggio ottenuto al questionario AUDIT e le concentrazioni di PEth. In questo caso, utilizzando un *cut-off* di 0,30 $\mu\text{mol/L}$ (pari a 21 ng/mL), una percentuale compresa tra il 94% e il 100% dei soggetti con punteggio AUDIT ≥ 8 (consumo a rischio da intermedio a elevato) aveva allo stesso tempo un valore di PEth superiore al *cut-off*. Inoltre, nello stesso studio è emersa anche una concordanza pari all'89% tra positività al biomarcatore PEth ($\geq 0,01 \mu\text{mol/L}$) e l'uso autodichiarato di alcol nell'ultimo mese secondo il "the one-month Time Line Follow Back calendar" (TLFB). Anche in questo caso la correlazione positiva tra il biomarcatore e i questionari è stata dimostrata attraverso un coefficiente di correlazione, il coefficiente di correlazione di Spearman che, similmente all'indice di Pearson, misura la forza e la direzione della relazione tra i ranghi di due variabili quantitative oppure qualitative ordinali (67). Nell'articolo viene individuato un coefficiente di correlazione tra la concentrazione del PEth e il punteggio ottenuto all'AUDIT pari a 0,48, leggermente inferiore rispetto a quanto riscontrato in altri lavori. Una spiegazione che potrebbe essere fornita circa il risultato ottenuto è legata alla bassa specificità del *cut-off* scelto (67%-95%), a fronte di una sensibilità nettamente maggiore (94%-100%). Questo suggerisce che il valore di *cut-off* potrebbe essere leggermente alzato al fine di migliorare la specificità e, di conseguenza, anche la correlazione con il questionario.

Anche nell'articolo di Kuteesa *et al.* (57), considerando la sola isoforma di PEth 16:0/18:1 con un *cut-off* $\geq 20 \text{ ng/mL}$ considerato come indicativo di un consumo di alcol di qualsiasi entità e $\geq 210 \text{ ng/mL}$ come consumo a rischio intermedio, è

stata dimostrata una correlazione sia con l'AUDIT a 30 giorni che a 12 mesi, se con punteggio ≥ 8 .

Lo studio di Jorgenrud *et al.* (55) ha adottato una forma ridotta dell'AUDIT, ovvero l'AUDIT-QF, che considera solo due degli *item* dell'AUDIT, ovverosia la quantità e la frequenza del consumo, valutando le prestazioni del PEth quantificato su sangue intero. In questo caso, è stato preso in considerazione come indicativo di un consumo a rischio elevato un punteggio ≥ 4 nelle donne e ≥ 5 negli uomini. Suddividendo le due popolazioni studiate (norvegesi e russi), il *cut-off* ottimale individuato è risultato pari a 0,128 $\mu\text{mol/L}$ nei norvegesi (AUROC: 0,633) e 0,270 $\mu\text{mol/L}$ nei russi (AUROC: 0,685), pari rispettivamente a circa 90 ng/mL e 190 ng/mL. Tuttavia, risalendo alla quantità di alcol consumata a partire dai risultati ottenuti di AUDIT-QF e considerando un *drink standard* medio come pari a 12,8 g di alcol puro e come a rischio elevato l'ingestione > 350 g/settimana, l'AUROC del PEth e i rispettivi *cut-point* ottimali sono diventati 0,327 $\mu\text{mol/L}$ per i norvegesi (AUROC: 0,856) e 0,396 $\mu\text{mol/L}$ per i russi (AUROC: 0,746), pari a 230 ng/mL e 280 ng/mL, rispettivamente.

Per quanto riguarda l'AUDIT-C, ove nella Letteratura internazionale si identificano diversi punteggi di *cut-off* per l'identificazione del consumo a rischio rispetto a quanto detto per l'AUDIT (*i.e. rischio moderato*: 4-5 punti negli uomini e 3-5 nelle donne; *rischio alto*: 6-7 punti in entrambi i sessi; *rischio severo/abuso*: ≥ 8 punti) i risultati ottenuti dagli studi condotti hanno riportato conclusioni simili.

Gerbase *et al.* (54), utilizzando i punteggi suddetti per identificare il consumo a rischio, ha riportato una correlazione statisticamente significativa tra i valori di PEth e il punteggio ottenuto sull'AUDIT-C (r di Spearman = 0,654; $p < 0,001$). In questa popolazione, il PEth è risultato positivo ($> 18,3$ ng/mL) nel 73,4% dei pazienti con consumo a rischio, a seconda della classe di appartenenza, con una correlazione significativa ($p < 0,001$), coefficiente Kappa di 0,490 (95% CI: 0,373-0,607) tra le due variabili. Utilizzando il *cut-off* di PEth misurato a livello ematico di 23,9 ng/mL, lo stesso è risultato positivo nel 91,2% dei pazienti classificati come a rischio elevato secondo l'AUDIT-C (punteggio ≥ 6), con un Kappa di 0,463 (95% CI 0,344-0,582 CI; $p < 0,001$).

Nello studio di Kechagias *et al.* (56), sono stati valutati diversi *cut-off* di PEth (misurato su sangue intero) per distinguere tra consumo di alcol appartenente alla categoria di rischio moderato secondo l'AUDIT-C e astinenti in una popolazione

che assumeva una quantità definita di alcol stabilita dallo studio (16 g/die per le donne e 32g/die per gli uomini, entrambi per tre mesi). Con un *cut-off* di 0,006 $\mu\text{mol/L}$ (4,2 ng/mL) la sensibilità era del 100% e la specificità del 78%; alzando il *cut-off* a 0,009 $\mu\text{mol/L}$ (6,3 ng/mL) la specificità aumentava (83%) a scapito della sensibilità (84%); infine, adottando il valore di 0,04 $\mu\text{mol/L}$ (28 ng/mL) la sensibilità era molto bassa (28%), ma la specificità era del 100%. Interessante è notare come, nello stesso studio, dopo tre mesi di *intake* controllato di alcol non siano state osservate concentrazioni di PEth differenti in maniera statisticamente significativa rispetto al valore di *baseline* misurato all'inizio dello stesso (rispettivamente 0,022 $\mu\text{mol/L}$ al termine dello studio vs 0,018 $\mu\text{mol/L}$ all'inizio). La spiegazione fornita a questo proposito è stata che i soggetti assumevano già alcol prima di essere arruolati nello studio, sebbene comunque in quantità limitate, inferiori ad un consumo a rischio elevato, motivo per cui la differenza tra inizio e fine dello stesso non è stata particolarmente significativa.

Di particolare rilevanza è lo studio di Schrock *et al.* (61), che ha identificato possibili valori soglia di PEth per gli omologhi 16:0/18:1 e 16:0/18:2 tali da consentire l'identificazione di diverse abitudini di consumo, stimate dall'AUDIT-C (in questo caso un punteggio AUDIT-C di 0 identificava l'astinenza, 1-4 per gli uomini e 1-3 per le donne il consumo a rischio moderato, e ≥ 5 per gli uomini e ≥ 4 per le donne il consumo a rischio elevato). Anche in questo caso, le concentrazioni di PEth si sono dimostrate significativamente correlate con il consumo stimato dall'AUDIT-C ($r < 0,65$); inoltre, nei volontari che hanno dichiarato l'astinenza (4,0% dei 300 soggetti studiati, con punteggio AUDIT-C: 0) non è stato possibile rilevare PEth nel loro sangue. Tuttavia, alcuni volontari classificati come "*bevitori a rischio elevato*" sono risultati PEth negativi. Nel gruppo classificato come "*bevitori a rischio moderato*" (punteggio AUDIT-C: 1-3 (donne) e 1-4 (uomini)), il 95% dei soggetti esaminati presentava PEth 16:0/18:1 al di sotto del valore 112 ng/mL e PEth 16:0/18:2 entro 67,0 ng/mL. Considerando questi risultati, gli autori hanno proposto un *cut-off* per l'isoforma 16:0/18:1 di 112 ng/mL (specificità: 96,6%; sensibilità: 22,9%) e per l'isoforma 16:0/18:2 di 67 ng/mL (specificità: 96,6%; sensibilità: 22,1%). Similmente a quanto osservato da altri studi, la correlazione positiva e statisticamente significativa esistente tra PEth e AUDIT-C è stata dimostrata dal valore assunto dal coefficiente di Spearman, pari a 0,68 per l'isoforma 16:0/18:1 e 0,65 per l'isoforma 16:0/18:2.

Utilizzando un punteggio AUDIT-C ≥ 6 per identificare un consumo a rischio elevato di alcol in una popolazione di 202 giovani di età compresa tra i 18 e 24 anni, il lavoro di Francis *et al.* (53) ha riscontrato una forte correlazione tra il punteggio AUDIT-C e i valori di PEth. Utilizzando un *cut-off* di 0,30 $\mu\text{mol/L}$ (pari a 21 ng/mL), il 94%-100% dei soggetti è risultato positivo al PEth, dimostrando una significativa associazione tra la positività al PEth e il consumo di alcol nell'ultimo mese.

L'articolo di Couture *et al.* (51), utilizzando un *cut-off* di AUDIT-C ≥ 3 per le donne e ≥ 4 per gli uomini per definire il "*consumo di alcol a rischio elevato*", ha individuato che, tra le donne, il 95% di coloro che presentava una positività al PEth (con un valore di *cut-off* di 50 ng/mL) riferiva anche un consumo di alcol stimabile come a rischio elevato. Tra gli uomini, il 57,1% dei soggetti positivi al PEth ha riferito un consumo di alcol a rischio elevato. Tuttavia, nello stesso studio, considerando i soggetti con PEth negativo (< 50 ng/mL) il "*consumo a rischio elevato*" stimato dall'AUDIT-C era del 70,0% per le donne e del 39,7% per gli uomini.

Gli studi di Afshar *et al.* (48) e Cherrier *et al.* (50) sono giunti a conclusioni simili a quanto detto per il questionario AUDIT anche per quanto riguarda l'AUDIT-C. Inoltre, nel lavoro di Cherrier *et al.* (50) è stato osservato che il valore medio di PEth totale del gruppo di soggetti di mezz'età con un'assunzione di alcol a rischio tendeva ad essere più alto rispetto a quello di soggetti più anziani, sempre classificati come bevitori a rischio (differenza media di 0,55 μM , $p < 0,05$), interpretando questa differenza sulla base del disuguale numero assoluto di bevande consumate nel mese precedente dai due gruppi, che erano significativamente diverse e linearmente correlate alle concentrazioni di PEth rilevate.

La stessa correlazione tra punteggi dei questionari AUDIT/AUDIT-C e concentrazioni di PEth su DBS è stata osservata da Piano *et al.* (59), dimostrando che questi punteggi erano più elevati nei *binge drinkers*, non solo rispetto agli astemi, ma anche rispetto ai bevitori a rischio basso-moderato.

Come risultato di quanto sopraddetto, tutti gli studi inclusi in questa revisione hanno dimostrato un'eccellente correlazione tra i punteggi ottenuti nei questionari AUDIT e AUDIT-C e il valore di PEth misurato, nozione questa già nota in Letteratura. Purtroppo, però, non tutti gli studi inclusi hanno adottato gli stessi valori di *cut-off* per i questionari e nemmeno la stessa matrice per la quantificazione del PEth,

misurato infatti sia su sangue intero che su DBS, rendendo complessa un'opera di confronto ed armonizzazione dei risultati ottenuti.

Tuttavia, dividendo gli studi in base alla matrice utilizzata, considerando il punteggio sulla base di AUDIT ≥ 5 nelle femmine e ≥ 8 nei maschi per definire il consumo di alcol come elevato, come peraltro raccomandato in Letteratura, il *cut-off* ottimale individuato su sangue intero è stato di 250 ng/mL, per il quale il PPV è dell'88,7% e il NPV dell'86,7% (48). È interessante notare che simili risultati sono stati ottenuti utilizzando AUDIT-QF (55), indicativo della validità del *cut-off* identificato. In quest'ultimo caso, la conversione dei risultati dell'AUDIT-QF in grammi di alcol consumati settimanalmente ha determinato un aumento dei valori di AUROC con un incremento anche dei valori di *cut-off* ottimali. Questa operazione di conversione, sebbene inevitabilmente imprecisa, se eseguita in altri studi permetterebbe di confermare o smentire il miglioramento dei valori di AUROC del PEth e, di conseguenza, di identificare *cut-point* validabili.

Anche da Afshar *et al.* sono state studiate le prestazioni del PEth su DBS utilizzando gli stessi *cut-off* per quanto concerne l'AUDIT. In questo caso, la concentrazione ottimale di PEth per identificare il consumo a rischio è stata identificata in 25 ng/mL, con percentuali di PPV e NPV rispettivamente del 68,5% e del 97,1% (47). È interessante notare che, anche utilizzando punteggi di AUDIT più elevati (≥ 8 per entrambi i sessi), i valori di *cut-off* ottimali non sembrano variare, rimanendo intorno a 20-21 ng/mL (54, 57). Pertanto, gli studi esaminati sembrano concordare nel raccomandare un *cut-off* tra 20 e 25 ng/mL per identificare il consumo di alcol come "a rischio" valutato secondo l'AUDIT. Tuttavia, mancando ampi studi volti a valutare specificamente questo *cut-off* nell'identificazione di un consumo a rischio, non è possibile giungere ad una conclusione definitiva.

Considerazioni analoghe possono essere fatte per l'AUDIT-C. Infatti, gli studi presi in considerazione da questo lavoro hanno evidenziato, anche in questo caso, una stretta correlazione tra i punteggi ottenuti nel questionario e i valori di PEth misurati, con una "r" che oscilla tra 0,654 (54) e $> 0,65$ (61), individuando così una correlazione positiva tra i valori di PEth e AUDIT-C (51). Lo studio di Kechagias *et al.* (56), utilizzando un disegno di studio randomizzato che prevedeva l'assunzione di un'unità di alcol al giorno nelle donne e di due negli uomini, considerando però un'unità di alcol come 16 g di alcol puro, superiore alle disposizioni dell'OMS e quindi coerente con un consumo a rischio nelle donne e

negli uomini, ha evidenziato la possibilità di utilizzare un *cut-off* ottimale di 6,3 ng/mL (sensibilità 84% e specificità 83%) nell'identificazione di quest'ultimi (rispetto a un gruppo di controllo di astemi). Questo valore, misurato su sangue intero, è compatibile con quello ottenuto negli altri studi citati (come in quello di Francis *et al.* (53), dove però si è utilizzato un punteggio AUDIT-C > 5 per identificare l'abuso di alcol), essendo un valore di *cut-off* utilizzato per differenziare gli astemi dai bevitori con consumo a elevato rischio per la salute. In effetti, da parte di Schrock *et al.* (61) è stato proposto un *cut-off* di 112 ng/mL per il PEth 16:0/18:1 e di 67,0 ng/mL per il PEth 16:0/18:2 per discriminare tra "bevitori a rischio basso-moderato" (cioè, con punteggio AUDIT-C < 4 nelle donne e < 5 negli uomini) e "bevitori a rischio elevato", con valori di sensibilità e specificità rispettivamente del 22,9% e del 96,6% per l'isoforma 16:0/18:1 e del 22,1% e del 96,6% per l'isoforma 16:0/18:2. Questi valori sono simili a quelli ottenuti da Francis *et al.* (53), che ha peraltro adottato lo stesso punteggio di AUDIT-C > 5 e a quelli di Kechagias *et al.* (56) quando si è considerato un *cut-off* di 28 ng/mL (28% di sensibilità e 100% di specificità), suggerendo che anche valori più bassi potrebbero essere applicati con un'eccellente specificità. Infatti, l'articolo di Couture *et al.* (51), utilizzando come *cut-off* per AUDIT-C ≥ 3 per le donne e ≥ 4 per gli uomini per definire il "consumo a rischio", ha documentato che un valore di *cut-off* di 50 ng/mL su sangue intero fornisce un PPV del 79,41% e NPV del 47,95%.

Alla luce di quanto detto, il PEth risulta essere un marcatore dotato di un'ampia concordanza sia con l'AUDIT che con l'AUDIT-C, ovvero i due principali questionari d'uso clinico. Tuttavia, sono necessari altri studi condotti su una popolazione generale per consentire l'identificazione di un valore di *cut-off* che possa essere correlato con i punteggi considerati evocativi di un consumo dannoso di alcol. Gli studi analizzati finora sembrano suggerire che questo valore possa essere posizionato tra 20-25 ng/mL su DBS e 30-100 ng/mL se considerato su sangue intero.

Degna di nota è la decisione di alcuni articoli di adottare in primo luogo i *cut-off* raccomandati dalla Letteratura per l'identificazione di consumo elevato di alcol, cioè 210 ng/mL (68), per poi individuare valori di *cut-off* con maggiore sensibilità e specificità. In particolare, nello studio di Schrock *et al.* (61) il *cut-point* inizialmente individuato per il consumo di alcol a rischio ha mostrato valori di sensibilità e specificità (rispettivamente 58,8% e 98,8%) inferiori a quelli da loro

individuati (sensibilità del 70,6% e specificità del 98,8%) nel momento in cui è stato adottato un *cut-off* pari a 150 ng/mL. Anche in Baggio *et al.* (49) il *cut-off* pari a 210 ng/mL si è dimostrato poco performante nell'identificare il consumo a rischio elevato (sensibilità 53,25% e specificità 61,69%) se confrontato con il questionario diagnostico per gli studi genetici (*Diagnostic Interview for Genetic Studies - DIGS, gold standard* nell'articolo), concludendo per una maggiore sensibilità data da un *cut-off* di 90 ng/mL (pari all'83,1%) a scapito della specificità (pari al 39,6%). Sottolineiamo quindi, l'incertezza ancora attuale sui valori di *cut-off* interpretativi, in quanto quelli proposti attualmente non hanno dimostrato di avere valori ottimali di sensibilità e specificità in tutti gli studi inclusi.

2. PEth VS ALCOHOL TIMELINE FOLLOW-BACK (TLFB)

L'*Alcohol Timeline Follow-Back* (TLFB) consente di ottenere una stima del consumo giornaliero di alcol in un determinato periodo di tempo (fino a un massimo di 12 mesi) a partire dalla data dell'intervista, utilizzando un calendario ed eventualmente strategie mnemoniche (ad esempio, date-chiave come punti di riferimento o conversione della quantità di alcol in bevande standard, ecc.). È stato dimostrato che l'*Alcohol* TLFB individua caratteristiche psicometriche in un'ampia varietà di gruppi di bevitori e può fornire numerose informazioni circa il consumo di alcol di un soggetto (ad esempio, modalità, variabilità ed entità del consumo) (76, 77). Tra gli articoli selezionati, due (58, 61) hanno utilizzato il TLFB per valutare il consumo di alcol, ottenendo risultati parzialmente incoraggianti. Infatti, lo studio di Francis *et al.* (53) ha dimostrato esserci una correlazione significativa tra il punteggio TLFB e la concentrazione di PEth per quanto riguarda "*Assunzione totale di alcol*" ($r = 0,55$), "*Bevande totali in un'occasione*" ($r = 0,56$) e "*Uso episodico pesante*" (≥ 6 bevande) ($r = 0,51$). Purtroppo, in quello di Kuteesa *et al.* (57), pur utilizzando il TLFB per stimare il consumo di alcol in una popolazione di giovani adulti, sono stati confrontati i risultati esclusivamente con l'AUDIT riferito a 30 giorni e 12 mesi. Tuttavia, nello studio è stata trovata una correlazione statisticamente significativa sia tra i punteggi dell'AUDIT e le concentrazioni di PEth (con *cut-off* di 20 ng/mL per l'uso di alcol e 210 ng/mL per il consumo a rischio elevato), sia tra l'AUDIT e il TLFB.

3. PEth VS QUESTIONARIO M.I.N.I.

Il *Mini-International Neuropsychiatric Interview* (M.I.N.I.) è un breve questionario diagnostico semi-strutturato (tempo di somministrazione di circa 15 minuti), sviluppato congiuntamente da psichiatri e clinici negli Stati Uniti e in Europa, per i disturbi psichiatrici del DSM-IV e dell'ICD-10. Secondo il DSM-IV, questo rappresenta il *gold standard* per la diagnosi dei principali disturbi psichiatrici, compreso il disturbo da uso di sostanze. Questa intervista, adattata dal DSM-V, è ancora oggi ampiamente utilizzata nella pratica clinica (71). Lo studio di Francis *et al.* (52) ha applicato la sezione dedicata alla dipendenza da alcol del M.I.N.I. su 202 bevitori del Nord della Tanzania, di età compresa tra i 18 e i 24 anni (103 lavoratori occasionali maschi e 99 studenti) e l'ha convalidata rispetto al fosfatidiletanolo (PEth) utilizzando un *cut-off* che suggerisce un forte consumo cronico di alcol ($\geq 0,30 \mu\text{mol/L}$). In questo studio, i criteri di dipendenza del M.I.N.I. (≥ 3 risposte positive) sono stati soddisfatti dal 39% dei partecipanti, nonostante i loro livelli di PEth fossero bassi. La sensibilità del M.I.N.I. variava dallo 0% al 69% (studenti e lavoratori, rispettivamente) e la specificità dal 52% all'85% (lavoratori e studenti, rispettivamente). L'AUROC più alto (0,68) si è evidenziato con l'utilizzo di un *cut-off* di risposte positive ≥ 4 . Tuttavia, nel presente studio il PEth, per cui è stato adottato un *cut-off* di $0,30 \mu\text{mol/L}$, si è dimostrato più sensibile e specifico rispetto al questionario nell'identificare il consumo a rischio elevato di alcol nella popolazione selezionata. Lo studio, pertanto, suggerisce una migliore *performance* del biomarcatore rispetto all'intervista strutturata del M.I.N.I.

CONFRONTO TRA PEth E ALTRI BIOMARCATORI

I biomarcatori sono "qualsiasi sostanza, struttura o processo che possa essere misurato nell'organismo o nei suoi prodotti e influenzare o prevedere l'incidenza di un esito o di una malattia" (72). Nel contesto dell'abuso di alcol, sono indicatori accurati dell'assunzione della sostanza da parte del paziente, della tipologia di consumo o di qualsiasi predisposizione all'abuso e alla dipendenza. Tradizionalmente, i biomarcatori di abuso alcolico si dividono tra biomarcatori indiretti, quindi legati al danno d'organo e/o ai cambiamenti fisiopatologici dell'organismo che si verificano in seguito all'uso di alcol, e biomarcatori diretti, molecole che in presenza di un'assunzione acuta o cronica di alcol vengono prodotte

o vanno incontro a cambiamenti specifici. I primi includono l'aspartato aminotransferasi (AST), la transferrina desialata (CDT), il volume corpuscolare eritrocitario medio (MCV), l'alanina aminotransferasi (ALT) e la γ -glutamyl transferasi (GGT), mentre i secondi comprendono la concentrazione di alcol nel sangue (BAC), l'etilglucuronide (EtG), l'estere etilico degli acidi grassi (FAEE) e il PEth (80, 81).

Tutti i biomarcatori hanno un determinato valore di sensibilità e specificità. Questi, dal punto di vista clinico, indicano il primo la capacità del marcatore di individuare i soggetti realmente malati, ovvero l'essere positivo in presenza di malattia, e il secondo, la capacità di escludere la malattia in pazienti sani (75). Traslando queste nozioni nel contesto dell'abuso alcolico, possiamo dire che il marcatore sarà tanto più sensibile quanto più è positivo in presenza di abuso e tanto più specifico quanto più la sua positività è legata esclusivamente all'uso di alcol a rischio per la salute.

Il PEth si è già dimostrato un biomarcatore in grado di differenziare la presenza di abuso cronico di alcol, *i.e.* un'assunzione abituale di oltre 60 g di alcol al giorno in media, dall'assenza di quest'ultimo, mostrando una differenza statisticamente significativa nelle concentrazioni ematiche tra le due popolazioni (32).

Tuttavia, se si considera quest'ultima categoria (ovvero dell'uso-non abuso), ad oggi non sono state ancora identificate delle concentrazioni soglia definite per distinguere tra astensione, consumo sociale e consumo a rischio e, allo stesso modo, non sono stati condotti studi di grandi dimensioni mirati a confrontare i valori di sensibilità e specificità del PEth con quelli di altri biomarcatori utilizzati nella popolazione generale.

1. PEth VS ALT, AST E GGT

L'aspartato aminotransferasi (AST), l'alanina aminotransferasi (ALT) e la γ -glutamyltransferasi (GGT) sono tre enzimi epatici ampiamente utilizzati in ambito clinico come marcatori di danno epatico. Tuttavia, questi sono biomarcatori dotati di scarsa sensibilità e specificità se considerati in relazione al danno epatico alcol-correlato. ALT e AST, infatti, risultano elevati in presenza di danno d'organo di qualsiasi natura e anche nei casi riguardanti organi diversi dal fegato, trovandosi anche nel cuore, nel muscolo, nel rene e nel cervello. La GGT, invece, pur essendo un enzima più specifico, essendo presente negli epatociti, nei colangiociti e in altre cellule coinvolte nella produzione di bile, non è sempre elevata nei bevitori e non

permette comunque di discriminare tra le patologie d'organo legate all'alcol e quelle attribuibili ad altre cause. In particolare, l'AST ha una sensibilità che varia dal 25% al 60% e una specificità del 47-68%, l'ALT rispettivamente del 15-40% e del 50-57%, infine la GGT del 37-95% e del 18-93% (74). Dato l'ampio utilizzo di questi marcatori in ambito clinico, sono numerosi gli studi che hanno effettuato un confronto tra questi e il PEth per valutare la loro capacità di differenziare il consumo a rischio elevato dalle altre modalità di consumo. Nel complesso, gli articoli selezionati in questa revisione concordano sul fatto che il PEth abbia una sensibilità e una specificità maggiori rispetto ai marcatori di danno epatico, sia quando considerati da soli che combinati tra loro (53, 57, 63, 65). Nello studio di Kechagias *et al.* (56) vi è stata la randomizzazione di 44 persone in due gruppi, definiti all'inizio dello studio "astemi" e "soggetti con un consumo a rischio moderato/elevato". Al primo gruppo è stato chiesto di evitare qualsiasi tipo di assunzione di alcol per tre mesi, mentre al secondo è stato chiesto di consumare quotidianamente 150 mL di vino rosso (fornito dagli organizzatori dello studio) alle donne e 300 mL agli uomini, pari a 16,0 g di alcol per le donne e 32,0 g per gli uomini. Dopo tre mesi, hanno osservato che, rispetto al valore basale non diverso tra i due gruppi, i livelli di PEth erano significativamente ridotti nel primo gruppo (astenuti) e rilevabili, ma ben al di sotto dei limiti (*cut-off* di 0,30 $\mu\text{mol/L}$ (equivalente a 210 ng/mL)), in tutti i soggetti che avevano consumato vino rosso. In entrambi i casi, i valori di ALT e AST non erano cambiati o comunque rientravano nei valori limite e non erano correlati al consumo di alcol. Confrontando poi i valori della curva ROC dei diversi biomarcatori allo scopo di distinguere tra astenuti e consumatori di alcol, ALT, AST e GGT hanno mostrato valori significativamente più bassi (0,61, 0,56 e 0,54, rispettivamente) rispetto al PEth (0,92). A dimostrazione di ciò è stata studiata la correlazione tra i risultati ottenuti dalle risposte al questionario AUDIT, somministrato ai soggetti prima dello studio, e i livelli dei biomarcatori. È risultato evidente come il PEth correli molto meglio con quanto dichiarato dai pazienti in esame (coefficiente di Spearman: 0,56), rispetto a quanto avvenga con i marcatori di danno epatico (AST: 0,18; ALT: 0,05; GGT: 0,05).

Risultati simili sono stati ottenuti da Lowery *et al.* (58), nel cui lavoro è stato scelto un *cut-off* di 84 ng/mL per discriminare l'abuso di alcol in soggetti deceduti donatori di organi (come definito dal *Center for Disease Control and Prevention* - CDC). In

questo caso, il PEth sottende un'area sotto la curva ROC di 0,89 (95% CI: 0,80-0,98) se considerato come valore continuo e di 0,86 (95% CI: 0,76-0,94) se considerato come valore dicotomizzato (≥ 84 ng/mL *vs* < 84 ng/mL), mentre altri biomarcatori hanno ottenuto risultati nettamente peggiori (ALT: AUROC = 0,5695 ($p < 0,001$), AST: 0,6225 ($p < 0,001$), AST:ALT 0,6932 ($p = 0,007$), GGT: 0,6319 ($p < 0,001$)).

Anche da Piano *et al.* (59) sono stati confermati questi risultati valutando i livelli di PEth in una popolazione di giovani adulti, in cui però bisogna considerare la bassa sensibilità riportata dai valori di transaminasi e GGT (14). In questo caso, è stata attuata una distinzione tra astemi, bevitori moderati (MOD, consumo dichiarato avente mediana di 45 g di alcol (media di 58 g) a settimana) e *binge drinkers*. I risultati hanno mostrato che il PEth era significativamente più alto nei MOD rispetto agli astemi, mentre i valori di GGT non differivano tra le due popolazioni. Particolarmente interessante è lo studio di Afshar *et al.* (47), che ha esaminato una popolazione "caso" di 251 pazienti, di cui 80 con un consumo a rischio elevato (secondo i punteggi AUDIT), e una popolazione "controllo" di 60 pazienti, di cui 23 con un consumo alcolico a rischio elevato. Sebbene i risultati indichino che i valori medi di GGT risultano aumentati nei pazienti con consumo a rischio elevato, il PEth, con un *cut-off* di 25 ng/mL, ha dimostrato sensibilità e specificità del 95% (95% CI: 88.0% - 99.0%) e 80.0% (95% CI: 73.0% - 85.0%), PPV di 68.5% (95% CI: 65.2% - 77.3%) e NPV di 87.1% (95% CI: 93.3% - 99.0%), con 4 (1,6%) falsi negativi e 35 (13,9%) falsi positivi, di cui 20 (57,2%) con BAC $< 0,8$ mg/dL. L'AUROC del PEth è 0,93 (95% CI: 0,90-0,96) e la sua combinazione con GGT (isolato o associato anche con CDT e BAC) non ha portato a un miglioramento delle prestazioni.

Dunque, nel complesso gli studi selezionati hanno mostrato, seppur anche in questo caso in assenza di un *cut-off* definito e univoco tra le diverse pubblicazioni, una maggiore sensibilità e specificità del biomarcatore PEth rispetto a AST, ALT e GGT se quantificato in popolazioni generali.

2. PEth VS CDT

La transferrina desialata (CDT) è una forma della glicoproteina transferrina, responsabile del trasporto del ferro nel sangue, carente di acido sialico. Infatti, normalmente la transferrina contiene da quattro a sei molecole di acido sialico, che

si riducono di numero nei forti bevitori. Di conseguenza, quest'ultimi presentano livelli maggiori di CDT (espressi in percentuale rispetto alla transferrina totale) rispetto ai non bevitori. Perché ciò si verifichi, tuttavia, è necessaria un'assunzione > 50-80 g di etanolo al giorno per almeno 1 o 2 settimane, rendendo la CDT un biomarcatore specifico ma non molto sensibile (49-90% e 70-100%, rispettivamente). Inoltre, è necessario sottolineare che i soggetti aventi un consumo moderato o episodico mostrano livelli di CDT all'interno del *range* di normalità e possono presentarsi falsi positivi a causa di rare varianti genetiche, gravidanza, stati patologici. Infine, sono necessarie 2-3 settimane di astinenza perché la CDT rientri nel *range* normale (76).

Nel lavoro di Aboutara *et al.* (46) è stata studiata la validità di diversi biomarcatori alcolici, sia diretti che indiretti, rispetto a sei omologhi del PEth, analizzati su DBS, in 228 pazienti affetti da patologie epatiche. I soggetti hanno fornito autodichiarazioni circa il loro consumo di alcol nei tre mesi precedenti, nelle ultime quattro settimane e nell'ultima settimana, utilizzando un questionario basato su AUDIT, opportunamente adattato. Gli autori hanno considerato come positiva l'assunzione di almeno 24 g di alcol a settimana (2 *drink standard*) ed a rischio elevato un consumo di 84 g a settimana (7 *drink standard*). In seguito, sono stati calcolati i dati relativi a specificità e sensibilità nel discriminare tra i diversi *pattern* di consumo. Sessantatré (n = 63) pazienti sono risultati positivi al PEth 16:0/18:1 (≥ 10 ng/mL) e tutti questi hanno ammesso di aver consumato alcol nei tre mesi precedenti. La specificità si è dimostrata essere del 100% e la sensibilità del 53% per un consumo ≥ 24 g/settimana negli ultimi 3 mesi e, rispettivamente, del 98% e 58% per le ultime quattro settimane. Tuttavia, se si considerano i pazienti che hanno bevuto almeno 84 g di alcol a settimana (7 *drink standard*), la sensibilità e la specificità del PEth 16:0/18:1 sono rispettivamente del 92% e dell'89%, con un AUROC di 0,93, sempre mantenendo un valore di *cut-off* di 10 ng/mL. Suddividendo quindi i pazienti in diverse classi in base alla quantità di alcol consumata nelle precedenti quattro settimane (ovverosia 24-144 g/settimana (2-12 *drink standard*), 156-336 g/settimana (13-28 *drink standard*) e oltre 336 g/settimana (> 50 g/die)) è stata dimostrata una correlazione positiva tra la concentrazione del marcatore e il quantitativo di etanolo assunto dichiarato ($p < 0.001$). Adottando un *cut-off* di 20 ng/mL e di 35 ng/mL, i valori di sensibilità e specificità nel rilevare un consumo a rischio elevato (> 84 g/settimana) sono

risultati essere rispettivamente del 74%-95% e del 96%-53%. È interessante notare che in entrambi i gruppi di pazienti in cui era sospettabile il consumo di quantità di alcol “*a rischio*” sulla base dei valori di CDT, ovvero sia nei pazienti positivi alla CDT (3 soggetti con CDT > 2%) che in quelli con valori di CDT compresi tra 1,7 e 2,0% (2 soggetti), il PEth è risultato positivo (183-473 ng/mL e 221-1141 ng/mL rispettivamente). Tuttavia, esaminando i pazienti che hanno dichiarato un consumo a rischio elevato di alcol (350 g/settimana, 10 pazienti), sia il PEth 16:0/18:1 che il 16:0/18:2 sono risultati positivi in tutti i casi, mentre la CDT è risultata negativa in tutti (< 2,0%), dimostrando che l'uso della CDT non ha alcuna utilità aggiuntiva nell'individuare il consumo di alcol, in quanto non è mai risultata positiva in assenza di una concomitante positività del PEth.

Queste conclusioni sono simili a quelle di altri studi selezionati (62, 68, 70), infatti da parte di Afshar *et al.* (47) è stato verificato che il PEth da solo, con un *cut-point* ottimale di 25 ng/mL, presenta un'AUROC di 0,93 (95% CI: 0,92-0,93) nel centro di controllo interno, con una sensibilità del 95% e una specificità dell'80%. Nel centro di controllo esterno, la sensibilità e la specificità, utilizzando lo stesso *cut-off*, erano rispettivamente del 76,0% (95% CI: 53,0%-92,0%) e del 73,0% (95% CI: 56,0%-86,0%). In entrambi i casi, non vi è stato alcun miglioramento utilizzando il PEth in combinazione con altri biomarcatori (CDT incluso). Similmente, nell'articolo di Kechagias *et al.* (56), la combinazione di PEth con la CDT ha permesso di ottenere un AUROC di 0,94, non dissimile in maniera statisticamente significativa rispetto a quella calcolata per il solo PEth (0,92) e senza peraltro miglioramenti significativi in termini di sensibilità e specificità.

Infine, da Lowery *et al.* (58) è stato dimostrato che, nel loro studio, il PEth presentava un'area sotto la curva ROC di 0,89 (95% CI: 0,80-0,98) con un *cut-off* \geq 84 ng/mL che forniva una discriminazione ottimale per l'identificazione del consumo di alcol a rischio elevato (media > 1 *drink*/giorno o \geq 4 *drink* in una singola occasione in un mese per le donne; > 2 *drink*/giorno o \geq 5 *drink* in un'occasione in un mese per gli uomini) con una sensibilità del 75% (95% CI: 52,9%-89,4%), una specificità del 97% (95% CI: 91%-99%), un valore predittivo positivo dell'82% (95% CI: 59%-94%) e un valore predittivo negativo del 95% (95% CI: 89%-98%). La capacità del PEth nel discriminare tra consumo moderato ed elevato di alcol è risultata superiore a quella di tutti gli altri biomarcatori studiati, compresa la CDT.

3. PEth VS MCV

Come noto, il volume corpuscolare medio (MCV), un valore che indica il volume medio dei globuli rossi, aumenta negli etilisti cronici, superando i *range* fisiologici della popolazione generale. Questo innalzamento, che non mostra però un'eccellente sensibilità e specificità (40-50% e 80-90%, rispettivamente) per il consumo di alcol classificabile come “*a rischio elevato*” (32), permane per diversi mesi anche durante l'astinenza, rendendo questo marcatore poco utile nel momento in cui si volesse monitorare, ad esempio, l'adesione di un paziente a un programma di disintossicazione o di astinenza, sia per motivi clinici che amministrativo-giudiziari. Una possibile soluzione alla scarsa sensibilità di questo marcatore è il suo utilizzo in combinazione con quelli visti in precedenza. In particolare, un aumento del MCV dei globuli rossi e dell'attività di AST, ALT (in particolare se $AST/ALT > 2$) e GGT può essere indicativo di un danno epatico indotto dall'alcol e quindi di un elevato consumo della sostanza, raggiungendo valori più elevati di sensibilità (88%) e specificità (95%). Nel già citato studio di Aboutara *et al.* (46), dei 234 pazienti inclusi, coloro con una malattia epatica alcol-relata diagnosticata (ALD, 87 pazienti) presentavano valori non significativamente diversi dai pazienti con una steatosi non alcolica (NAFLD) o steato-epatite non alcolica (NASH). In quello di Kechagias *et al.* (56) è stato dimostrato che non vi erano cambiamenti nel valore di MCV dopo un consumo della durata di tre mesi di 150 mL/*die* di vino rosso per le donne e di 300 mL/*die* per gli uomini, così come nel gruppo di controllo che si era astenuto dal consumo. Al contrario, è stato possibile discriminare tra i due gruppi attraverso l'uso del PEth, con un *cut-off* ottimale di 6,3 ng/mL (sensibilità 83%, specificità 83%) su sangue intero.

Infine, anche da Piano *et al.* (59) non sono state riscontrate differenze tra astemi, bevitori a rischio basso-moderato (mediana di 45 g di alcol, media di 58 g di alcol a settimana) e *binge drinkers* (mediana di 195 g di alcol, media di 231 g di alcol a settimana) utilizzando solo i valori di MCV, mentre le concentrazioni di PEth correlavano significativamente con i grammi di etanolo consumati a settimana e il numero di volte in cui i soggetti avevano consumato 4-5 *drink* in una singola occasione negli ultimi 30 giorni, sia nel sangue intero che nel DBS, sottolineando la maggiore sensibilità e specificità del PEth nell'identificare il consumo a rischio e la sua indipendenza da fattori quali età, sesso, altre sostanze ingerite o patologie concomitanti come ipertensione e patologie renali o epatiche.

4. PEth VS EtG

L'EtG è un metabolita dell'alcol che si forma nel fegato attraverso la reazione di glucuronizzazione dell'alcol etilico. L'EtG può essere rilevata nel sangue fino a 36 ore e nelle urine fino a 5 giorni dopo un notevole consumo di alcol. Risulta inoltre riscontrabile anche in altri tessuti corporei, tra cui i capelli, il che consente di ampliare ulteriormente la finestra di rilevabilità di questo marcatore (77), permettendo inoltre di distinguere tra astemi, consumo moderato o eccessivo (30). Grazie all'elevata specificità di questo marcatore, che non è praticamente presente nell'organismo in assenza di alcol etilico, l'EtG è oggi considerato il marcatore a breve e lungo termine con la più alta sensibilità (con valori che raggiungono addirittura il 100% ed una specificità anch'essa > 90%) (68). Tuttavia, il valore della sensibilità dipende fortemente dalla quantità di alcol ingerito, dall'intervallo di tempo tra l'assunzione e la raccolta del campione e dai *cut-off* applicati (38). Per quanto riguarda la valutazione dell'EtG a livello delle urine, la sua concentrazione potrebbe essere notevolmente variabile a seconda della diuresi del paziente; pertanto, l'assunzione di una maggior quantità di acqua porta ad una diluizione del marcatore e quindi un'importante diminuzione dei livelli di EtG urinario, con conseguenti risultati falsi negativi (74).

Un altro svantaggio dell'altissima sensibilità di questo analita è l'impossibilità di distinguere tra un consumo importante, ma risalente a diversi giorni prima dell'analisi, e un'assunzione (potenzialmente involontaria) di alcol, anche in minor quantità, poche ore prima del prelievo, come nel caso di pazienti risultati positivi dopo l'uso di collutori o disinfettanti a base di alcol (78).

Nonostante questi svantaggi, essendo un metabolita diretto dell'alcol, l'EtG è il principale parametro di riferimento per valutare la validità del PEth. Differenziando tra EtG urinario e EtG presente nel capello, è stato dimostrato che il PEth ha valori di sensibilità e specificità almeno sovrapponibili a quelli dell'EtG urinario. Infatti, nel lavoro di Aboutara *et al.* (46) si è calcolata l'accuratezza diagnostica di entrambi i marcatori nell'identificare il consumo alcolico durante la settimana precedente il prelievo. Entrambi hanno mostrato un'elevata specificità nell'identificare il consumo a rischio moderato (> 24g/settimana, uEtG 100%, PEth 93%) ed elevato (> 84g/settimana, uEtG 96%, PEth 80%), mentre il PEth è risultato più sensibile in entrambi i casi (28% vs 77% per > 24g/settimana, 41% vs 88% per > 84g/settimana) utilizzando valori di *cut-off* di 500 ng/mL per l'uEtG e 10 ng/mL per il PEth.

Risultati simili sono stati ottenuti da Afshar *et al.* (47), da cui è stato osservato che l'uso di biomarcatori urinari (uEtG e uEtS nello specifico), pur correlandosi con i valori di PEth e BAC, non hanno dimostrato aumentare la capacità di discriminazione del PEth, con un *cut-off* di 25 ng/mL, nell'identificazione di un consumo di alcol a rischio elevato. Infatti, il PEth da solo aveva un AUROC di 0,93 (IC: 95%, 0,90-0,96) che non aumentava quando si consideravano entrambi i biomarcatori in combinazione (0,94 (95% IC: 0,92-0,97)).

Quando si desidera valutare un consumo di alcol avvenuto in un tempo più remoto, è ampiamente utilizzata la quantificazione dell'EtG sui capelli, che presenta elevati valori di sensibilità e specificità. Anche in questo caso, tuttavia, il PEth si è rivelato essere un marcatore valido e con una capacità di discriminazione almeno sovrapponibile a quella dell'EtG su capello. Da Aboutara *et al.* (46) è stato osservato che, esaminando i pazienti che avevano consumato almeno due *drink* standard a settimana (> 24 g/settimana di alcol) negli ultimi tre mesi e di cui era possibile ottenere un campione di capelli, la sensibilità dell'hEtG era del 37% e la specificità del 90%, mentre il PEth presentava una sensibilità del 53% e una specificità del 100%. Risultati simili sono stati ottenuti considerando un consumo superiore a 84 g/settimana (l'EtG aveva una sensibilità del 57% e una specificità dell'89%, mentre il PEth del 90% e del 90%, rispettivamente). In entrambi i casi è stato considerato positivo un valore superiore a 5 pg/mg per l'EtG e superiore a 10 ng/mL per il PEth. In questo studio, i ricercatori hanno concluso che il PEth 16:0/18:1 presentava sensibilità, specificità e AUC-ROC migliori rispetto all'hEtG nel rilevare il consumo di alcol appartenente a qualsiasi categoria di rischio nei tre mesi precedenti l'analisi. Analogamente, nello studio di Shrock *et al.* (60) è stata identificata una sovrapposizione tra hEtG e PEth 16:0/18:1 (con una soglia di 150 e 20 ng/mL rispettivamente per il consumo eccessivo e moderato) e tra hEtG e PEth 16:0/18:2 (soglia di 96 e 20 ng/mL) del 72% e 68% rispettivamente. Anche in questo caso, il PEth si dimostra un prezioso marcatore aggiuntivo per migliorare le informazioni diagnostiche grazie alla sua finestra di rilevamento più ristretta rispetto all'hEtG (2-4 settimane contro 5 mesi per un segmento di capelli prossimale di 5 cm). Più critici sono i risultati di Baggio *et al.* (49), che su una coorte di giovani adulti hanno osservato una peggior *performance* sia dell'EtG su capello che del PEth nell'identificare i partecipanti allo studio rispetto ai questionari strutturati. In questo caso, rispetto ai *cut-off* raccomandati (30 pg/mg e 9 pg/mg per l'EtG su

capelli, e 210 ng/mL per il PEth), sono stati identificati *cut-off* più performanti. Tuttavia, è interessante notare che, considerando i valori di *cut-off* raccomandati per l'EtG dalla *Society of Hair Testing* (30) e confrontandone le prestazioni con quelle del PEth al *cut-off* raccomandato dal gruppo autore del lavoro (90 ng/mL), il PEth dimostra una sensibilità più elevata (83,1% vs 34,21% dell'hEtG ad una concentrazione maggiore o uguale a 30 pg/mg) ma una specificità minore (39,6% vs 82,12%, rispettivamente) per il consumo a rischio.

Alla luce di quanto detto, gli studi inclusi in questa revisione concordano nell'attribuire al PEth un possibile ruolo nella capacità di identificare il consumo alcolico “*a rischio*”. Infatti, esso si è dimostrato superiore ai marcatori indiretti (ALT, AST, GGT, MCV) e almeno comparabile in termini di risultati al principale marcatore diretto, cioè l'EtG. In questo senso, l'uso del PEth in combinazione con la quantificazione dell'EtG sul capello potrebbe fornire un maggior numero di informazioni sulle abitudini del consumo alcolico del paziente, consentendo di valutare sia un periodo remoto nel tempo (attraverso l'hEtG) sia eventuali variazioni nelle abitudini più recenti (attraverso il PEth). Per quanto riguarda i marcatori indiretti, invece, fermo restando la loro importanza dal punto di vista clinico, è auspicabile una loro progressiva sostituzione con la quantificazione del PEth nel contesto della valutazione del consumo alcolico. Tuttavia, come già detto, non esistono attualmente studi di grandi dimensioni che permettano di identificare valori “*cut-off*” validi sulla popolazione generale e quindi di adottare questo marcatore su larga scala.

CONCLUSIONI

La presente *review* sistematica della Letteratura sull'uso del fosfatidiletanolo (PEth) come biomarcatore del consumo di alcol *c.d.* “*a rischio*” per la salute ha fornito alcuni spunti interessanti riguardo il possibile utilizzo di questo marcatore nello specifico campo studiato. Infatti, questo si è dimostrato dotato di un'elevata specificità e sensibilità, superiore a quella di altri strumenti attualmente adottati nella clinica, e di una forte correlazione rispetto ai risultati del principale questionario comunemente utilizzato per l'*assessment* del rischio per la salute derivato dal consumo di alcol, l'AUDIT.

Tuttavia, i lavori considerati hanno anche evidenziato la necessità di procedere con ulteriori ricerche volte a individuare valori di *cut-off* validi e applicabili sulla popolazione generale, in quanto non esiste ancora un valore universalmente condiviso che permetta di distinguere tra le diverse categorie di bevitori.

Un possibile punto di partenza in questo senso potrebbe essere l'adozione, tra i diversi autori interessati allo studio del PEth, di uno strumento già dotato di *cut-off* standard e validati per la definizione delle diverse classi di rischio del consumo alcolico, da usarsi come valori di riferimento per l'identificazione dei diversi valori-soglia dell'analita. A tal proposito, rimandiamo a quelle già citate dalla Letteratura internazionale di merito, che tuttavia non sono state adottate da tutti gli autori compresi nel presente lavoro di *review*, e che utilizza i punteggi di AUDIT e di AUDIT-C come riferimento per la determinazione della classe di rischio per la salute del consumo alcolico. L'adozione di questo strumento su larga scala potrebbe permettere una standardizzazione dei risultati ottenuti dai diversi studi e quindi, potenzialmente, l'identificazione dei possibili valori di *cut-off* tramite studi di tipo metanalitico.

BIBLIOGRAFIA

1. Lazzari G. L'enciclopedia Treccani. 1. ed. Napoli: Liguori; 1977.
2. Cederbaum AI. Alcohol Metabolism. *Clin Liver Dis.* 2012;16(4):667–85.
3. Lee SL, Chau GY, Yao CT, Wu CW, Yin SJ. Functional Assessment of Human Alcohol Dehydrogenase Family in Ethanol Metabolism: Significance of First-Pass Metabolism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2006;30(7):1132–42.
4. Lieber CS. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the microsomal ethanol oxidizing system Iseri OA, Lieber CS, Gottlieb LS. The ultrastructure of fatty liver induced by prolonged ethanol ingestion [*Am J Pathol* 1966;48:535–555]. *J Hepatol.* 2004;40(2):198–202.
5. Teschke R. Alcoholic Liver Disease: Alcohol Metabolism, Cascade of Molecular Mechanisms, Cellular Targets, and Clinical Aspects. *Biomedicines.* 2018;6(4):106.
6. D'Angelo A, Petrella C, Greco A. Acute alcohol intoxication: a clinical overview. *Clin Ter.* 2022;(3):280–91.
7. White AM, Matthews DB, Best PJ. Ethanol, memory, and hippocampal function: A review of recent findings. *Hippocampus.* 2000;10(1):88–93.
8. Harrison's Principles of Internal Medicine, Twenty-First Edition (Vol.1 & Vol.2) (English Edition); 2021.
9. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition, Text Revision (DSM-5-TR®) 2013.
10. World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. Geneva: World Health Organization; 2018.
11. Devgun, M S et al. "Effects of acute and varying amounts of alcohol consumption on alkaline phosphatase, aspartate transaminase, and gamma-glutamyltransferase." *Alc, Clin. and Exp. Res.* vol. 9,3 (1985): 235-7.

12. Shayani G, Raka J, Sonali J, Ravindra R, Ashwani Kumar M. Alcohol Biomarkers and their Relevance in Detection of Alcohol Consumption in Clinical Settings. *Int Arch Subst Abuse Rehabil.* 2019.
13. Ghouri N, Preiss D, Sattar N. Liver enzymes, nonalcoholic fatty liver disease, and incident cardiovascular disease: a narrative review and clinical perspective of prospective data. *Hepat.* 2010;52(3):1156-1161.
14. Conigrave KM, Davies P, Haber P, Whitfield JB. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addict Abingdon Engl.* 2003;98 Suppl 2:31–43.
15. Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2001; 38(4):263–355.
16. Tawiah KD, Riley SB, Budelier MM. Biomarkers and Clinical Laboratory Detection of Acute and Chronic Ethanol Use. *Clin Chem.* 2022;68(5):635–45.
17. Whitehead TP, Clarke CA, Bayliss RI, Whitfield AG. Mean red cell volume as a marker of alcohol intake. *J R Soc Med.* 1985;78(10):880–1.
18. Ballard HS. The hematological complications of alcoholism. *Alcohol Health Res World.* 1997;21(1):42–52.
19. Helander A, Kenan Modén N. Effect of Transferrin Glycation on the Use of Carbohydrate-Deficient Transferrin as an Alcohol Biomarker. *Alcohol Alcohol.* 2013;48(4):478–82.
20. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem.* 1991;37(12):2029–37.
21. Sillanaukee P, Strid N, Allen JP, Litten RZ. Possible reasons why heavy drinking increases carbohydrate-deficient transferrin. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25(1):34–40.
22. Årving A, Høiseith G, Hilberg T, Trydal T, Husa A, Djordjevic A, et al. Comparison of the Diagnostic Value of Phosphatidylethanol and Carbohydrate-Deficient Transferrin as Biomarkers of Alcohol Consumption. *Alcohol Clin Exp Res.* 2021;45(1):153–62.

23. Chrostek L, Cylwik B, Szmitkowski M, Korcz W. The diagnostic accuracy of carbohydrate-deficient transferrin, sialic acid and commonly used markers of alcohol abuse during abstinence. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 2006; 364(1–2):167–71.
24. Pizon AF, Becker CE, Bikin D. The clinical significance of variations in ethanol toxicokinetics. *J Med Toxicol.* 2007;3(2):63–72.
25. Bendtsen P, Jones AW, Helander A. Urinary excretion of methanol and 5-hydroxytryptophol as biochemical markers of recent drinking in the hangover state. *Alcohol Alcohol Oxf Oxf.* 1998;33(4):431–8.
26. Bendtsen P, Hultberg J, Carlsson M, Jones AW. Monitoring Ethanol Exposure in a Clinical Setting by Analysis of Blood, Breath, Saliva, and Urine. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999; 23(9):1446–51.
27. Høiseth G, Yttredal B, Karinen R, Gjerde H, Mørland J, Christophersen A. Ethyl glucuronide concentrations in oral fluid, blood, and urine after volunteers drank 0.5 and 1.0 g/kg doses of ethanol. *J Anal Toxicol.* 2010;34(6):319–24.
28. Wurst FM, Seidl S, Ladewig D, Müller-Spahn F, Alt A. Ethyl glucuronide: on the time course of excretion in urine during detoxification. *Addict Biol.* 2002; 7(4):427–34.
29. 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(10):1855–7.
30. Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2011. *Forensic Sci Int.* 2012;218(1–3):2.
31. Triolo V, Spanò M, Buscemi R, Gioè S, Malta G, Čaplinskiene M, et al. EtG Quantification in Hair and Different Reference Cut-Offs in Relation to Various Pathologies: A Scoping Review. *Toxics.* 2022;10(11):682.
32. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetto G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 2012;13(11):14788–812.

33. Schröck A, Henzi A, Bütikofer P, König S, Weinmann W. Determination of the formation rate of phosphatidylethanol by phospholipase D (PLD) in blood and test of two selective PLD inhibitors. *Alcohol Fayettev N.* 2018; 73:1–7.
34. Hahn JA, Murnane PM, Vittinghoff E, Muyindike WR, Emenyonu NI, Fatch R, et al. Factors associated with phosphatidylethanol (PEth) sensitivity for detecting unhealthy alcohol use: An individual patient data meta-analysis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2021;45(6):1166–87.
35. Ulwelling W, Smith K. The PEth Blood Test in the Security Environment: What it is; Why it is Important; and Interpretative Guidelines. *J Forensic Sci.* 2018; 63(6):1634–40.
36. Luginbühl M, Wurst FM, Stöth F, Weinmann W, Stove CP, Van Uytfanghe K. Consensus for the use of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) for the assessment of abstinence and alcohol consumption in clinical and forensic practice (2022 Consensus of Basel). *Drug Test Anal.* 2022; 14(10):1800–2.
37. Codice della Strada- decreto legislativo 30 Aprile 1992, n.285.
38. Stauffer K, Andresen H, Vettorazzi E, Tobias N, Nashan B, Sterneck M. Urinary ethyl glucuronide as a novel screening tool in patients pre- and post-liver transplantation improves detection of alcohol consumption. *Hepatology Baltim Md.* 2011; 54(5):1640–9.
39. Stewart SH, Koch DG, Burgess DM, Willner IR, Reuben A. Sensitivity and specificity of urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in liver disease patients. *Alcohol Clin Exp Res.* 2013; 37(1):150–5.
40. Stewart SH, Reuben A, Brzezinski WA, Koch DG, Basile J, Randall PK, et al. Preliminary evaluation of phosphatidylethanol and alcohol consumption in patients with liver disease and hypertension. *Alcohol Alcohol Oxf Oxf.* 2009; 44(5):464–7.
41. Andresen-Streichert H, Beres Y, Weinmann W, Schröck A, Müller A, Skopp G, et al. Improved detection of alcohol consumption using the novel marker phosphatidylethanol in the transplant setting: results of a prospective study. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant.* 2017;30(6):611–20.
42. Fleming MF, Smith MJ, Oslakovic E, Lucey MR, Vue JX, Al-Saden P, et al. Phosphatidylethanol Detects Moderate-to-Heavy Alcohol Use in Liver Transplant Recipients. *Alcohol Clin Exp Res.* 2017; 41(4):857–62.

43. Barrio P, Gual A, Lligoña A, Teixidor L, Weinmann W, Yegles M, et al. Phosphatidylethanol for Monitoring Alcohol Use in Liver Transplant Candidates: An Observational Study. *J Clin Med*. 2020; 9(9):3060.
44. Franceschetto L, Perilli M, Cinquetti A, Giraudo C, Gardi M, Cecchetto G, et al. Phosphatidylethanol in Maternal or Neonatal Blood to Detect Alcohol Exposure during Pregnancy: A Systematic Review. *Life Basel Switz*. 2022; 12(10):1528.
45. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021; n71.
46. Aboutara N, Szewczyk A, Jungen H, Mosebach A, Rodriguez Lago M, Vettorazzi E, et al. Phosphatidylethanol in patients with liver diseases of different etiologies: Analysis of six homologues and comparison with other alcohol markers. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2022; 524:171–8.
47. Afshar M, Baker K, Corral J, Ross E, Lowery E, Gonzalez R, et al. Internal and External Validation of an Alcohol Biomarker for Screening in Trauma. *Ann Surg*. 2022; 276(6): 961–8.
48. Afshar M, Burnham EL, Joyce C, Clark BJ, Yong M, Gaydos J, et al. Cut-Point Levels of Phosphatidylethanol to Identify Alcohol Misuse in a Mixed Cohort Including Critically Ill Patients. *Alcohol Clin Exp Res*. 2017; 41(10):1745–53.
49. Baggio S, Trächsel B, Rousson V, Rothen S, Studer J, Marmet S, et al. Identifying an accurate self-reported screening tool for alcohol use disorder: evidence from a Swiss, male population-based assessment. *Addict Abingdon Engl*. 2020; 115(3):426–36.
50. Cherrier MM, Shireman LM, Wicklander K, Yeung W, Kooner P, Saxon AJ, et al. Relationship of Phosphatidylethanol Biomarker to Self-Reported Alcohol Drinking Patterns in Older and Middle-Age Adults. *Alcohol Clin Exp Res*. 2020; 44(12):2449–56.
51. Couture MC, Page K, Sansothy N, Stein E, Vun MC, Hahn JA. High prevalence of unhealthy alcohol use and comparison of self-reported alcohol consumption to phosphatidylethanol among women engaged in sex work and their male clients in Cambodia. *Drug Alcohol Depend*. 2016; 165:29–37.

52. Francis J, Helander A, Kapiga S, Weiss H, Grosskurth H. Validation of the MINI (DSM IV) Tool for the Assessment of Alcohol Dependence among Young People in Northern Tanzania Using the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol (PEth). *Int J Environ Res Public Health*. 2015; 12(11):14021–33.
53. Francis JM, Weiss HA, Helander A, Kapiga SH, Changalucha J, Grosskurth H. Comparison of self-reported alcohol use with the alcohol biomarker phosphatidylethanol among young people in northern Tanzania. *Drug Alcohol Depend*. 2015; 156:289–96.
54. Gerbase FE, Tegner M, Krutzmann ME, Muller VV, Alff JDA, Da Silva VB, et al. Blood phosphatidyl ethanol levels as a tool to detect alcohol misuse in trauma patients. *Clin Toxicol*. 2021; 59(5):418–25.
55. Jørgenrud B, Kabashi S, Nadezhdin A, Bryun E, Koshkina E, Tetenova E, et al. The Association between the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol (PEth) and Self-Reported Alcohol Consumption among Russian and Norwegian Medical Patients. *Alcohol Alcohol*. 2021; 56(6):726–36.
56. Kechagias S, Dernroth DN, Blomgren A, Hansson T, Isaksson A, Walther L, et al. Phosphatidylethanol Compared with Other Blood Tests as a Biomarker of Moderate Alcohol Consumption in Healthy Volunteers: A Prospective Randomized Study. *Alcohol Alcohol*. 2015; 50(4):399–406.
57. Kuteesa MO, Cook S, Weiss HA, Kamali A, Weinmann W, Seeley J, et al. Comparing Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT) with Timeline Follow Back (TLFB), DSM-5 and Phosphatidylethanol (PEth) for the assessment of alcohol misuse among young people in Ugandan fishing communities. *Addict Behav Rep*. 2019; 10:100233.
58. Lowery EM, Walsh M, Yong M, Kovacs EJ, Joyce C, Afshar M. Use of alcohol biomarkers to identify alcohol misuse in organ donors. *Alcohol*. 2018; 73:67–72.
59. Piano MR, Tiwari S, Nevoral L, Phillips SA. Phosphatidylethanol Levels Are Elevated and Correlate Strongly with AUDIT Scores in Young Adult Binge Drinkers. *Alcohol Alcohol*. 2015; 50(5):519–25.
60. Schröck A, Pfäffli M, König S, Weinmann W. 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(6):1527–33.

61. Schröck A, Wurst FM, Thon N, Weinmann W. Assessing phosphatidylethanol (PEth) levels reflecting different drinking habits in comparison to the alcohol use disorders identification test – C (AUDIT-C). *Drug Alcohol Depend.* 2017; 178:80–6.
62. Van Uytvanghe K, Heughebaert L, Abatih E, Stove CP. Set-up of a population-based model to verify alcohol abstinence via monitoring of the direct alcohol marker phosphatidylethanol 16:0/18:1. *Addiction.* 2022; 117(7):2108–18.
63. J Munn Z, Barker TH, Moola S, Tufanaru C, Stern C, McArthur A, Stephenson M, Aromataris E. Methodological quality of studies: an introduction to the JBI critical appraisal tool. *JBI Evidence Synthesis.* 2020;18(10):2127-2133.
64. Saunders, J.B.; Aasland, O.G.; Babor, T.F.; de la Fuente, J.R.; Grant, M. Development of the Alcohol Use Disorders Identification Test (AUDIT): WHO Collaborative Project on Early Detection of Persons with Harmful Alcohol Consumption--II. *Addict.* Abingdon Engl. 1993, 88, 791–804.
65. Bradley KA, DeBenedetti AF, Volk RJ, Williams EC, Frank D, Kivlahan DR. AUDIT-C as a brief screen for alcohol misuse in primary care. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(7):1208-1217.
66. O’Flynn N. Harmful drinking and alcohol dependence: advice from recent NICE guidelines. *Br J Gen Pract.* 2011;61(593):754–6.
67. Schober P, Boer C, Schwarte LA. Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesth Analg.* 2018;126(5):1763–8.
68. Helander, A.; Hansson, T. National harmonization of the alcohol biomarker PEth. *Lakartidningen* 2013, 110, 1747–1748.
69. Sobell, L.C.; Sobell, M.B. Timeline Follow-Back. In *Measuring Alcohol Consumption: Psychosocial and Biochemical Methods*; Litten, R.Z., Allen, J.P., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, 1992; pp. 41–72 ISBN 978-1-4612-0357-5.
70. Pedersen ER, Grow J, Duncan S, Neighbors C, Larimer ME. Concurrent validity of an online version of the Timeline Followback assessment. *Psychol Addict Behav.* 2012;26(3):672–7.

71. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, et al. The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10. *J Clin Psychiatry*. 1998;59 Suppl 20:22-57.
72. Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers?: *Curr Opin HIV AIDS*. 2010; 5(6):463–6.
73. Peterson K. Biomarkers for alcohol use and abuse-a summary. *Alcohol Res Health*. 2004;28(1):30-37.
74. Andresen-Streichert H, Müller A, Glahn A, Skopp G, Sterneck M. Alcohol Biomarkers in Clinical and Forensic Contexts. *Dtsch Arztebl Int*. 2018.
75. Ray P, Manach YL, Riou B, Houle TT, Warner DS. Statistical Evaluation of a Biomarker. *Anesthesiology*. 2010;112(4):1023–40.
76. Fagan KJ, Irvine KM, McWhinney BC, Fletcher LM, Horsfall LU, Johnson L, et al. Diagnostic sensitivity of carbohydrate deficient transferrin in heavy drinkers. *BMC Gastroenterol*. 2014;14(1):97.
77. Schmitt, G.; Droenner, P.; Skopp, G.; Aderjan, R. Ethyl Glucuronide Concentration in Serum of Human Volunteers, Teetotalers, and Suspected Drinking Drivers. *J. Forensic Sci*. 1997, 42, 1099–1102.
78. Martins Ferreira L, Binz T, Yegles M. The influence of ethanol containing cosmetics on ethyl glucuronide concentration in hair. *Forensic Sci Int*. 2012; 218(1–3):123–5.

